ETIOLOGÍA DE LA ROYA AMERICANA DE LA SOYA, *Phakopsora meibomiae* Arthur, EN PUERTO RICO

Por

Byron Patricio Vega Jiménez

Tesis sometida en cumplimiento parcial de los requisitos para el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS
EN
POTECCIÓN DE CULTIVOS

UNIVERSIDAD DE PUERTO RICO
RECINTO UNIVERSITARIO DE MAYAGÜEZ
2009

Aprobado por:

Lydia Rivera, Ph.D. Miembro, Comité Graduado	Fecha
James Beaver, Ph.D. Miembro, Comité Graduado	Fecha
Consuelo Estévez, Ph.D. Presidenta, Comité Graduado	Fecha
Linette Orellana, Ph.D. Representante de Estudios Graduados	Fecha
Arístides Amstrong, MSc Director del Departamento	Fecha

ABSTRACT

Natural infection of American soybean rust, caused by *Phakopsora meibomiae* Arthur, was studied during 2006 to 2008 in experimental plots established at Isabela, Adjuntas and Juana Díaz Agriculture Experiment Stations of the University of Puerto Rico. The American soybean rust was observed on *Lablab purpureus* and *Phaseolus lunatus* in Adjuntas from June to October, 2007. Soybean rust identification was carried out by DNA analysis using PCR of the ITS region of the rDNA. In order to observe natural infections on wild hosts, different surveys were conducted in fourteen municipalities of the island. Twenty nine percent of the samples were positive for *P. meibomiae. L. purpureus* presented the highest disease severity. Additionally, *P. meibomaie* was found in *Vigna luteola, Macroptilium lathyroides, Pachyrhizus erosus, P. lunatus* and *Vigna* sp. Thirty eight percent of infected legumes were observed between 501 and 600 meters. Two different rust lesions were observed: a tan color reaction with abundant sporulation, and a reddish brown lesion with reduced sporulation. Lesion size on *L. purpureus* varied from 0.92-0.60 to 0.68-0.41 mm. Average number of uredinium per cm^2 was 31.6, with an average of 118.77 urediniospores/uredinium. Uredinium patterns and the release of the urediniospores were observed in scanning electron microscopy. Aditionally, host range studies were conducted in 15 legumes. *Canavalia gladiata, Crotalaria brevidens, Mucuna pruriens* and *Pueraria phaseoloides* had immune reaction. The shortest incubation and latent periods were observed on *P. vulgaris* with 3.23 and 6.27 days, respectively. The greatest number of uredinium per individual lesion was observed on *P. vulgaris* with an average of 5.79.

During the two years of survey, the presence of Asian soybean rust caused by *P. pachyrhizi,* was never observed nor identified.

RESUMEN

En lotes experimentales de soya en las Estaciones Experimentales de Isabela, Adjuntas y Juana Díaz, se determinó la infección natural de la roya americana de la soya, causado por *Phakopsora meibomiae* Arthur, en 2006 a 2008. La roya americana se presentó únicamente en Adjuntas, en *Lablab purpureus* y *Phaseolus lunatus,* en siembras contiguas, durante la siembra de Junio a Octubre del 2007. La identificación de la especie fue realizada mediante análisis de ADN, utilizando PCR y secuenciación de la región ITS del rADN. Se realizaron monitoreos en catorce municipios de la isla para determinar la infección natural en hospederos silvestres. El 29% de muestras resultaron positivas, siendo *L. purpureus* la de mayor prevalesencia. Adicionalmente, se reportó presencia de *P. meibomiae* en *Vigna luteola, Macroptilium lathyroides, Pachyrhizus erosus, P. lunatus* y *Vigna* sp. El 38% de las muestras infectadas se presentó entre los 501 y 600 metros. Las reacciones observadas fueron de tipo TAN (lesiones bronceadas con abundante esporulación) y RB (lesiones café-rojizas y poca esporulación). En *L. purpureus,* el tamaño de las lesiones variaron de 0.92-0.60 mm por 0.68-0.41 mm. El número promedio de uredos por cm^2 fue de 31.6, con un promedio de 118.77 uredosporas/uredo. La estructura de los uredos y los patrones de liberación de uredosporas se observaron mediante microscopía electrónica de rastreo. Para determinar el rango de hospederos se evaluaron 15 especies de leguminosas. *Canavalia gladiata, Crotalaria brevidens, Mucuna pruriens* y *Pueraria phaseoloides* fueron inmunes. El período de incubación y de latencia más corto se observó en *P. vulgaris* con 3.23 y 6.27 días, respectivamente. El mayor número de uredos por lesión individual lo produjo *P.*

vulgaris con un promedio de 5.79. Durante los dos años de monitoreo, no se observó ni se identificó la presencia de la roya asiática de la soya, causada por *P. pachyrhizi.*

A mi amada esposa María Cristina, fuente de inspiración, sacrificio y dedicación para la consecusión de todos los proyectos que hemos emprendido.

A mis padres: Marco Antonio y Laura Judith, por su amor y comprensión.

A mis hermanos: Marco, Gissela y Elizabeth, por todo su apoyo.

AGRADECIMIENTOS

A Jesucristo, mi Señor y Salvador, por darme esa vida con propósito y felicidad que me permite comunicarme directamente con mi Padre celestial. *"Porque de tal manera amó Dios al mundo, que ha dado a su Hijo unigénito, para que todo aquel que en él cree, no se pierda, mas tenga vida eterna."* (Juan 3:16).

De manera especial quiero agradecer a la Dra. Consuelo Estévez de Jensen, por haberme dado la oportunidad de trabajar en el proyecto T-STAR-ZTS-31. Gracias por su amistad y su apoyo brindado durante los años de estudio y sus valiosos consejos que me permitieron crecer profesional y personalmente.

Gracias al Dr. James Beaver por su colaboración durante mi formación académica. A la Dra. Lydia Rivera, por sus recomendaciones y sus conocimientos compartidos. A las Estaciones Experimentales Agrícolas de Juana Díaz, Adjuntas e Isabela al personal administrativo, técnico y de apoyo que colaboraron en el establecimiento y desarrollo de las parcelas experimentales. Un reconocimiento especial a los Doctores Gary Breckon y Danilo Chinea, del Departamento de Biología de la UPRM. Así mismo quiero agradecer a mis amigos y compañeros de la Clínica de Diagnóstico de Juana Díaz, con los que compartimos un espacio familiar durante las jornadas de trabajo en el Laboratorio. Al Departamento de Protección de Cultivos, a su director Prof. Arístides Amstrong, y sus secretarias: Jeannette Morales y María Pagán.

Finalmente, mi agradecimiento sincero al Centro Internacional de Teoterapia Integral (CENTI Puerto Rico), especialmente a los Pastores Ruby Salinas y Argenis Cigollén, por ser ese apoyo Espiritual y nuestra familia en la fé.

TABLA DE CONTENIDO

LISTA DE CUADROS xii

LISTA DE GRÁFICOS xiv

LISTA DE APÉNDICES xvii

1. INTRODUCCIÓN 1

2. REVISIÓN DE LITERATURA 5

2.1. Clasificación taxonómica de la "roya de la soya" 5

2.2. Etiología 5

2.2.1. Etiología de *Phakopsora meibomiae* (Arthur) Arthur 6

2.2.2. Etiología de *Phakopsora pachyrhizi* H. Sydow & Sydow 8

2.3. Sintomatología 9

2.4. Ciclo de vida y epidemiología. 10

2.4.1. Germinación de uredosporas 12

2.4.2. Formación del apresorio 13

2.4.3. Penetración y colonización 14

2.4.4. Desarrollo uredinal y esporulación 14

2.4.5. Formación de teliosporas 15

2.5. Rango de hospederos 17

2.6. Control biológico y genético 19

2.7. Control químico 22

3. MATERIALES Y MÉTODOS 28

3.1. Lotes experimentales 28

3.1.1. Isabela 29

3.1.2. Adjuntas 30

3.1.3. Juana Díaz 32

3.2. Monitoreo de lotes experimentales 33

3.3. Monitoreo de hospederos silvestres 34

3.4. Rango de hospederos 38

3.4.1. Siembra 39
3.4.2. Inoculación 39
3.4.3. Variables evaluadas 40
3.4.3.1. Período de latencia 40
3.4.3.2. Período de incubación 40
3.4.3.3. Número de uredos por lesión individual 40
3.4.3.4. Diámetro de uredo 41
3.5. Identificación 41
3.5.1. ELISA 41
3.5.2. Identificación molecular 42
3.5.2.1. Extracción de ADN 42
3.5.2.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) 42
3.6. Secuenciación de la región ITS (Internal Transcribed Spacer) del ADN ribosomal 44
3.6.1. Extracción del ADN 44
3.6.2. Amplificación de la región ITS 44
3.6.3. Análisis de la secuencia de la región ITS del ADN ribosomal 45
3.7. Microscopía Electrónica de Rastreo (Scanning Electron Microscopy: SEM) 47
4. RESULTADOS 48
4.1. Evaluación de la infección natural de la roya americana de la soya en lotes experimentales 48
4.2. Presencia de *P. meibomiae* en hospederos silvestres de Puerto Rico 59
4.3. Descripción de *Phakopsora meibomiae* en *Lablab purpureus* y otras leguminosas 68
4.4. Rango de hospederos para *P. meibomiae* 78
4.5. Caracterización molecular de *P. meibomiae* 86
5. DISCUSIÓN 89
5.1. Evaluación de la infección natural de la roya americana de la soya en lotes experimentales 89
5.2. Distribución de *P. meibomiae* en hospederos silvestres 93
5.3. Caracterización morfológica de *P. meibomiae* 96
5.4. Rango de hospederos de *P. meibomiae* 98
5.5. Caracterización molecular de aislados de *Phakopsora* 101

6. CONCLUSIONES 104

7. RECOMENDACIONES 106

8. LITERATURA CITADA 107

APÉNDICE 1 115

APÉNDICE 2 119

LISTA DE CUADROS

Cuadros **Páginas**

Cuadro 1. Clasificación de los principales fungicidas utilizados para el control de la roya de la soya. 27

Cuadro 2. Fechas de siembra de lotes experimentales de soya en tres Estaciones Experimentales Agrícolas, durante el período 2006-2008. 28

Cuadro 3. Agroquímicos utilizados en lotes experimentales de soya en la EEA de Isabela, durante el período 2006-2008. 30

Cuadro 4. Agroquímicos utilizados en lotes experimentales en la EEA de Adjuntas, durante el período 2006-2008. 31

Cuadro 5. Agroquímicos utilizados en lotes experimentales en la EEA de Juana Díaz, durante el período 2006-2008. 33

Cuadro 6. Fechas y localización geográfica de los sitios en donde se realizaron los monitoreos en leguminosas silvestres para la roya americana de la soya. 35

Cuadro 7. Localización geográfica de los aislados de *P. meibomiae,* infectando *L. purpureus,* utilizados para la secuenciación de la región ITS del ADN ribosomal..... 44

Cuadro 8. Especies y números de accesiones tomadas del Centro Nacional para Información Biotecnológica (GeneBank)..... 46

Cuadro 9. Evaluación de la roya de la soya en lotes experimentales, y principales enfermedades identificadas en soya en Isabela, Adjuntas y Juana Díaz, durante los años 2006 a 2008. 49

Cuadro 10. Datos climáticos de temperaturas y precipitación en la EEA de Adjuntas, durante los años 2006 al 2008. 50

Cuadro 11. Datos climáticos para la EEA de Juana Díaz, durante los años 2006 al 2008... 51

Cuadro 12. Datos climáticos para la EEA de Isabela, durante los años 2006 al 2008. 52

Cuadro 13. Porcentaje de incidencia y severidad de *P. meibomiae* en *L. purpureus* y *P. lunatus,* durante el ciclo de evaluación en la EEA de Adjuntas. 55

Cuadro 14. Radiación solar máxima y promedio en la localidad de Guilarte durante el 2007 y el 2008. 58

Cuadro 15. Leguminosas monitoreadas infectadas con *P. meibomiae,* en catorce municipios de Puerto Rico durante noviembre 2006 a junio 2008. 60

Cuadro 16. Leguminosas infectadas con *L. purpureus,* distribuidas por municipios monitoreados durante 2006 a 2008..... 65

Cuadro 17. Número de leguminosas infectadas con *P. meibomiae,* en función de su altitud durante el 2006 al 2008. 67

Cuadro 18. Descripción morfológica de 16 aislados de *Lablab purpureus* infectados con *P. meibomiae*, provenientes del monitoreo realizado durante 2006 al 2008. 70

Cuadro 19. Descripción morfológica de diferentes leguminosas infectados con *P. meibomiae*, provenientes del monitoreo realizado durante 2006 al 2008. 73

Cuadro 20. Prueba de ELISA para la identificación de *P. pachyrhizi* en leguminosas monitoreadas durante el 2006 al 2008..... 77

Cuadro 21. Período de incubación y de latencia para *P. meibomiae,* en la evaluación de 15 especies de leguminosas bajo condiciones de vivero. 79

Cuadro 22. Número de uredos de *P. meibomiae* por lesión individual, en la evaluación de 15 especies de leguminosas bajo condiciones de vivero. 82

Cuadro 23. Diámetro de uredos de *P. meibomiae*, en la evaluación de 15 especies de leguminosas bajo condiciones de vivero. 83

Cuadro 24. Prueba de ELISA para la identificación de *P. pachyrhizi* en el estudio de rango de hospederos de *P. meibomiae.*..... 85

Cuadro 25. Identificación molecular de aislados de *Phakopsora,* procedentes de *L. purpureus,* utilizando la secuenciación de la región ITS del rADN y el programa BLAST. 86

LISTA DE FIGURAS

Figuras **Páginas**

Figura 1. Localización geográfica, mediante posicionamiento satelital, de los lotes centinela de soya en las EEA de Juana Díaz, Adjuntas e Isabela. 29

Figura 2. Localización geográfica de los lugares monitoreados en leguminosas silvestres, para la roya americana de la soya (Utilización del programa ESRI ArcView, versión 9.2).36

Figura 3. Escala de severidad para *P. meibomiae* en hojas de *L. purpureus.* A. Escala 1, representa una reacción inmune. B. Escala 2, representa una severidad menor al 5%. C. Escala 3, representa una severidad entre el 6 y el 25%. D. Escala 4, representa una severidad entre el 26 y el 50%. E. Escala 5, representa una severidad superior al 51%. 38

Figura 4. Temperatura (°C) promedio mensual, para las EEA de Isabela, Adjuntas y Juana Díaz, durante 2006 al 2008. 53

Figura 5. Precipitación (mm) mensual para las EEA de Isabela, Adjuntas y Juana Díaz, durante 2006 al 2008. 53

Figura 6. Temperatura (°C) y precipitación (mm) para la primera siembra de hospederos (8 de junio del 2007) en la EEA de Adjuntas. 56

Figura 7. Temperatura (°C) y precipitación (mm) para la segunda siembra de hospederos (8 de octubre del 2007) en la EEA de Adjuntas..... 56
Cuadro 14. Radiación solar máxima y promedio en la localidad de Guilarte durante el 2007 y el 2008. 58

Figura 8. Radiación solar (Wat/m^2) promedio en Isabela, Guilarte y Juana Díaz, durante junio 2007 a julio 2008. 58

Figura 9. Gel de agarosa para la determinación de la roya de la soya en *Lablab purpureus*. A. PCR para *Pakopsora meibomiae,* utilizando los iniciadores Pme1/Pme2. 1 = escalera (100 bp), 2 = punto de monitoreo 21 (Adjuntas), 3 = punto de monitoreo 20 (Aibonito), 4 = punto de monitoreo 19 (Corozal), 5 = punto de monitoreo 26 (Adjuntas), 6 = punto de monitoreo 16 (Adjuntas), 7 = punto de monitoreo 17 (Aibonito), 8 = punto de monitoreo 22 (Barranquitas) y 9 = punto de monitoreo 25 (Jayuya). La flecha indica los productos de amplificación de PCR en 338 bp. B. PCR para *Pakopsora pachyrhizi,* utilizando los iniciadores Ppa1/Ppa2. 1 = escalera (100 bp), 2 = control positivo para *P. pachyrhizi,* 3 = punto de monitoreo 21 (Adjuntas), 4 = punto de monitoreo 20 (Aibonito), 5 = punto de monitoreo 19 (Corozal), 6 = punto de monitoreo 26 (Adjuntas), 7 = punto de monitoreo 16 (Adjuntas), 8 = punto de monitoreo 17 (Aibonito), 9 = de monitoreo 22 (Barranquitas) y 10

= punto de monitoreo 25 (Jayuya). La flecha indica el producto de amplificación de PCR en 332 bp. 61

Figura 10. Gel de agarosa para la determinación de la roya americana de la soya en diferentes leguminosas. A. PCR para *Pakopsora meibomiae,* utilizando los iniciadores Pme1/Pme2. 1 = escalera (100 bp), 2 = *P. lunatus*, punto de monitoreo 5 (Isabela), 3 = *P. erosus,* punto de monitoreo 5 (Isabela), 4 = *V. luteola,* punto de monitoreo 5 (Isabela), 5 = *Vigna* sp., punto de monitoreo 32 (Adjuntas), 6 = *P. phaseoloides,* punto de monitoreo 10 (Jayuya), 7 = *C. gladiata,* punto de monitoreo 5 (Isabela), 8 = *M. pruriens,* Punto de monitoreo 21 (Adjuntas). La flecha indica los productos de amplificación de PCR en 338 bp. B. PCR para *Pakopsora pachyrhizi,* utilizando los iniciadores Ppa1/Ppa2. 1 = escalera (100 bp), 2 = control positivo para *P. pachyrhizi,* 3 = *P. lunatus*, punto de monitoreo 5 (Isabela), 4 = *P. erosus,* punto de monitoreo 5 (Isabela), 5 = *V. luteola,* punto de monitoreo 5 (Isabela), 6 = *Vigna* sp., punto de monitoreo 32 (Adjuntas), 7 = *P. phaseoloides,* punto de monitoreo 10 (Jayuya), 8 = *C. gladiata,* punto de monitoreo 5 (Isabela), 9 = *M. pruriens,* Punto de monitoreo 21 (Adjuntas). La flecha indica el producto de amplificación de PCR en 332 bp. 62

Figura 11. Distribución porcentual de muestras infectadas con *P. meibomiae,* de acuerdo al tipo de leguminosas identificadas, durante el monitoreo del 2006 al 2008..... 63

Figura 12. Distribución porcentual de leguminosas infectadas con *P. meibomiae,* de acuerdo a su municipio, durante 2006 a 2008. 65

Figura 13. Distribución de muestras infectadas con *P. meibomiae,* en función de su altitud durante el 2006 al 2008. 67

Figura 14. A. *Lablab purpureus* localizado en Corozal. B. Hojas infectadas con *P. meibomiae,* severidad de 5, provenientes de la zona de Adjuntas. C. Lesiones RB en *L. purpureus,* producidos por *P. meibomiae* (20X). D. Presencia de uredosporas y paráfisis de *P. meibomiae* (400 X)..... 71

Figura 15. A. Hoja de *Pachyrhizus erosus* infectada con *P. meibomiae.* B. Lesiones producidas por *P. meibomiae* en *Vigna* sp., proveniente de Adjuntas (50X). C. Lesiones tipo TAN sobre *P. lunatus* (30X). D. Uredosporas de *P. meibomiae,* provenientes de corte de uredo de *V. luteola* (400X). 74

Figura 16. Microscopía Electrónica de Rastreo para *P. meibomiae.* A. Uredospora en *L. purpureus* (3500X). B. Abertura de uredo, liberación de uredosporas y presencia de paráfasis en *L. purpureus* (500X). C. Distribución de uredos en el envés de la hoja de *L. purpureus* (75X). D. Ruptura de epidermis durante la liberación de uredosporas en *P. lunatus* (2000X). La flecha señala la paráfisis. 75

Figura 17. Microscopía Electrónica de Rastreo para *P. meibomiae.* A. Estructura citológica de *P. erosus* en tejido infectado y sano (100 X). B. Presencia de paráfisis y abertura de uredo en *P. erosus* (750 X). C. Abertura de uredo y liberación de uredosporas en *P. erosus* (1500 X). D. Ruptura de epidermis y presencia de paráfisis en uredo de *V. luteola* (1500 X). La flecha señala la paráfisis. 76

Figura 18. Gel de agarosa para la determinación de *Phakopsora meibomiae,* en el estudio de rango de hospederos, utilizando PCR con los iniciadores Pme1/Pme2. 1 = escalera (100 bp), 2 = *L. purpureus,* 3 = *P. lunatus*, 4 = *G. max*, 5 = *P. vulgaris*, 6 = *V. luteola*, 7 = *P. erosus*, 8 = *M. lathyroides*, 9 = *V. unguiculata,* 10 = *C. retusa,* 11 = *C. juncea,* 12 = *P. phaseoloides,* 13 = *M. pruriens,* 14 = *C. gladiata,* 15 = *C. brevidens.* La flecha indica los productos de amplificación de PCR en 338 bp. 79

Figura 19. Período de incubación y de latencia para *P. meibomiae* en 15 especies de leguminosas evaluadas bajo condiciones de vivero. 80

Figura 20. Uredos de *P. meibomiae* en tejido de hoja teñido con azul de algodón, durante el estudio de rango de hospederos. A. *Lablab purpureus* (200 X). B. *Phaseolus lunatus* (200 X). C. *Pachyrhizus erosus* (40 X). D. *Macroptilium lathyroides* (40 X). E. *Glycine max* Cultivar Williams (40 X). F. *Vigna luteola* (200 X). 83

Figura 21. Microscopía Electrónica de Rastreo para *P. meibomiae.* A. Distribución de los uredos en *P. vulgaris* (100 X). B. Liberación de uredosporas y presencia de paráfisis en *P. vulgaris* (500 X). C. Presencia de pubescencia y uredos en *M. lathyroides* (150 X). D. Liberación de uredosporas y presencia de paráfisis en uredo de *M. lathyroides* (750 X). E. Estructura del uredo, presentando paráfisis y uredosporas en *G. max* (750 X). F. Ruptura de epidermis y liberación de uredosporas en *G. max* (750 X). La flecha señala la paráfisis. ... 84

Figura 22. Árbol filogenético obtenido por el método Neighbor-Joining utilizando la prueba bootstrap con 1000 repeticiones, a través del análisis de la secuencia del rADN de ocho aislados de *Phakopsora* y especies relacionadas. 88

LISTA DE APÉNDICES

Apéndices **Páginas**

APÉNDICE 1
Monitoreos realizados en Puerto Rico durante 2006-2008. 115

APÉNDICE 2
Alineamiento múltiple para aislados de *P. meibomiae* utilizando el programa BioEdit, versión 7.0.4.1, a través del parámetro ClustalW 119

1. INTRODUCCIÓN

El cultivo de la soya, *Glycine max* (L.) Merrill, se produce comercialmente en más de 35 países alrededor del mundo, y es considerado la mayor fuente de aceite de semilla de todos los cultivos agrícolas en el mercado internacional (Anónimo 2001). Los altos niveles nutricionales encontrados en su semilla, además de sus propiedades medicinales, lo hacen una importante fuente alimenticia para el suplemento de productos primarios para humanos y animales (Shannon 2005). Su contenido de proteína, grasa y carbohidratos, en base a materia seca, oscila entre el 32 al 43.6%, 15.5 al 24.7% y 31.7 al 31.8%, respectivamente (Anónimo 2001). El centro de origen del cultivo de la soya se encuentra en el noreste de la China, en donde se la domesticó bajo la dinastía Shang hace 3000 años. Su producción se inició hace 2000 años en Japón, mientras que a inicios de 1765 se introdujo desde el continente asiático a Estados Unidos, en donde se la empezó a cultivar (Imazaki et al., 2006). A inicios del siglo XX la soya fue introducida a Sud América por medio de inmigrantes japoneses. La soya fue considerada un cultivo importante con la introducción de cultivares provenientes de Estados Unidos a Sud América, a mediados del siglo XX, incrementando su producción drásticamente (Imazaki et al., 2006).

El mayor productor de soya a nivel mundial es Estados Unidos con una producción de 72.9 millones de toneladas métricas (tm), correspondiente al 33%, seguido de Brasil, Argentina y China, con 61, 46.2 y 14 millones de tm, respectivamente (www.soystats.com 2008). La producción mundial en el 2008 fue de 220.9 millones de tm (www.soystats.com 2008).

En Puerto Rico su producción se estima en 700 hectáreas, localizadas en las áreas sur y noroeste, distribuidas en seis compañías dedicadas a la selección de líneas mejoradas

y producción de semilla para mejoramiento (Estévez, com. pers.). La producción de soya puede establecerse durante todo el año, debido a que las estaciones (especialmente el invierno) no son marcadas, lo que es una ventaja para las empresas productoras de semilla, que requieren de una producción constante durante todo el año.

La enfermedad más destructiva de la soya lo constituye la roya asiática, causada por el hongo *Phakopsora pachyrhizi* Sydow (Isard et al., 2006). Las pérdidas producidas por esta enfermedad pueden ir de 10 a 80%, reportándose pérdidas totales en prácticas de monocultivo (Levy 2005). La roya asiática fue reportada por primera vez en Japón en 1903, ocasionando grandes pérdidas en el continente asiático durante décadas. A finales de 1996 la roya asiática fue reportada en Uganda, siendo por primera vez descrita en el continente africano (Levy 2005). En el año 1994 la enfermedad fue reportada por primera vez en el hemisferio occidental en la isla de Hawaii (Pan et al., 2006). En el continente americano, *P. pachyrhizi* fue reportado por primera vez en Paraguay y Brasil en el 2001, distribuyéndose rápidamente por todo el continente, en el 2002 fue reportada en Argentina (Rossi 2003; Yorinori et al., 2005). Durante la temporada de siembra de soya del 2003, se localizó en la mayor parte de Brasil y Bolivia (Hartman 2004). Para este año, en Brasil, se estimaron pérdidas por 1.2 billones de dólares, de donde 500 millones fueron debido a pérdidas en la producción y 700 millones por el uso inadecuado de fungicidas (Posada et al., 2005; Posada-Buitrago y Frederick 2005). En agosto del 2004 se reportó en Colombia y Ecuador (Pan et al., 2006; Lianzan, com. pers.) y para el 10 de noviembre de este año, se reportó por primera vez en Louisiana, Estados Unidos (Pan et al., 2006). Para el año 2005, *P.*

pachyrhizi fue reportada en México (Cárcamo Rodríguez et al., 2006), siendo el primer reporte de la enfermedad en Centroamérica.

La presencia de la roya americana, *Phakopsora meibomiae,* se ha reportado en América Central, Sud América y el Caribe, en infecciones naturales en *Lablab purpureus* y otras leguminosas en Puerto Rico, México y Cuba, en 1913, 1917 y 1926, respectivamente (Bromfield 1884; Pivonia et al., 2004). Trabajos realizados en Puerto Rico, entre 1976 a 1979, informaron la presencia de infecciones naturales de roya en diferentes hospederos, identificando a su agente causal como *P. pachyrhizi* (Vakili 1979).

A través de pruebas moleculares, como la reacción en cadena de la polimerasa, es posible discriminar entre *P. pachyrhizi* y *P. meibomiae*, ya que morfológicamente sus estados asexuales son idénticos (Frederick et al., 2002).

El rango de temperatura óptimo para la infección de la roya se encuentra entre los 18 y 26.5^{o}C, con un mínimo de 6 a 7 horas de agua libre sobre el follaje (Melching et al., 1989; Villavicencio et al., 2007). El rango de temperatura diurna en Puerto Rico está entre los 24 a 27°C con una alta radiación solar. El promedio anual de precipitación de la isla es de 1780 mm, siendo los meses de diciembre a abril los más secos. Dadas las condiciones climáticas presentes en Puerto Rico, así como los hospederos alternos que se encuentran distribuidos en la isla, es importante determinar la distribución de la roya de la soya en forma natural y en lotes experimentales. La presencia de *P. pachyirhizi* en Puerto Rico, podría significar una fuerte amenaza para la producción local de soya, lo que causaría pérdidas en la producción e incremento en los costos de producción en las empresas productoras de semilla y siembras futuras que se pudieran implementar en la isla.

Los objetivos de la presente investigación fueron: 1) Determinar la presencia de *Phakopsora* en tres localidades de Puerto Rico, 2) Realizar monitoreos en la Cordillera Central de la isla, para determinar la infección natural producida por *P. meibomiae*, 3) Establecer el rango de hospederos para la roya americana de la soya, y 4) Caracterizar molecularmente aislados de *Phakopsora* provenientes de *L. purpureus.*

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Clasificación taxonómica de la "roya de la soya"

La enfermedad conocida como "roya" en el cultivo de la soya, es causada por dos especies de hongos: *Phakopsora meibomiae,* también conocida como "roya americana"; y, por *Phakopsora pachyrhizi*, denominada "roya asiática", ASR por sus siglas en inglés (Asian Soybean Rust) (Yorinori et al., 2005; Frederick et al., 2002; Villavicencio et al., 2007; Posada-Buitrago y Frederick 2005; Pivonia et al., 2004; Hartman et al., 2004).

Taxonómicamente la roya de la soya presenta la siguiente clasificación (Alexopoulos 1996; Cummins y Hiratsuka 2004; Hibbett et al., 2007):

Reino: Fungi

Subreino: Dikarya

Phylum: Basidiomycota

Subphylum: Puccioniomycotina

Clase: Pucciniomycetes

Orden: Pucciniales

Familia: Phakopsoraceae

Especies: *Phakopsora meibomiae* Arthur;

Phakopsora pachyrhizi H. Sydow & Sydow.

2.2. Etiología

Los hongos conocidos como royas, presentan cinco estados de desarrollo en secuencias regulares uno de otro (Alexopoulos 1996).

Estado 0: Espermacio producido en espermogonio e hifa receptora.

Estado I: Aeciosporas producidas en aecio.

Estado II: Uredosporas producidas en uredo.

Estado III: Teliosporas producidas en telia.

Estado IV: Basidiosporas producidas en promicelio.

En condiciones naturales la roya americana, así como la asiática, producen los estados II y III, no reportándose la presencia de basidiosporas (Cummins y Hiratsuka 2004; Pivonia et al., 2004; Posada-Buitrago y Frederick 2005; Sinclair et al., 1989; Ulloa y Hanlin 2006). La germinación de teliosporas, en *P. pachyrhizi,* se ha reportado bajo condiciones de laboratorio, sometiéndolas a ciclos de humectación y secado (entre 10 y 12) a temperatura ambiental. Las teliosporas en proceso de germinación se hincharon formando un basidio ligeramente curvado conteniendo de 1 a 4 esterigmas con basidiosporas. Los niveles más altos de germinación de teliosporas se observaron cuando se almacenaron a 5°C por un período de 5 a 6 meses, previa la ruptura de su dormancia (Saksirirat y Hoppe 1991).

2.2.1. Etiología de *Phakopsora meibomiae* (Arthur) Arthur

Sinónimos: *Physopella meibomiae* Arthur (1917), *Phakopsora crotalariae* Arthur (1917), *Phakopsora meibomiae* (Arthur) (1925), *Phakopsora diehlii* Cummins (1974), *Uredo vignae* Bresadola (1891), *Aecidium crotalariicola* P. Hennings (1899), *Uredo aeschynomenes* Arthur (1905), *Physopella aeschynomenes* (Arthur) Arthur (1907), *Uredo teramni* Mayor (1913), *Uredo concors* Arthur (1915), *Phakopsora aeschynomenes* (Arthur)

Arthur (1917), *Physopella concors* (Arthur) Arthur (1917), *Phakopsora vignae* (Bresadola) Arthur (1917), *Phakopsora psoraleae* Jackson & Holway (1931), *Phakopsora vignae* Arthur ex Cummins (1943). Anamorfo: *Malupa vignae* (Bresadola) Ono.

Las fases de espermogonio (picnio) y aecio no se han registrado (Ono et al., 1992; Sinclair et al., 1989). El soro anamorfo, conocido como uredo, uredinia o uredio, es ampígeo, diminuto. Se presenta formando grupos o en forma dispersa en lesiones descoloridas, de origen subepidermal. A su alrededor se encuentra una paráfisis constituida por pseudoparenquima. La apertura del uredo, para la liberación de las uredosporas, se ubica en su parte central. Su contextura es de tipo pulverulento, de coloración café-canela pálido, paráfisis cilíndrica a clavata; con una dimensión de 15 a 55 x 6 a 12 µm, dependiendo del hospedero, con paredes apicales gruesas y laterales delgadas (Ono et al., 1992).

Las esporas son anamorfas, sésiles, conocidas como uredosporas o urediniosporas, de tipo ovoides a elipsoidales, de color café-amarillento a hialino. Su tamaño varía de 16 a 31 x 12 a 24 µm, y la pared celular es de 1 µm de grosor. La apertura para su germinación se localiza mayormente sobre la línea ecuatorial. La telia, ubicada entremezclada con los uredos, es de origen subepidermal, de coloración café-castaño a café-chocolate. Presenta una capa de esporas café-castaño de 1 a 4. Las teliosporas, también conocidas como teleutosporas, presentan una coloración café-amarillento a café-castaño ligero, con pared celular de 1.5 a 2 µm de grosor. Presentan una forma subglobosa, oblonga a elipsoidal, formadas en filas o dispersas, con una longitud de 12 a 26 x 6 a 12 µm, dependiendo del hospedero y de los factores climáticos en los cuales se desarrolla (Ono et al., 1992).

2.2.2. Etiología de *Phakopsora pachyrhizi* H. Sydow & Sydow

Sinónimos: *Phakopsora sojae* Fujikuro (1926), *Phakopsora calothea* H. Sydow (1931), *Phakopsora sojae* Sawada (1931), *Physopella pachyrhizi* (H. Sydow & Sydow) Azbukina (1970), *Uredo sojae* P. Hennings (1903), *Uredo erythrinae* P. Hennings (1908), *Phakopsora erythrinae* Gäumann (1922). Anamorfo: *Malupa sojae* (P. Hennings) Ono.

La fase de espermogonio no se ha registrado. La producción de uredo es en forma dispersa o en grupos sobre lesiones descoloridas. De tamaño diminuto, comúnmente de tipo hipófilo y de origen subepidermal. La paráfisis del himenio encierra al uredo y es un pseudoparénquima peridiode de color café-canela y de aspecto pulverulento. Presenta paráfisis cilíndrica a clavata de una longitud que varía de 25 a 50 µm por 6 a 14 µm, de coloración café-amarillento pálido, es apical ligeramente conspicua y de un tamaño de 18 µm. Las dimensiones de las uredosporas, formadas en el uredo, pueden variar de 18 a 34 µm por 15 a 24 µm y el grosor de la pared celular es de 1 µm. Su forma puede ir de ovoide a elipsoidal y una coloración café-amarillento pálida. La ubicación de la abertura para su germinación se localiza en la zona ecuatorial o sobre ella (Ono et al., 1992).

La producción de telia ocurre a la par con la de los uredos, a menudo encontrándose entremezcladas. La telia es hipófilo, de coloración que puede variar de café-castaño a café-chocolate. Es de origen subepidermal con una producción de 2 a 7 esporas. Las teliosporas son uni-celulares con una distribución irregular. Presentan una forma angularmente subglobosa, de oblonga a elipsoidal con paredes celulares de 1 µm de grosor. Su dimensión puede ir de 15 a 26 x 6 a 12 µm de una coloración café-amarillenta pálida (Ono et al., 1992).

2.3. Sintomatología

El síntoma característico de la roya de la soya es la producción de lesiones conteniendo de uno a varios uredos globosos, ostiolados, que emergen del tejido vegetal. Estas lesiones pueden presentar un tono bronceado a café oscuro, o pueden ser café-rojizo (Sinclair el al., 1989).

Los síntomas iniciales de la enfermedad se caracterizan por la presencia de lesiones pequeñas y húmedas que incrementan de tamaño y cambian de coloración de grisáceo hasta un tono bronceado o café (Sinclair et al., 1989). Las lesiones son poligonales y varían en tamaño de 2 a 5 mm^2, restringidas a los márgenes de las nervaduras de las hojas (Monte et al., 2003). Las lesiones se observan, en mayor abundancia, en las hojas de la planta (especialmente en el envés), sin embargo se pueden localizar en pecíolos, vainas y tallos. A medida que el estado de la infección avanza, el número de uredos por lesión incrementa, produciéndose la expulsión de las uredosporas a través del poro central del uredo, de esta forma se producen grupos de esporas que se ubican sobre y alrededor del uredo. El cambio de coloración de la lesión depende de la etapa de infección y del genotipo en donde se efectúa la interacción, pudiendo variar desde un color verde-grisáceo hasta un tono café-oscuro (Sinclair et al., 1989). Las reacciones ocasionadas por la "roya de la soya" pueden ser clasificadas en tres tipos (Bonde et al., 2006; Bromfield 1984):

a) RB. Lesiones de coloración café-rojizo, en donde se alojan un reducido número de uredos y poca esporulación (Interacción semi compatible).

b) TAN. Lesiones de coloración bronceado, en donde se ubican un gran número de uredos y abundante esporulación (Interacción compatible).

c) Inmune. Síntomas no visibles de infección (Incompatible).

Con el incremento de la severidad de la enfermedad se produce defoliación prematura y la maduración temprana de la planta (Monte et al., 2003). Sus síntomas pueden ser confundidos con la pústula bacteriana, producida por *Xanthomonas campestris* p.v. *glycines,* especialmente en los primeros estados de desarrollo de la enfermedad. Existen dos características fundamentales que permiten distinguirlas (Vakili 1976):

a) El uredo de la roya se abre para la liberación de las uredosporas, a través del ostiolo, mientras que la pústula de la bacteria no presenta la apertura de liberación y de vez en cuando puede fisurarse.

b) Existe formación de grupos de uredosporas en la parte apical del uredo, mientras que las pústulas bacterianas presentan tejido necrótico a través de la fisura formada.

2.4. Ciclo de vida y epidemiología.

Los estudios epidemiológicos y ciclo biológico de la roya han sido estudiados en diferentes cultivares de soya y diferentes hospederos, a partir de aislados de *P. pachyrhizi* provenientes de localidades ubicadas en el hemisferio oriental, desconociéndose este tipo de estudios para *P. meibomiae* (Hartman et al., 2004).

Para que un modelo epidemiológico sea desarrollado exitosamente, requiere ser alimentado con información intrínseca al patógeno y al hospedero, a través de los diferentes factores epidemiológicos involucrados en el proceso de infección, como lo son: la eficiencia de la infección, el período de latencia, la producción de esporas, períodos infecciosos, entre otros. Diferentes experimentos debidamente controlados, han sido

desarrollados para determinar los componentes epidémicos, y de esa forma presentar predicciones válidas en el progreso de la epidemia (Pivonia y Yang 2006).

En Estados Unidos, se han desarrollado diferentes modelos para predecir el movimiento de la roya asiática de la soya hacia Norteamérica. Los modelos desarrollados por la Universidad Estatal de Pennsylvania (IAMS: Integrated Aerobiology Modeling System), por los laboratorios de recursos aéreos de la NOAA (modelo de transporte atmosférico HYPSLIT), y por las Universidades de Iowa y St. Louis (a través de modelos climatológicos), permiten conocer en tiempo real la localización de la enfermedad en los diferentes estados, y predecir su diseminación a corto plazo (Isard y Russo 2007).

Dada la complejidad de los factores involucrados en el desarrollo epidemiológico de la enfermedad, muchos aspectos de este patosistema no están del todo claros. Temperaturas óptimas de germinación entre 18 y 25°C, con períodos de humedad de 10 a 12 horas, permiten un exitoso establecimiento de la enfermedad y un rápido desarrollo de la epidemia (Del Ponte et al., 2006).

La germinación de la espora, formación del apresorio y la penetración, son las primeras etapas que el patógeno debe desarrollar para establecer la infección en el hospedero. Estas etapas, además de la colonización y la producción de esporas, están influenciadas por factores relacionados con el patógeno y el hospedero (factores bióticos) y por factores abióticos, relacionados con el ambiente (Bromfield 1984).

2.4.1. Germinación de uredosporas

La germinación de la espora es un proceso esencial durante el ciclo de vida de todos los hongos filamentosos. En una primera etapa, las condiciones ambientales apropiadas rompen la dormancia de la espora, posteriormente ocurre una reacción isotrópica en donde existe absorción de agua y activación de numerosos procesos metabólicos, para finalmente formar el tubo germinativo (a través del crecimiento polarizado de la espora), del cual se origina el micelio (Posada-Buitrago y Frederick 2005).

Una vez que las plantas se inoculan y se incuban en cámara húmeda, la germinación de las uredosporas ocurre entre una a dos hora después de su inoculación. El apresorio empieza a formarse a partir de la segunda hora, y luego de las 5 horas algunos de ellos se expanden y presentan tamaños cercanos al de su espora parental. Mediciones realizadas en 39 apresorios del aislado Taiwan 72-1 completamente desarrollados, presentaron valores promedios de 20 µm de largo x 17 µm de ancho (Bonde et al., 1976).

El rango óptimo de temperatura para la germinación de uredosporas está entre 15 a 25°C, observándose una inhibición en el proceso a temperaturas inferiores a los 8°C y superiores a los 28°C (Bromfield 1984). La presencia de una lámina de agua libre sobre la superficie de la planta es indispensable para el proceso de germinación y penetración (Sinclair et al., 1989). El tamaño del tubo germinativo varía de 5 a 400 µm, éste posteriormente formará el apresorio en su parte terminal (Monte et al., 2003). La radiación solar influye directamente en el proceso de germinación, presentando total inhibición en la germinación de las uredosporas a una exposición igual o superior a 27.3 MJ/m^2 (Isard et al., 2006).

Estudios realizados en Australia con las líneas Wills, PI 200492, Tainung 3, Tainung 4, PI 224268, PI 227687 y HY 2217, demostraron que tres horas después de la inoculación (HDI), el porcentaje de germinación de uredosporas fue del 33.8%, con un incremento progresivo en dicho porcentaje hasta llegar a las 120 HDI con 65.3%. La longitud del tubo germinativo varió de 36.9 µm a las 3 HDI, hasta llegar a los 110.6 µm a las 120 HDI (McLean y Byth 1981).

2.4.2. Formación del apresorio

La formación del apresorio se produce sobre células epidermales, a pesar de que puede presentarse a nivel del estoma (Monte et al., 2003). Los rangos óptimos de temperatura para su formación van de 21 a 28°C, encontrándose desarrollo de apresorio a temperaturas entre 15 a 30°C. A 25°C, el desarrollo total de esta estructura se observa en un período de 2.5 a 3 horas. El rango óptimo de pH para el desarrollo del apresorio está entre 4.4 a 8.0, siendo favorable la presencia de luz para su formación (Bromfield 1984).

Existe una relación directa entre el porcentaje de germinación de uredosporas y el porcentaje de formación de apresorio en dichas uredosporas. En Australia, se determinó un coeficiente de correlación de 0.95, para estas dos variables, al analizar el estudio de penetración y post penetración de uredosporas de *P. pachyrhizi* en siete líneas de soya (McLean y Byth 1981).

2.4.3. Penetración y colonización

La penetración puede ser directa o a través de los estomas. Son pocas las especies de royas que pueden penetrar directamente, a través de la cutícula de la hoja, entre estas se encuentran: *P. pachyrhizi, Puccinia psidii, Ravenelia humphreyana* y *Physopella zeae* (Bonde et al., 1976). Cuando el apresorio se desarrolla sobre las células epidermales, este penetra directamente atravesando la cutícula y desarrollando hifas con crecimiento intercelular. Cuando el apresorio se forma a nivel estomatal, la hifa penetra a través de una de sus células guardas (Monte et al., 2003; Sinclair et al., 1989). Seis horas después de la deposición de la espora puede ocurrir infección a una temperatura entre 20 a 25°C (Sinclair et al., 1989). Veinte horas después de la inoculación, la hifa se observa en los espacios intercelulares en las células empalizadas y esponjosas del mesófilo de la hoja inoculada (Marchetti et al., 1975).

Entre tres a seis horas después de la inoculación comienza la penetración, incrementando su porcentaje entre las 6 y las 48 horas. Posterior a las 48 horas, el incremento en el porcentaje de penetración es mínimo (McLean y Byth 1981).

2.4.4. Desarrollo uredinal y esporulación

Cinco a ocho días después de la infección producida por la uredospora, se produce la formación del uredo. La producción de uredosporas comienza a partir del noveno día de infección y continúa hasta tres semanas después (Monte et al., 2003). Para la formación del uredo se requieren 12 horas de luz a una temperatura promedio de 25°C, y 12 horas de

oscuridad a temperatura de 20°C. A temperaturas inferiores a 20°C, durante 12 horas de luz y 15°C durante 12 horas de oscuridad, no se presenta formación de uredo (Bromfield 1984).

La maduración del uredo ocurre entre los 6 a 7 días después de la inoculación, a una temperatura de 22°C, formando estructuras de 83 x 309 a 365 µm. Durante los 7 a 9 días ocurre la diferenciación de las uredosporas, y a partir del noveno día se produce la erupción del uredo, a través de las células epidermales de la planta, con la consiguiente liberación de uredosporas, por medio del poro y de las paráfisis de tipo clavata (Marchetti et al., 1975).

En el envés de la hoja se puede observar formación continua de uredos hasta 42 días después de la infección, existiendo un incremento representativo en su número conforme incrementa el tiempo (Bromfield 1984).

2.4.5. Formación de teliosporas

La formación de teliosporas se produce bajo ciertas condiciones particulares (Vakili et al., 1976). Se han observado reportes sobre la formación natural de teliosporas de *P. meibomiae* en hospederos provenientes de diferentes países del hemisferio occidental. Entre las especies observadas se encuentran: *Meibomia supina* y *Lablab purpureus* en Puerto Rico, *Canavalia villosa* en Guatemala, *Glycine max, Glycine wightii, Phaseolus lunatus, Phaseolus vulgaris, L. purpureus* y *Rhynchosia minima* en Brasil (Bromfield 1984; Yeh et al., 1981).

Para el caso de *P. pachyrhizi,* se ha observado formación de telia en hojas de soya cuando la temperatura es inferior a los 20°C por más de 15 horas por día, y una temperatura promedio inferior a los 25°C durante mínimo 15 días (Bromfield 1984; Yeh et al., 1981).

Bajo condiciones controladas, en invernadero, se ha logrado producir telia en soya y otras leguminosas como *Pachyrhizus erosus* (30 días después de la inoculación), *Glycine canescens, G. javanica* y *G. wightii* (35 días después de la inoculación), *Cajanus cajan, Phaseolus lunatus, P. vulgaris, Rhynchosia minima* y *Vigna unguiculata* (50 a 60 días después de la inoculación). Esto sometido a una humedad relativa del 60 al 100% con 12 horas de fotoperiodo, a una intensidad de 2.060 lux, y una temperatura máxima de 24 $\pm$ 1°C durante el día, y 15 $\pm$ 1°C durante la noche (Bromfield 1984).

Posterior a la formación del uredo se produce la formación de la telia y de las teliosporas. La telia y las teliosporas se localizan en la periferia de la lesión o alrededor del uredo, iniciando en las hojas inferiores para posteriormente ubicarse en las jóvenes (Yeh et al., 1981). Las teliosporas son unicelulares, de tipo oblongo a elíptico o sub globoso, presentando un único poro apical, a través del cual germina y produce la basidia (Sousa et al., 2006).

Trabajos realizados en Brasil con un aislado proveniente de la zona de Mato Grosso e inoculado sobre soya, cultivares Pintado y Uirapuru, 25 días después de la incubación a 15°C, presentaron formación de soros teliales que variaron en longitud promedio entre 127 a 77 µm de largo, y 41 a 35 µm de ancho. Las teliosporas formadas bajo estas condiciones presentaron un largo promedio de 6.87 a 7.02 µm, y un ancho promedio que varió de 14.91 a 10.02 µm (Sousa et al., 2006).

2.5. Rango de hospederos

Para el caso de la roya asiática de la soya, se ha observado infección natural en 31 especies correspondientes a 17 géneros de leguminosas, mientras que bajo condiciones controladas, se ha obtenido infección en 60 especies en 26 géneros diferentes (Frederick et al., 2002; Hartman et al., 2005; Rytter et al., 1984). Para *P. meibomiae,* se han identificado 42 especies en 19 géneros de leguminosas infectados naturalmente, y bajo condiciones controladas se han reportado 18 especies adicionales infectadas en 12 géneros diferentes (Frederick et al., 2002).

Los especímenes analizados en donde se encontró infección producida por *P. meibomiae* fueron: *Aeschynomene americana* L., *Aeschynomene histrix* Poir., *Aeschynomene sp*., *Calopogonium* sp., *Canavalia villosa* Brenth., *Crotalaria anagyroides* H.B.K., *C. grantiana* Harv., *C. incana* L., *C. juncea* L., *C. paulina* Schrank., *Crotalaria* sp., *Desmodium discolor* Vog., *D. incanum* DC., *D. intortum* (Mill.) Urban., *D. tortuosum* (Sw.) DC., *D. triflorum* (L.) DC., *Desmodium* sp., *Eriosema crinitum* (H.B.K.) DC., *Eriosema* sp., *Eritrina americana* Miller., *E. berteroana* Urban., *Glycine max* (L.) Merr., *Lablab purpureus* (L.) Sweet., *Macroptilium atropurpureum* (DC.) Urban., *M. lathyroides* (L.) Urban., *Neonotonia wightii* (Arnott) Lackey., *Pachyrhizus erosus* (L.) Urban., *Phaseolus bracteatus* Spreng., *P. coccineus* L., *P. lunatus, P. macrolepsis* Piper., *P. vulgaris* L., *Phaseolus* sp., *Pisum sativum* L., *Psoralea glandulosa* L., *P. lasiostachya* Vog., *Rhynchosia* sp., *Teramnus* sp., *Vigna marina* (Burm.) Merr., *V. mungo* (L.) Hepper y *V. wilmanii,* provenientes de Centro y Sud América (Ono et al., 1992).

El primero reporte sobre infección de roya en soya, para el hemisferio occidental, fue en Puerto Rico en 1976, observado en lotes experimentales en la localidad de Adjuntas, identificando a su agente causal como *P. pachyrhizi* (Vakili et al., 1976; Melching et al., 1989). A pesar de su alta severidad, el número de uredosporas fue menor a los reportados en aislados provenientes del hemisferio oriental (Bonde et al., 2006). Adicionalmente, estudios de isoenzimas realizados con uredosporas de 11 aislados de *P. pachyrhizi* de Asia y Australia, y cuatro aislados provenientes del continente Americano (3 de Brasil y uno de Puerto Rico), demostraron que el patrón de bandas para las enzimas fosfatasa ácida (ACP), diafarasa (DIA), esterasa (EST), glucosa-6-fosfato dehidrogenasa (G6PDH), glucosa fosfato isomerasa (GPI), malato dehidrogenasa (MDH), manosa fosfato isomerasa (MPI), peptidasa (PEP) y fosfogluconato dehidrogenasa (PGD) fueron diferentes para los aislados del hemisferio Oriental (Asia y Australia), comparados con los aislados de América (Bonde et al., 1988).

Taxonómicamente, las estructuras que permiten realizar la diferenciación entre especies de roya son la telia y las teliosporas, por lo que la observación de los uredos y uredosporas no pueden ser usadas como criterio de clasificación y discriminación (Yeh et al., 1981 y Sousa et al., 2006). En el año 2002, se desarrollaron iniciadores específicos para *P. pachyrhizi* y *P. meibomiae,* a partir de los espaciadores de transcripción internos del ADN ribosomal (ITS), determinando un 80% de similaridad en la secuencia de los nucleótidos de las dos especies. Por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se pudo discriminar entre estas dos especies (Frederick et al., 2002).

En Puerto Rico, las investigaciones realizadas durante la década de los 70´s, incluyeron colecciones de hospederos alternos a la soya en diferentes localidades de la isla. Se determinó presencia de roya en infecciones naturales de dichos hospederos, reportando erróneamente a la especie como *P. pachyrhizi*, sin embargo en esa época no se conocía la prueba de la reacción en cadena de la polimerasa. Durante dicha colección se encontró infección de roya en hospederos como *Lablab purpureus, Vigna luteola, Teramnus uncinatus, Phaseolus lunatus, P. vulgaris, Crotalaria pallida* y *Macroptilium lathyroides.* Las leguminosas colectadas estuvieron localizadas a una altitud entre los 300 a 820 metros sobre el nivel del mar en localidades ubicadas en el interior de Puerto Rico (Vakili 1979).

2.6. Control biológico y genético

Los estudios realizados en el manejo de la roya de la soya han sido enfocados a la roya asiática, *P. pachyrhizi,* no existiendo información para la roya americana, *P. meibomiae,* debido a su poco impacto en la soya y otras leguminosas comestibles, sin embargo es una especie que necesita mayor investigación. La mayor parte de estudios han sido realizados en el área de la genética y del control químico. El manejo del cultivo difiere de la zona de siembra, en donde se promueve prácticas que optimicen los rendimientos (Monte et al., 2003).

El estudio de agentes biológicos como hongos, bacterias, virus y micoplasmas ha recibido un gran impulso durante los últimos años. *Darluca filum* es reportado micoparásito de *P. elettariae*, no existiendo control sobre *P. pachyrhizi.* Se reportó parasitismo de *P. pachyrhizi* por dos especies del basidiomicete (Urediniomycete) *Tuberculina* en Tailandia

(Lutz et al., 2004). Bacterias del género *Bacillus* están relacionadas con lisis e inhibición en la germinación de uredosporas de diferentes tipos de royas en cereales, observándose este fenómeno sobre *P. pachyrhizi* en Tailandia (Bromfield 1984).

La resistencia genética puede ser clasificada como resistencia vertical y resistencia horizontal. La resistencia vertical, conocida como resistencia cualitativa, específica o diferencial, es aquella que es efectiva a un número reducido de razas fisiológicas del patógeno y es gobernada por uno o pocos genes (resistencia monogénica u oligogénica). La resistencia vertical es capaz de evitar en forma efectiva el establecimiento inicial del patógeno y de esa forma inhibir el desarrollo de la epidemia (Meirelles 2007; Agrios 2005). La resistencia horizontal es también conocida como resistencia general, cuantitativa, no específica, de la planta adulta, durable o de campo. Este tipo de resistencia está gobernada por una gran cantidad de genes, por lo que se la conoce como resistencia poligénica. Estos genes gobiernan una serie de procesos metabólicos en la planta, relacionados con procesos bioquímicos de defensa (Agrios 2005).

Para la identificación de fuentes de resistencia (para la roya asiática de la soya) se han realizado diferentes estudios con un gran número de accesiones de soya, en países en donde este patógeno es endémico, identificándose un reducido número de fuentes de resistencia (McLean y Byth 1980). Los reportes indican que los genotipos estudiados de *G. max,* presentan una reacción diferencial frente a la inoculación de diferentes aislados de *P. pachyrhizi* (Hartwig 1986).

Durante 1975, la unidad de investigación para la producción de soya del departamento de agricultura de Estados Unidos (USDA-ARS), conjuntamente con el centro

de investigación y desarrollo vegetal de Asia (AVRDC), realizaron evaluaciones en 1080 líneas de soya en Shanhua, Taiwan, de las cuales las líneas PI 60273, PI 62204, PI 90406. PI 94159, PI 159322, PI 181561, PI 230970, PI 230971 y PI 371609 resultaron moderadamente resistentes a *P. pachyrhizi* (Hartwig y Bromfield 1983; Bromfield y Hartwig 1980).

En los laboratorios de investigación de enfermedades de plantas del Departamento de Agricultura de Estados Unidos (PDRL-USDA) en Frederick, Md, se seleccionaron siete de estas nueve líneas, y se realizaron estudios con cuatro aislados provenientes de Asia y Australia. Las líneas PI 230970 y PI 230971 fueron resistentes a los aislados Australia-72-1, India-73-1, Taiwan-72-1 y Filipinas-77-1, mientras que las cinco restantes líneas resultaron susceptibles a dichos aislados (Hartwig y Bromfield 1980).

Estudios de segregación con las líneas PI 230970 y PI 230971, como parentales, determinaron la presencia de un gen simple dominante que confiere resistencia a la roya. El gen se denominó *Rpp* (Hartwig y Bromfield 1980; Hartman et al., 1992). Al momento, se han identificado cuatro genes simples dominantes que confieren resistencia a *P. pachyrhizi*: *Rpp1, Rpp2, Rpp3* y *Rpp4* en las líneas PI 200492 (cultivar Komata), PI 230970, PI 462312 (cultivar Ankur) y PI 459025 (cultivar Bing Nan), respectivamente (Bonde et al., 2006; Hartman et al., 2005). El uso de genes simples como fuente de resistencia no es durable y el uso de estas fuentes no ha mostrado eficacia. La accesión PI 230970 mostró resistencia en evaluaciones en campo durante 1971 a 1973, mientras que para 1978 se observaron lesiones tipo TAN, muestras claras de una reacción suceptible (Hatman et al., 2005). Las variedades

comerciales existentes son altamente susceptibles, reportándose pérdidas en campo superiores al 40% (Kawuki et al., 2004).

La reacción diferencial de líneas genéticas en la interacción con diferentes aislados de *P. pachyrhizi,* también está presente en *Phaseolus vulgaris*. En un estudio realizado con 16 cultivares y 6 aislados de roya asiática de la soya, procedentes de Sud América, Asia y África, se observó que el cultivar Compuesto Negro Chimaltenango (CNC) presentó la mayor resistencia a los 6 aislados, mientras que México 309 fue altamente susceptible, demostrando la presencia de fuentes de resistencia a *P. pachyrhizi* en CNC (Miles et al., 2007; Pastor-Corrales y Frederick 2008).

2.7. Control químico

El uso de fungicidas es la estrategia costo-efectiva más eficiente para el control de la roya asiática. La toma de decisión sobre el momento de la aplicación minimiza el impacto negativo de esta enfermedad. En Estados Unidos, durante el 2005 al 2006, se estimó un ahorro de 600 millones de dólares en aplicaciones innecesarias de fungicidas, debido al diagnóstico y monitoreo oportuno de la enfermedad (Sikora y Hershman 2008; Yang 2008).

Durante la siembra del 2002 al 2003, en el 95% del área de producción de soya de Brasil, se reportó presencia de *P. pachyrhizi,* estimando pérdidas de 3.4 millones de toneladas equivalentes a 500 millones de dólares, y 700 millones en pérdidas ocasionadas por la utilización inadecuada de fungicidas (Livingston et al., 2004; Posada et al., 2005; Posada-Buitrago y Frederick 2005). Para la época 2003 al 2004, el costo relacionado al

control químico de la roya asiática en Brasil, alcanzó el billón de dólares (Dorrance et al. 2008).

Las pérdidas proyectadas en la producción de soya en Norte América, debido al ingreso de la roya asiática, se estimaron en al menos 10% para las regiones comprendidas en la región centro oeste y noreste de Estados Unidos y Canadá. Para la región comprendida entre el delta del Mississippi y los estados de la región sureste de Estados Unidos, las pérdidas se estimaron en al menos 50%, mientras que en regiones de alta presión para el establecimiento de la enfermedad, a lo largo y ancho de Estados Unidos, las pérdidas proyectadas exceden el 80%, en ausencia de prácticas adecuadas de control (Dorrance et al. 2008).

Los costos en el control de la roya, para Estados Unidos, fluctúan entre 25 a 85 USD/ha/aplicación, por lo que su control debe optimizarse para que su retorno económico sea el máximo. Las aplicaciones de fungicidas deben realizarse en los estados iniciales de la enfermedad, cuando su incidencia sea menor al 5% en hojas inferiores (Dorrance et al. 2008).

Los fungicidas utilizados para el control de la roya se clasifican en protectantes y sistémicos (Tenuta et al., 2008). Los fungicidas protectantes actúan contra estructuras fungosas que se ubican sobre la superficie foliar de la planta hospedera, especialmente antes y durante la germinación de las esporas. Cuando el patógeno ha penetrado la epidermis del hospedero, queda fuera del alcance de estos productos, por lo que no pueden erradicar una infección ya existente (Schwinn y Margot 1991). Los productos protectantes, para ser efectivos, requieren de una cobertura total del follaje o zona de protección para

evitar puntos de penetración por parte del patógeno. En la práctica es imposible o muy difícil de alcanzar aún con el mejor equipo de aplicación (Cremlyn 1990).

Fungicida sistémico es aquel que al ser absorbido y transferido al interior de la planta la protege del ataque de hongos patógenos, limitando o erradicando una infección existente. Son conocidos como quimioterapéuticos vegetales (Cremlyn 1990). Para que un fungicida sea considerado sistémico, debe sobrepasar diferentes barreras físicas y bioquímicas en el hospedero y en el patógeno. Entre estas barreras se encuentran la cutícula de la planta y sus células subcuticulares, metabolitos del hospedero, procesos de adsorción durante la traslocación de los nutrientes; y, barreras relacionadas con el patógeno, como su membrana celular y diferentes procesos metabólicos. El nivel de movimiento del fungicida en la planta se relaciona con sus características físicas y químicas, tipo de cultivo al que va dirigido, su estado de desarrollo, técnica de aplicación y el medio ambiente (Sbragia 1975).

Diferentes trabajos de validación de fungicidas, en el control de la roya asiática, se han realizado en Asia, África y recientemente en Sud América. Los primeros estudios desarrollados en Asia, demostraron que mancozeb fue efectivo en el combate de la enfermedad (Monte el al., 2005). Con la diseminación de la roya en África y América, se han evaluado diferentes principios activos, dosis óptima para su control, número y hora de aplicación, utilización de coadyuvantes en la mezcla del fungicida y la persistencia de los diferentes fungicidas (Levy 2005).

Experimentos desarrollados en Zimbabue, a finales de la década de los 90´s, demostraron que tres aplicaciones durante el ciclo de cultivo fueron suficientes para el control de la roya. La primera se efectúo al inicio de la floración o 50 días después de la

siembra, mientras que la segunda y tercera aplicaciones se realizaron a los 70 y 90 días después de la siembra; mientras que en baja presión de la enfermedad, la utilización de dos aplicaciones fue suficiente. Los fungicidas que demostraron eficiencia durante estos experimentos fueron Carbendazim + flusilazol y triadimenol (Miles et al., 2003; Levy 2005).

Nuevos ingredientes activos, pertenecientes a las familias de los triazoles y estrobilurinas, han sido evaluados en recientes estudios en Sud América y África. Los triazoles tebuconazol y tetraconazol, las estrobilurinas azoxystrobin y pyraclostrobin, y las mezclas pyraclostrobin + boscalid y trifloxystrobin + propiconazol, han demostrado eficacia en su control. En Brasil, principios activos como epoxiconazol, cyproconazol y metconazol, pertenecientes a la familia de los triazoles, están disponibles comercialmente y han demostrado eficacia en el control cuando se utilizan mezclados con estrobilurinas (Miles et al., 2003; Miles el al., 2005; Godoy y Canteri 2004; Navarini 2008).

Los estudios realizados sobre control químico indican que para minimizar pérdidas en la producción es necesaria la prevención de la infección durante los estados reproductivos de la soya (Levy 2005). Países de Asia, África y América, han realizado diferentes estudios de eficacia de fungicidas, utilizando productos protectantes y sistémicos (Cuadro 1).

Chlorothalonil actúa exclusivamente como un inhibidor de la germinación de esporas, mientras que los fungicidas que pertenecen a la clase química de las estrobilurinas tienen la habilidad de inhibir la germinación de las esporas y el proceso de penetración. Los fungicidas del grupo de los triazoles, son los únicos capaces de inhibir el establecimiento

del patógeno durante los procesos de post-infección, reduciendo activamente la infección y producción de esporas (Navarini 2008; Tenuta et al., 2008).

En términos generales, de una a dos aplicaciones de fungicidas durante la etapa reproductiva, son adecuadas económicamente para el combate de la enfermedad. Trabajos realizados en Estados Unidos demuestran que una tercera aplicación no fue económicamente rentable. La primera aplicación se recomienda realizarla con un triazol, o con una mezcla de dos ingredientes activos en tanque o en formulación (triazol, estrobilurina, carboxamida, cloronitrilo) (Tenuta et al., 2008).

El problema más serio relacionado con el uso indiscriminado de fungicidas lo constituye el surgimiento de estirpes resistentes, lo que conlleva deficiencias en el control de la enfermedad y el retiro de estos productos del mercado. Enfermedades policíclicas, como lo es la roya de la soya, tiene una mayor probabilidad de generar resistencia a fungicidas, debido a la gran cantidad de esporas que produce durante la estación del cultivo (Bradley 2008; Brent y Hollomon 2007).

La utilización de fungicidas en aplicaciones foliares, alternando los grupos químicos (de acuerdo a su modo de acción) es una de las estrategias utilizadas para reducir la probabilidad de generar resistencia, al igual que el uso de mezclas de fungicidas con diferente modo de acción (Galloway, J. 2008).

Cuadro 1. Clasificación de los principales fungicidas utilizados para el control de la roya de la soya.

Ingrediente Activo	Grupo Químico	Familia Química	Modo de acción	Países en donde se evaluó
Triadimefon	IDM	Triazol	Inhibición del ergosterol	India, Japón, Filipinas, Taiwan, Tailandia
Thiabendazol	Methyl Benzimidazol Carbamato (MBC)	Benzimidazol	Ensamble de la ß-tubulina durante mitosis	Tailandia
Chlorothalonil	Cloronitrilo	Cloronitrilo	Multi sitio	Brasil, India, Paraguay
Mancozeb	Dithiocarbamatos	Dithiocarbamatos	Multi sitio	Australia, China, India, Filipinas, Paraguay, Taiwan
Maneb	Dithiocarbamatos	Dithiocarbamatos		
Zineb	Dithiocarbamatos	Dithiocarbamatos		
Oxycarboxin	Carboxamida	Carboxamida	Respiración mitocondrial en complejo II	India, Taiwan, Tailandia
Hexaconazol	IDM	Triazol	Inhibición del ergosterol	India
Propiconazol	IDM	Triazol	Inhibición del ergosterol	Brasil, India, Paraguay
Difenoconazol	IDM	Triazol	Inhibición del ergosterol	India, Sud África, Zimbabue
Tridiamenol	IDM	Triazol	Inhibición del ergosterol	India, Sud África, Zimbabue
Flusilazole + Carbendazim	IDM + MBC	Triazol + Benzimidazol	Inhibición del ergosterol + Ensamble de la ß-tubulina durante mitosis	Sud África, Zimbabue
Tebuconazol	IDM	Triazol	Inhibición del ergosterol	Paraguay, Zimbabue
Azoxystrobin	QoI	Methoxy-acrilado	Respiración mitocondrial en complejo III	Brasil, Paraguay
Pyraclostrobin	QoI	Methoxy-carbamatos	Respiración mitocondrial en complejo III	Paraguay
Boscalid	Carboxamida	Pyridina-carboxamida	Respiración mitocondrial en complejo II	Paraguay
Pyraclostrobin + Boscalid	QoI + Carboxamida	Methoxy-carbamatos + Pyridina-carboxamida	Respiración mitocondrial en complejo III + Respiración mitocondrial en complejo II	Paraguay
Trifloxystrobin + Propiconazol	QoI + IDM	Oximino acetatos + triazol	Respiración mitocondrial en complejo III + Inhibición del ergosterol	Paraguay
Fenbuconazol	IDM	Triazol	Inhibición del ergosterol	Paraguay
Myclobutanil	IDM	Triazol	Inhibición del ergosterol	Paraguay

Fuente: Monte et al., 2003; FRAC 2007.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Lotes experimentales

La determinación de la infección natural de la roya en el cultivo de soya, se realizó mediante monitoreos en lotes centinelas ubicados en las Estaciones Experimentales Agrícolas (EEA) en tres Municipios: Isabela, Adjuntas y Juana Díaz (Figura 1). Los lotes centinelas estuvieron dispuestos en bloques completamente aleatorizados con cuatro repeticiones.

Desde octubre del 2006 hasta junio del 2008, se realizaron seis siembras por cada localidad (Cuadro 2). Previa a la siembra, se realizó la preparación del terreno. En la EEA de Isabela, se sembró la línea 2053 A (Monsanto®). En las EEA de Adjuntas y Juana Díaz, a más de utilizar la línea 2053 A, se sembró el cultivar NK (Syngenta®), para las dos últimas siembras y tres últimas siembras, respectivamente.

La fertilización se realizó entre los 20 y 30 días después de la siembra, utilizando 250, 42 y 158 Kg/ha de N, K_2O y P_2O_5, respectivamente. La deshierba de los lotes fue realizada mediante aplicación de herbicidas, deshierbas manuales y mecánicas.

Cuadro 2. Fechas de siembra de lotes experimentales de soya en tres Estaciones Experimentales Agrícolas, durante el período 2006-2008.

Número de Siembra	ISABELA	ADJUNTAS	JUANA DIAZ
1	10-Oct-06	03-Oct-06	13-Dic-06
2	22-Ene-07	01-Feb-07	11-Jul-07
3	04-Abr-07	08-Jun-07	24-Ene-08
4	21-Jun-07	08-Oct-07	08-Abr-08
5	29-Ago-07	07-Feb-08	07-May-08
6	25-Ene-08	20-May-08	10-Jun-08

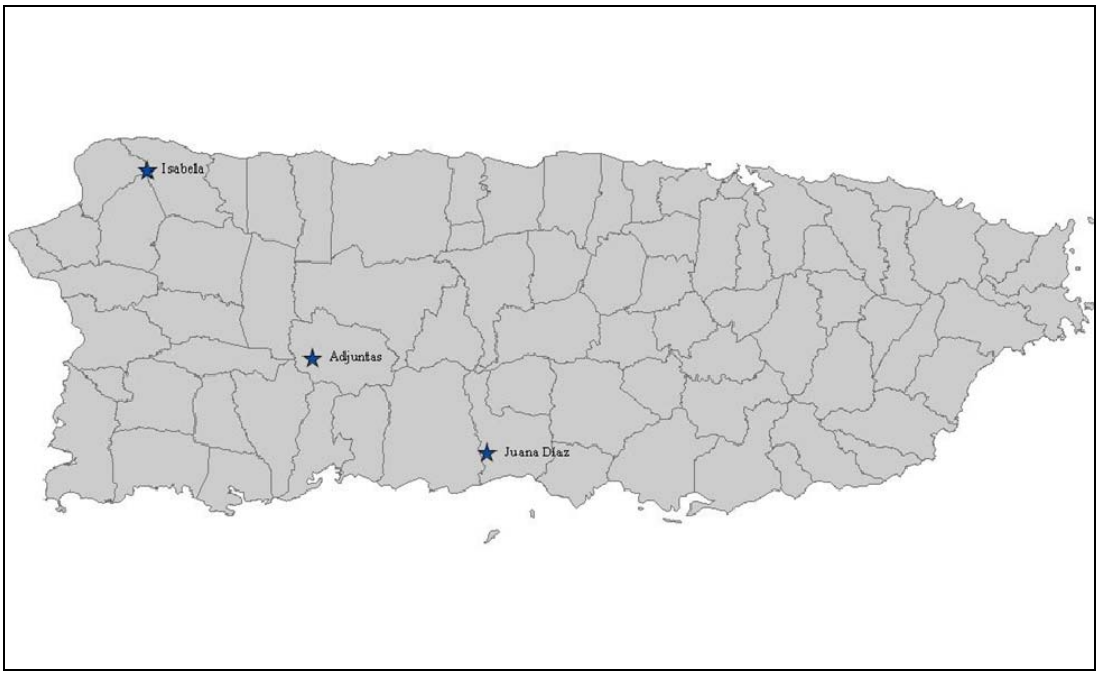

Figura 1. Localización geográfica, mediante posicionamiento satelital, de los lotes centinela de soya en las EEA de Juana Díaz, Adjuntas e Isabela.

3.1.1. Isabela

La EEA de Isabela se localiza en la zona Noroeste de Puerto Rico, Barrio Guerrero, sobre la carretera número dos, kilómetro 114.7. Sus coordenadas geográficas son: Latitud N 18°27´732", Longitud W 067°03´355", ubicada a 128 metros sobre el nivel del mar (m.s.n.m). El suelo predominante pertenece al orden Oxisol, serie Coto, es de textura arcillosa, ácido y de una fertilidad media. Su temperatura promedio va de 22.2 a 27.8^{o}C, con una precipitación anual de 2032 milímetros.

El lote centinela estuvo conformado por veinte hileras de soya de 36 m de largo y 0.6 m de separación entre hileras, y como borde dos hileras de habichuela, cultivar Morales. En dicho lote centinela se estableció el lote experimental, el cual consistió de cuatro bloques, cada uno con cinco hileras de 9 m de largo y 0.6 m de separación entre hileras. La

distancia de separación entre cada bloque fue de 1.5 m. La superficie total del lote experimental fue de 86.4 m^2. Se realizó siembra mecánica con una densidad promedio de 16 semillas/metro lineal. No se realizaron aplicaciones de fungicidas durante el experimento. Se realizaron aplicaciones de insecticidas para el control de las plagas presentes durante el ciclo de cultivo (Cuadro 3).

Cuadro 3. Agroquímicos utilizados en lotes experimentales de soya en la EEA de Isabela, durante el período 2006-2008.

Número de Siembra	Fecha de siembra	Ingrediente activo	Dosis[a] (g o cc/l)	Fecha de aplicación
1	10-Oct-06	Esfenvalerato	1.88	22-Nov-06
2	22-Ene-07	Esfenvalerato	1.88	15-Feb-07
3	04-Abr-07	Esfenvalerato	1.88	01-May-07
		Fluazifop-P	1.2	01-May-07
		Endosulfan	6.25	19-May-07
4	21-Jun-07	Esfenvalerato	1.88	23-Jul-07
5	29-Ago-07	Methomyl	0.6	27-Sep-07
		Fluazifop-P	1.2	27-Sep-07
6	25-Ene-08	Esfenvalerato	1.88	06-Mar-08

[a]El volumen de caldo pesticida fue de 55 litros/lote centinela.

3.1.2. Adjuntas

La EEA de Adjuntas se ubica sobre la carretera 525, kilómetro 2.5, en la zona centro oeste de la isla. Se encuentra en la Latitud N 18°10´474", Longitud W 066°47´961" y a una altitud de 594.4 m.s.n.m. Sus suelos son profundos, arcillosos y de baja fertilidad, catalogados dentro del orden Mollisol, serie Toa. La temperatura promedio oscila entre 18.3 y 23.9°C. La precipitación anual es de 2540 milímetros.

La siembra del lote de soya se efectúo a mano, con una densidad promedio de 23 semillas/m. En las cuatro primeras siembras se utilizó la línea 2053 A, mientras que en las

últimas dos siembras se añadió el cultivar NK. Cada cultivar estuvo constituida por cuatro bloques de cinco hileras, y dos hileras de habichuela cultivar Morales como borde. La longitud del bloque fue de 6 m de largo y 0.9 m de separación entre hileras. La separación entre bloques fue de 1.5 m, con una superficie total del lote experimental de 86.4 m^2 (para las cuatro primeras etapas de siembra), y de 172.8 m^2 para las dos últimas etapas.

Adicional a los lotes experimentales, durante las cuatro últimas etapas de siembra, se realizó la siembra de dos hileras de las leguminosas: chícharo (*Lablab purpureus*) en número de 60 semillas, 30 semillas de haba (*Phaseolus lunatus*), 40 semillas de mucuna (*Mucuna pruriens*), 24 semillas de canavalia (*Canavalia gladiata*) y 20 semillas de jícama (*Pachyrhizus erosus*). El largo de cada hilera fue de 2.7 m, con una separación de 0.9 m entre hileras. No se realizaron aplicaciones de fungicidas. El control de plagas se realizó cuando fue necesario (Cuadro 4)

Cuadro 4. Agroquímicos utilizados en lotes experimentales en la EEA de Adjuntas, durante el período 2006-2008.

Número de Siembra	**Fecha de siembra**	**Ingrediente activo**	**Dosis[a] (g o cc/l)**	**Fecha de aplicación**
1	03-Oct-06	Glifosato	11.64	30-Oct-06
2	01-Feb-07	Glifosato	11.64	05-Mar-07
		Endosulfan	2.65	21-Mar-07
3	08-Jun-07	Endosulfan	2.65	05-Jul-07
		Glifosato	11.64	09-Jul-07
		Azadiractin	3	20-Jul-07
4	08-Oct-07	Glifosato	11.64	16-Nov-07
5	07-Feb-08	Glifosato	11.64	14-Mar-08
		Endosulfan	2.65	10-Abr-08
6	20-May-08	Glifosato	11.64	18-Jun-08

[a]El volumen del pesticida fue de 25 litros/variedad.

3.1.3. Juana Díaz

La EEA de Juana Díaz, ubicada en la zona suroeste de Puerto Rico, se encuentra en el kilómetro 3.1 de la carretera 510, Sabana Llana, Juana Díaz. Sus coordenadas geográficas son: Latitud N 18°01´811”, Longitud W 066°31´713” y 23 m.s.n.m. Los suelos predominantes pertenecen al orden Mollisol, serie San Antón de textura Franco-arcilloso, ligeramente ácidos y de alta fertilidad. La precipitación anual es de 1143 milímetros, y su temperatura promedio varía entre 21.1 y 27.8^{o}C.

Se sembró la línea 2053 A durante las tres primeras siembras, mientras que en las últimas tres se añadió el cultivar NK. El lote centinela, para cada variedad, estuvo conformado por 20 hileras de 23 m de largo y 0.6 m de separación entre hileras, con dos hileras de borde de habichuela, cultivar Morales. En este lote centinela se estableció el lote experimental, conformado por cuatro bloques, cada uno de ellos de 9 m de largo y cinco hileras. La separación entre bloques fue de 1.5 m. La superficie del lote experimental, para las tres primeras etapas de siembra fue de 86.4 m^2, mientras que para las tres últimas etapas fue de 172.8 m^2. La siembra se realizó mecánicamente, con una densidad promedio de 16 semillas/m. No se realizaron aplicaciones de fungicidas. El control de plagas se realizó cuando fue necesario (Cuadro 5).

Cuadro 5. Agroquímicos utilizados en lotes experimentales en la EEA de Juana Díaz, durante el período 2006-2008.

Número de Siembra	Fecha de siembra	Ingrediente activo	Dosis[a] (g o cc/l)	Fecha de aplicación
1	13-Dic-06	Fluazifop-P	1.2	31-Ene-07
		Endosulfan + Alkanolamida	3.5 + 1.67	27-Feb-07
		Fluazifop-P + Sal de amonio de imazethapyr	1.2 + 2.8	27-Feb-07
2	11-Jul-07	Endosulfan + Alkanolamida	3.5 + 1.67	03-Ago-07
		Dimetoato	3.75	17-Ago-07
3	24-Ene-08	S-metolachlor + Sal de amonio de imazethapyr	3.0 + 2.8	14-Feb-08
		Glifosato + Alkanolamida	16.5 + 4	14-Feb-08
4	08-Abr-08	Endosulfan + Alkanolamida	3.5 + 1.67	15-May-08
5	07-May-08	Fluazifop-P	1.2	01-Jul-08
6	10-Jun-08	Fluazifop-P + Sal de amonio de imazethapyr	1.2 + 2.8	24-Jul-08

[a]El volumen del pesticida fue de 50 litros/variedad en lote experimental.

3.2. Monitoreo de lotes experimentales

Se determinó el porcentaje de emergencia a los 15 días después de la siembra, para lo cual se contabilizó el número de plántulas emergidas en la hilera central de cada repetición, la cual se relacionó con la densidad de siembra. Durante la etapa vegetativa se realizó un monitoreo quincenal, mientras que durante la etapa reproductiva se realizó un monitoreo semanal (Cuadro 2). Para cada monitoreo, se determinó el estado fenológico del cultivo.

El monitoreo consistió en la determinación de la incidencia y/o severidad de la roya. La incidencia se determinó contabilizando el número de plantas enfermas con síntomas visibles, mientras que la severidad se estableció determinando el porcentaje de infección presente en las plantas enfermas (Yang, 2007). Cuando se observaron muestras sospechosas: reacción de hipersensitividad, manchas foliares con anillos cloróticos, formación de pústulas, entre otras, se transportaron en fundas plásticas en recipiente

refrigerado hasta la Clínica de Diagnóstico de la EEA de Juana Díaz, en donde se procedieron a confirmar la presencia de roya mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

3.3. Monitoreo de hospederos silvestres

Durante noviembre 2006 a junio 2008, se realizaron monitoreos en catorce municipios de la isla. A través de las principales carreteras del interior de Puerto Rico, se seleccionaron localidades con alta diversidad de leguminosas silvestres y/o cultivadas (Cuadro 6). Una vez identificado el lugar, se estableció su localización a través de sistema de posicionamiento satelital, utilizando un GPSmap 60CSx (Garmin, USA). Mediante el programa ESRI ArcView, versión 9.2 (ESRI, USA), se transformaron dichos puntos a formato gráfico (Figura 2).

Para los diferentes hospederos, se recolectaron muestras de hojas infectadas con roya y se transportaron en fundas plásticas con papel toalla (debidamente identificadas), bajo refrigeración, a la Clínica de Diagnóstico de la EEA de Juana Díaz. La identificación de la roya americana de la soya se realizó mediante PCR. Se colectaron especímenes de las leguminosas monitoreadas, y se realizó un herbario para su mantenimiento. La identificación de las plantas fue confirmada por el botánico y taxónomo, Dr. Gary Breckon (Departamento de Biología, Universidad de Puerto Rico). Para un aislado no identificado morfológicamente, proveniente del sitio de monitoreo 32 (localizado en Adjuntas) se realizó la secuenciación de la región ITS del rADN, y su secuencia se comparó con la base de datos existente en BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) para su identificación.

Cuadro 6. Fechas y localización geográfica de los sitios en donde se realizaron los monitoreos en leguminosas silvestres para la roya americana de la soya.

Sitio de monitoreo	Fecha	Latitud	Longitud	Altitud (m.s.n.m)
1	03-Nov-06	N 18°11.897´	W 066°47.895´	453.24
2	10-Nov-06	N 18°11.162´	W 066°45.411´	574.85
3	10-Nov-06	N 18°11.810´	W 066°47.840´	499.26
4	10-Nov-06	N 18°10.474´	W 066°47.962´	560.83
5	17-Nov-06 24-Abr-07 05-Jun-07 08-Abr-08	N 18°28.012´	W 067°03.289´	129.54
6	17-Nov-06	N 18°12.920´	W 066°43.535´	253.29
7	17-Nov-06	N 18°11.897´	W 066°43.729´	453.24
8	17-Nov-06	N 18°14.692´	W 066°43.258´	226.16
9	07-Abr-07	N 18°12.455´	W 066°48.551´	520.29
10	28-Abr-07	N 18°10.180´	W 066°39.144´	754.38
11	28-Abr-07	N 18°11.632´	W 066°37.516	424.28
12	28-Abr-07 18-Jul-07	N 18°13.040´	W 066°36.072´	417.27
13	28-Abr-07	N 18°12.990´	W 066°37.911´	436.17
14	28-Abr-07	N 18°14.611´	W 066°39.661´	298.40
15	28-Abr-07	N 18°18.041´	W 066°37.201´	351.74
16	28-Abr-07	N 18°12.489´	W 066°43.560´	347.47
17	10-May-07 10-Jul-07	N 18°08.207´	W 066°17.524´	618.13
18	10-May-07 10-Jul-07	N 18°17.171´	W 066°15.938´	370.03
19	10-May-07 10-Jul-07	N 18°16.908´	W 066°18.224´	537.67
20	10-May-07	N 18°08.248´	W 066°17.550´	633.37
21	08-Jun-07 22-Jun-07 29-Jun-07	N 18°10.474´	W 066°47.961´	560.22
22	10-Jul-07	N 18°11.210´	W 066°18.904´	584.00
23	10-Jul-07	N 18°14.136´	W 066°17.342´	610.21
24	18-Jul-07	N 18°09.662´	W 066°30.529´	762.61
25	18-Jul-07	N 18°11.016´	W 066°30.372´	576.38
26	18-Jul-07	N 18°10.180´	W 066°39.143´	754.68
27	18-Jul-07	N 18°11.679´	W 066°37.482´	423.67
28	18-Jul-07	N 18°16.796´	W 066°45.225´	448.97
29	24-Ago-07	N 18°19.576´	W 066°24.234´	235.92
30	24-Ago-07	N 18°11.170´	W 066°45.365´	598.63
31	28-Ago-07	N 18°11.171´	W 066°45.363´	598.63
32	28-Ago-07 14-Sep-07	N 18°10.855´	W 066°46.123´	561.44
33	14-Sep-07	N 18°10.179´	W 066°35.254´	1096.37
34	14-Sep-07	N 18°13.034´	W 067°08.911´	21.64
35	12-Nov-07	N 18°01.543´	W 066°31.511´	305.41
36	06-Dic-07	N 18°05.925´	W 066°38.714´	335.58
37	24-Ene-08	N 18°18.260´	W 066°34.615´	342.90
38	11-Jun-08	N 18°01.640´	W 066°31.625´	53.95

Figura 2. Localización geográfica de los lugares monitoreados en leguminosas silvestres, para la roya americana de la soya (Utilización del programa ESRI ArcView, versión 9.2).

Para el caso de las muestras correspondientes a *Lablab purpureus,* se determinó la incidencia y severidad de la enfermedad. La incidencia de la roya se determinó relacionando el número de foliolos infectados con el número total de foliolos en tres ramas seleccionadas al azar. La severidad se determinó calculando el porcentaje promedio de infección de dichos foliolos y a través de la escala de severidad desarrollada para *L. purpureus* (Figura 3); en donde: escala 1 representa una reacción inmune con ausencia de síntomas visibles, escala 2 equivale a una severidad menor al 5%, escala 3 equivale a una severidad entre 6 y 25%, escala 4 equivale a una severidad entre el 26 y el 50%, y escala 5 equivale a una severidad superior al 51%.

Bajo un microscopio estereoscópico Nikon, modelo SMZ 645 (Nikon Corporation, Japón) se determinó el tipo de lesión, identificando como:

- Inmune. Equivalente a ausencia de esporulación y/o presencia de reacción de hipersensitividad.
- RB. Cuando se presentaron lesiones de coloración café-rojizo, con un reducido número de uredos y poca esporulación.
- TAN. Cuando las lesiones presentaron una coloración bronceada, con gran número de uredos y abundante esporulación.

Se seleccionaron 16 aislados de *L. purpureus,* dos de *P. lunatus,* uno de *P. erosus* y uno de *V. luteola*, en los cuales se determinó el número de pústulas por lesión (en 10 lesiones individuales). En seis zonas representativas del envés de las hojas, se marcaron áreas de 1 cm^2 y se determinó el número de uredos en dicha área. Adicionalmente, se

determinó el número de uredosporas por uredo, para lo cual se realizaron cortes finos en cinco pústulas de cada aislado, y se determinó el diámetro promedio de 20 uredosporas.

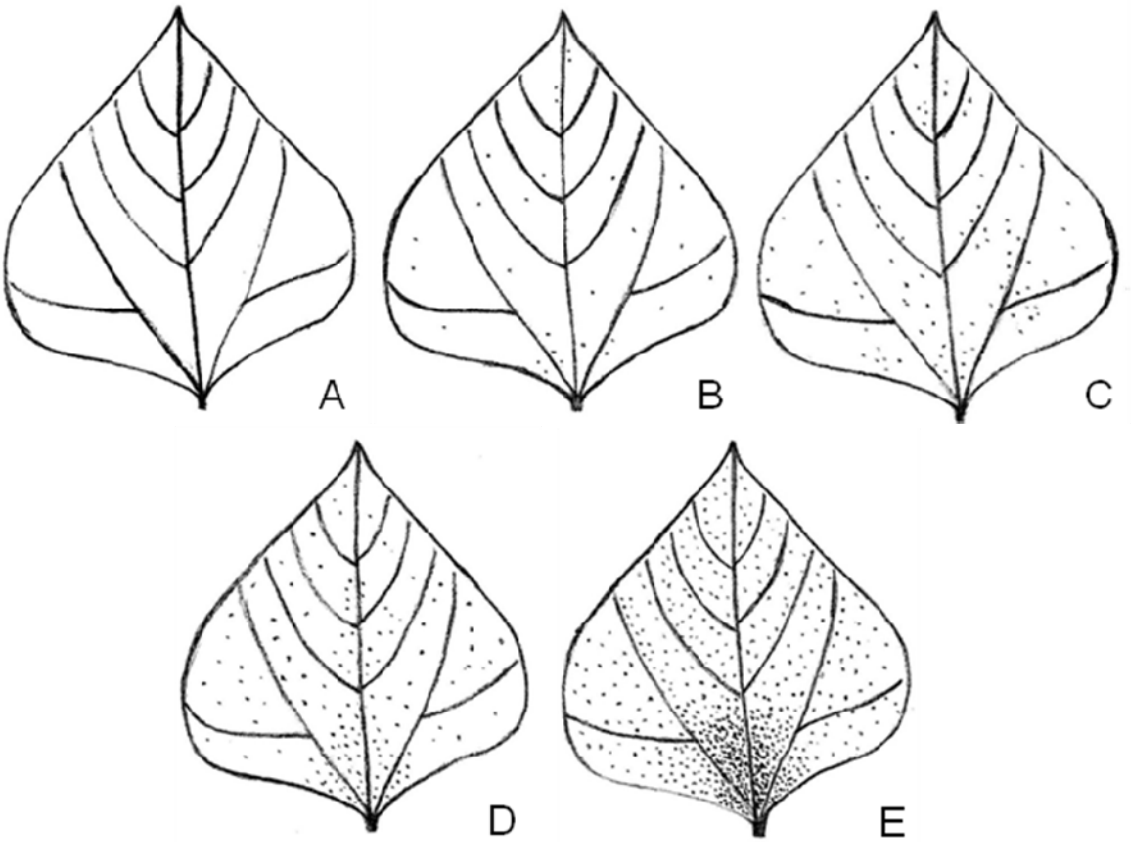

Figura 3. Escala de severidad para *P. meibomiae* en hojas de *L. purpureus.* A. Escala 1, representa una reacción inmune. B. Escala 2, representa una severidad menor al 5%. C. Escala 3, representa una severidad entre el 6 y el 25%. D. Escala 4, representa una severidad entre el 26 y el 50%. E. Escala 5, representa una severidad superior al 51%.

3.4. Rango de hospederos

Este experimento se realizó en el vivero de la EEA de Juana Díaz. Se seleccionaron quince especies de leguminosas: *Canavalia gladiata* (Jack.) DC., *Crotalaria brevidens* Benth., *Crotalaria juncea* (L.), *Crotalaria retusa* (L.), *Glycine max* (L.) Merr., cultivar Williams y línea 2053 A, *Lablab purpureus* (L.) Sweet, *Macroptilium lathyroides* (L.)

Urb., *Mucuna pruriens* (L.) DC., *Pachyrhizus erosus* (L.) Urb., *Phaseolus lunatus* (L.), *Phaseolus vulgaris* (L.) cultivar Verano, *Pueraria phaseoloides* (Roxb.) Benth., *Rhynchosia reticulata* (Sw.) DC., *Vigna luteola* (Jacq.) Benth., *Vigna unguiculata* (L.) Walp.

3.4.1. Siembra

La siembra se realizó el día 9 de noviembre del 2007. Se seleccionaron semillas de *C. gladiata, G. max, L. purpureus, M. pruriens, P. erosus, P. lunatus, P. vulgaris* y *V. unguiculata,* y se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 2.5% durante 3 minutos, posteriormente se enjuagaron por tres ocasiones con agua destilada esterilizada. Para el caso de las semillas de *C. brevidens, C. juncea, C. retusa, M. lathyroides, P. phaseoloides* y *V. luteola,* se escarificaron con la utilización de papel lija #80 (Norton, USA), previa a su siembra.

Se tomaron entre cuatro y diez semillas de las diferentes leguminosas y se sembraron en tiestos de 2.54 litros de capacidad (East Jordan plastic, USA), utilizando como sustrato PRO-MIX Bx (Premier horticulture, Canadá). Cada leguminosa tuvo entre cinco a siete tiestos. Durante el período que duró el experimento se determinó la temperatura dentro del vivero.

3.4.2. Inoculación

Veinte y uno días después de la siembra (21 DDS) se procedió a realizar la inoculación. El inóculo consistió de segmentos de hojas de 1 x 1.5 cm de *L. purpureus*

infectadas con *P. meibomiae* (con un promedio de $3.5x10^3$ uredospores/cm^2), aislado colectado en el sitio de monitoreo 32 (Cuadro 6). Los segmentos de la hoja infectada con roya (inóculo) se graparon en el envés del trifolio, o de la primera hoja verdadera de cada leguminosa, y se colocaron en el vivero bajo sarán (50% de sombra). Se irrigó con microaspersores durante 48 horas, con una descarga equivalente a 16.26 mm de precipitación por hora. Para verificar la presencia de *P. meibomiae,* 20 días después de la inoculación, se tomaron hojas con síntomas visibles de roya, y se identificó mediante PCR.

3.4.3. Variables evaluadas

3.4.3.1. Período de incubación

Se determinó el número de días desde la inoculación hasta la aparición de los primeros síntomas (Van Der Plank 1963).

3.4.3.2. Período de latencia

Se determinó el número de días desde la inoculación hasta la aparición de la primera pústula (uredo) por lesión (Van Der Plank 1963).

3.4.3.3. Número de uredos por lesión individual

Veinte días después de la inoculación, se observaron 100 lesiones individuales y se determinaron el número de uredos por lesión. La observación se realizó bajo microscopio estereoscópico Nikon SMZ 645 (20X).

3.4.3.4. Diámetro de uredo

Veinte días después de la inoculación, se tomaron hojas infectadas con *P. meibomiae* y se realizaron cortes de tejido aproximadamente de 1 x 1 cm. Dichos fragmentos se depositaron en alcohol etílico al 70% durante tres horas con el objetivo de eliminar los pigmentos del tejido. Transcurridas las tres horas, se fijaron en láminas portaobjetos con una solución de: glicerol (40%), fenol (20%), ácido láctico (20%) y tinte azul de algodón (0.05%). Se midió el diámetro de 50 uredos bajo microscopía óptica, mediante un microscopio Olympus modelo Cx31 (Olympus America Inc., Center Valley, PA) y una cámara digital Olympus DP 20, a 40 y 200 aumentos.

3.5. Identificación

Las muestras colectadas y debidamente identificadas fueron procesadas en la Clinica de Diagnóstico de la EEA de Juana Díaz. Se realizaron análisis serológico (ELISA) y molecular (PCR).

3.5.1. ELISA

Bajo microscopio estereoscópico (20-40X), se seleccionaron zonas de la hoja con presencia de signos y/o síntomas de la enfermedad. En un tubo Eppendorf de 2 ml de capacidad se colocó un fragmento de tejido y se utilizó la prueba de ELISA para identificación de la roya de la soya (Envirologix, Portland, ME), de acuerdo a las instrucciones del manufacturero. La lectura de la reacción se realizó en forma directa, clasificando a la reacción como: positiva (cuando el color de la reacción fue amarillo

intenso), negativa (el color de la reacción fue claro) o intermedia (el color de la reacción fue amarillo débil a claro), y además se tomó la absorbancia de las muestas, utilizando un lector de ELISA (Modelo ELX 808, Biotek, Vermont, USA), calibrado a una longitud de onda de 450 nanómetros.

3.5.2. Identificación molecular

3.5.2.1. Extracción de ADN

Utilizando un tubo Sigma de 2 ml de capacidad, se cortaron fragmentos de tejido de 5 mm de diámetro. La selección del fragmento de hoja se realizó luego de una observación bajo microscopio estereoscópico (20-40X), en donde se encontraron signos y/o síntomas de la enfermedad. Para la extracción del ADN, se utilizó el kit Plant PCR kit REDExtract-N-Amp (Sigma, St. Louis, USA), de acuerdo a las instrucciones del manufacturero. Una vez extraído el ADN, se diluyó a concentraciones de 1:10, 1:100 y 1:1000, utilizando agua molecular (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA), y se mantuvo a -20°C. El control positivo de *P. pachyrhizi* consistió de una muestra de su ADN, proporcionado por la Universidad de Florida (http://nfrec.ifas.ufl.edu/programs/plant_diagnostic_clinic.shtml).

3.5.2.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase chain reaction: PCR), se realizó utilizando el ADN total genómico extraído de las diferentes muestras. Para la identificación de *P. pachyrhizi,* se utilizaron los iniciadores Ppa1 (5´-TAA GAT CTT TGG

GCA ATG GT-3´) y Ppa2 (5´-GCA ACA CTC AAA ATC CAA CAA T-3´), mientras que para la identificación de *P. meibomiae* se utilizaron los iniciadores Pme1 (5´-GAA GTT TTT GGG CAA ATC AC-3´) y Pme2 (5´-GCA CTC AAA ATC CAA CAT GC-3´) (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA). El volumen total de la reacción de PCR fue de 20 µl, conteniendo: 10 µl de mezcla maestra (REDExtract-N-Amp, Sigma, St. Louis, USA) de acuerdo a las instrucciones del manufacturero, 3 µl de cada iniciador (20 pmol) y 4 µl de ADN (5-50 ng). Para la amplificación del ADN se utilizó un termociclador (Modelo T 3000, Biometra, Rudolf-Wissell-str, Goettingen). Los ciclos y tiempos de amplificación utilizados para ambas especies fueron: un ciclo inicial de desnaturalización a 94°C por dos minutos, 35 ciclos a 94°C por 30 segundos (desnaturalización), 65°C por 30 segundos (hibridación) y 72°C por 30 segundos (extensión), seguido de un ciclo final de extensión a 72°C por 10 minutos (Frederick et al., 2002; Lamour et al., 2006).

Los productos de amplificación del PCR fueron visualizados en gel de agarosa (Sigma, St. Louis, USA) al 1.5%, teñido de bromuro de etidio (10 mg/ml) (Sigma, St. Louis, USA). Se realizó una electroforesis a 100 V durante 40 minutos, utilizando el amortiguador Tris EDTA 1X (Sigma, St. Louis, USA). Para la observación de bandas en el gel, se utilizó un visualizador de rayos ultravioleta y el programa Quantity one, versión 4.6.1 (BioRad Laboratory, Inc., Japón). El tamaño de las bandas fue comparado con una escalera de peso de 100 a 1000 bp (Sigma, St. Louis, USA).

3.6. Secuenciación de la región ITS (Internal Transcribed Spacer) del ADN ribosomal

3.6.1. Extracción del ADN

Se colectaron ocho aislados de *P. meibomiae,* infectando *L. purpureus,* procedentes de la región centro oeste de Puerto Rico (Cuadro 7). Para cada aislado, se tomaron entre 1 a 5 mg de uredosporas y se depositaron en un tubo Eppendorf de 2 ml de capacidad. Se colocaron tres esferas de cristal de 5 mm de diámetro por cada tubo (Fisher Scientific, Pittsburgh, USA), y se realizó la extracción de ADN utilizando el DNeasy Plant Mini kit (Qiagen, California, USA), de acuerdo a las instrucciones del manufacturero, incrementando el período de incubación de 15 a 60 minutos. El ADN extraído se refrigeró a -20°C hasta su utilización.

Cuadro 7. Localización geográfica de los aislados de *P. meibomiae,* infectando *L. purpureus,* utilizados para la secuenciación de la región ITS del ADN ribosomal.

Sitio de monitoreo	Aislado	Latitud	Longitud	Altitud (m.s.n.m)
39	LP17	N 18°11.576´	W 066°30.965´	579.73
2	LP18	N 18°11.162´	W 066°45.411´	574.85
41	LP19	N 18°11.833´	W 066°22.115´	572.11
42	LP20	N 18°08.205´	W 066°17.522´	630.02
43	LP21	N 18°07.492´	W 066°17.480´	637.03
1	LP22	N 18°11.897´	W 066°47.895´	453.24
4	LP23	N 18°10.474´	W 066°47.962´	560.83
32	LP24	N 18°10.855´	W 066°46.123´	561.44

3.6.2. Amplificación de la región ITS

Mediante PCR se realizó la amplificación de la región ITS del ADN ribosomal. Se utilizaron los iniciadores ITS1 (5´-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3´) e ITS4 (5´-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3´) (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA). Se

utilizó un volumen total de reacción de 20 µl, conteniendo: 10 µl de mezcla maestra (REDExtract-N-Amp, Sigma, St. Louis, USA) de acuerdo a las instrucciones del manufacturero, 3 µl de cada iniciador (20 pmol) y 4 µl de ADN (5-50 ng). La reacción de PCR consistió de un ciclo inicial de desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, seguido de 35 ciclos a 94°C por 30 segundos (desnaturalización), 55°C por 30 segundos (hibridación) y 72°C por 1 minuto (extensión), seguido de un ciclo final de extensión a 72°C por 6 minutos (White et al., 1990; Fernández 2005).

La visualización de los productos de amplificación del PCR fue realizado en gel de agarosa (Sigma, St. Louis, USA) al 1.0%, teñido de bromuro de etidio (10 mg/ml) (Sigma, St. Louis, USA). La electroforesis se realizó durante 40 minutos a 100 V, utilizando el amortiguador Tris EDTA 1X (Sigma, St. Louis, USA). Para la observación de las bandas en el gel, se utilizó un visualizador de rayos ultravioleta y el programa Quantity one, versión 4.6.1 (BioRad Laboratory, Inc., Japón). El tamaño de las bandas fue comparado con una escalera de peso de 100 a 1000 bp (Sigma, St. Louis, USA).

3.6.3. Análisis de la secuencia de la región ITS del ADN ribosomal

La purificación de los productos de amplificación del PCR y la secuenciación de la región ITS del ADN ribosomal se realizó en las facilidades de Secuenciación y Genotipificación de la Universidad de Puerto Rico, Recinto Universitario de Río Piedras (Sequencing and Genotyping facility, University of Puerto Rico-Río Piedras) (www.mcc.com.pr). Para la secuenciación de la región ITS se utilizaron los iniciadores Pme1 y Pme2.

Cuadro 8. Especies y números de accesiones tomadas del Centro Nacional para Información Biotecnológica (GeneBank).

Especie	Número de accesión
Phakopsora meibomiae	AF333502
P. pachyrhizi	AF333488
Uromyces vignae	AB115736
U. appendiculatus	DQ411531
Puccinia hordei	DQ460723
P. coronata f.sp. *avenae*	EU014044
Hemileia vastatrix	EF394132
Tranzschelia discolor	EU014071
Ustilago hordei	AY345003
Boletus mirabilis	AF335451

Las secuencias de los diferentes aislados se alinearon utilizando el programa Sequencher, versión 4.5 (www.genecodes.com). Una vez alineadas, se compararon sus homologías con otras especies a través de la base de datos existente en el Centro Nacional para Información Biotecnológica (National Center for Biotechnology Information). El programa utilizado para dicha comparación fue BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi). Para la comparación de las distancias evolutivas entre los aislados y especies relacionadas, se seleccionó la secuencia de la región ITS de diez especies relacionadas, tomadas de la base de datos del Centro Nacional para Información Biotecnológica (GeneBank) (Cuadro 8). Se realizó un alineamiento múltiple con las secuencias de los aislados y de las especies relacionadas, utilizando el programa BioEdit, versión 7.0.4.1, a través del parámetro ClustalW (http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/BioEdit.html). La construcción del árbol filogenético se efectuó mediante el programa MEGA, versión 4.1 (http://www.megasoftware.net/). Se utilizó el método Neighbor-Joining, utilizando la prueba bootstrap con 1000 repeticiones.

Las distancias genéticas fueron analizadas utilizando el modelo “Maximun Composite Likelihood”.

3.7. Microscopía Electrónica de Rastreo (Scanning Electron Microscopy: SEM)

Se recolectaron hojas sintomáticas (con presencia de pústulas) de las diferentes leguminosas evaluadas para la determinación de rango de hospederos, o muestras provenientes de las diferentes colecciones realizadas en la zona montañosa de la isla. Se cortaron fragmentos de 7 a 8 mm, y se colocaron en solución de glutaraldehído al 4% en amortiguador de fosfato 0.1 M (Electron Microscopy Sciences, Washington, PA) ajustado a un pH de 7.2, durante 24 horas a 4°C. Transcurridas las 24 horas, se realizaron tres lavados, de 15 minutos cada uno, en amortiguador de fosfato 0.1 M (pH 7.2). Posteriormente se realizó la deshidratación, para lo cual se colocaron las muestras en diferentes concentraciones de alcohol etílico de 5 a 100% en incrementos de 5% cada vez, durante 15 minutos, para cada concentración. Adicionalmente, se realizaron dos inmersiones, de 15 minutos cada una, en alcohol etílico al 100%. Finalizada la deshidratación se realizó el secado crítico (critical point drying) durante dos horas, utilizando un equipo EMS 850 (Electron Microscopy Sciences, Washington, PA). Finalmente, las muestras se montaron en placas metálicas de aluminio con cubierta de carbón (10 mm de diámetro), y se sometieron a una película de oro durante 10 minutos, utilizando un equipo EMS 550X (Electron Microscopy Sciences, Washington, PA). La lectura se realizó en un microscopio electrónico modelo JSM-5410 LV (Jeol Ltd., Tokio, Japón).

4. RESULTADOS

4.1. Evaluación de la infección natural de la roya americana de la soya en lotes experimentales

Durante los años 2006 a 2008, no se observó infección natural de roya en los lotes experimentales de soya en las localidades de Isabela, Adjuntas y Juana Díaz. Durante estos dos años de monitoreo, se identificaron las siguientes enfermedades virales: *Soybean mosaic virus* (SMV) y necrosis del tallo causado por un Carlavirus. Adicionalmente se identificó la presencia de *Xanthomonas campestris* pv. *glycines,* como el agente causal de la pústula bacteriana. Entre las enfermedades fungosas: la mancha del ojo del sapo producida por *Cercospora sojina,* el añublo lanoso producido por *Peronospora manshurica*, el tizón sureño causado por *Sclerotium rolfsii*, y manchas foliares producidas por los hongos *Phoma* sp. y *Phomopsis* sp. (Cuadro 9).

La enfermedad más importante identificada fue la necrosis del tallo asociada con Carlavirus. En la EEA de Juana Díaz se observó una incidencia entre el 5 al 25% en la línea 2053 A, mientras que para el cultivar NK, su incidencia fue menor al 10%. En la EEA de Isabela, la enfermedad no superó el 5% en la línea 2053 A, mientras que en la EEA de Adjuntas no se manifestó la necrosis del tallo, posiblemente debido a las condiciones climáticas y a la altitud en donde se desarrolló la soya.

La incidencia de las otras enfermedades reportadas (Cuadro 8), fluctuó entre el 1 y el 5%, exceptuando las enfermedades identificadas durante la siembra del 7 de febrero del 2008 en la EEA de Adjuntas, en donde la incidencia de *Phomopsis* sp. fue del 10% para la línea 2053 A, y del 5% para el cultivar NK.

Cuadro 9. Evaluación de la roya de la soya en lotes experimentales, y principales enfermedades identificadas en soya en Isabela, Adjuntas y Juana Díaz, durante los años 2006 a 2008.

Localidad	Fecha de siembra	Presencia de Roya		Enfermedades identificadas	
		Línea 2053 A	Cultivar NK	Línea 2053 A	Cultivar NK
EEA de Isabela	10-Oct-06	Negativo	N.E[a]	Carlavirus	N.E[a]
	22-Ene-07	Negativo	N.E[a]	Carlavirus	N.E[a]
	04-Abr-07	Negativo	N.E[a]	Carlavirus, *Cercospora sojina*, *Peronospora manshurica*	N.E[a]
	21-Jun-07	Negativo	N.E[a]	Carlavirus, *Xanthomonas campestris*	N.E[a]
	29-Ago-07	Negativo	N.E[a]	Carlavirus	N.E[a]
	25-Ene-08	Negativo	N.E[a]	Carlavirus	N.E[a]
EEA de Adjuntas	03-Oct-06	Negativo	N.E[a]	*Sclerotium rolfsii*	N.E[a]
	01-Feb-07	Negativo	N.E[a]	-	N.E[a]
	08-Jun-07	Negativo	N.E[a]	*Phoma* sp.	N.E[a]
	08-Oct-07	Negativo	N.E[a]	-	N.E[a]
	07-Feb-08	Negativo	Negativo	*Phomopsis* sp.	*Phomopsis* sp.
	20-May-08	Negativo	Negativo	*Phomopsis* sp.	*Phomopsis* sp.
EEA de Juana Díaz	13-Dic-06	Negativo	N.E[a]	Carlavirus, *Cercospora sojina*	N.E[a]
	11-Jul-07	Negativo	N.E[a]	Carlavirus	N.E[a]
	24-Ene-08	Negativo	N.E[a]	Carlavirus, SMV	N.E[a]
	08-Abr-08	Negativo	Negativo	Carlavirus	Carlavirus, SMV
	07-May-08	Negativo	Negativo	Carlavirus	Carlavirus, SMV
	10-Jun-08	Negativo	Negativo	Carlavirus, SMV	Carlavirus, SMV

[a]N.E = variedad no evaluada.

Los datos climáticos de las EEA de Adjuntas, Juana Díaz e Isabela están reportados en los Cuadros 10, 11 y 12, respectivamente, mientras que en las Figuras 4 y 5 se presentan los promedios mensuales de la temperatura y precipitación de dichas EEA.

Cuadro 10. Datos climáticos de temperaturas y precipitación en la EEA de Adjuntas, durante los años 2006 al 2008.

	T. Máxima (ºC)	T. Mínima (ºC)	T. Promedio (ºC)	Precipitación (mm)
		2006		
Agosto	29.67	17.33	23.50	197.46
Septiembre	30.11	16.56	23.33	464.21
Octubre	29.67	17.33	23.50	195.69
Noviembre	29.17	15.44	22.31	183.25
Diciembre	27.83	14.44	21.14	54.57
		2007		
Enero	27.00	13.39	20.19	30.20
Febrero	28.28	12.39	20.33	44.92
Marzo	27.39	14.17	20.78	81.73
Abril	27.61	15.11	21.36	219.80
Mayo	29.17	17.17	23.17	97.46
Junio	29.61	17.17	23.39	145.43
Julio	30.17	16.78	23.47	146.45
Agosto	29.72	17.33	23.53	210.91
Septiembre	29.44	16.22	22.83	269.04
Octubre	28.61	17.00	22.81	243.65
Noviembre	27.94	15.17	21.56	107.11
Diciembre	26.72	14.22	20.47	328.68
		2008		
Enero	26.50	11.89	19.19	46.19
Febrero	26.83	11.72	19.28	21.83
Marzo	27.00	11.94	19.47	52.03
Abril	27.50	13.22	20.36	243.40
Mayo	28.33	14.78	21.56	159.39
Junio	29.72	16.50	23.11	137.06
Julio	30.11	15.44	22.78	136.55

Cuadro 11. Datos climáticos para la EEA de Juana Díaz, durante los años 2006 al 2008.

	T. Máxima (°C)	T. Mínima (°C)	T. Prom (°C)	Precipitación (mm)	Rad. Máxima (wat/m^2)	Rad. Prom (wat/m^2)	HR Máxima (%)	HR Mínima (%)	HR Prom (%)
					2006				
Noviembre	32.66	21.05	26.35	52.28	894	390	95.70	44.27	76.11
Diciembre	31.93	18.77	25.90	9.64	862	320	94.10	42.50	70.78
					2007				
Enero	31.64	17.02	24.96	6.09	860	360	93.40	31.42	68.89
Febrero	31.66	17.98	25.27	1.02	919	400	91.50	39.09	70.56
Marzo	31.55	18.43	25.63	32.99	962	395	96.60	41.51	69.92
Abril	31.23	16.91	26.12	85.79	1006	445	96.00	36.38	71.81
Mayo	32.84	22.53	27.44	53.05	1025	445	95.10	39.98	73.01
Junio	33.08	22.08	27.65	33.50	987	415	94.90	42.72	72.89
Julio	34.08	22.31	28.10	43.15	953	405	91.90	46.92	70.15
Agosto	34.91	22.36	27.61	126.65	969	385	92.90	36.71	73.89
Septiembre	33.20	22.29	27.23	99.49	974	400	93.70	41.23	74.75
Octubre	31.76	21.72	26.20	177.92	925	330	95.30	49.06	80.13
Noviembre	30.95	19.08	25.66	49.24	868	350	93.80	41.11	75.74
Diciembre	31.44	18.67	24.92	78.93	840	330	94.60	37.43	73.11
					2008				
Enero	30.24	17.16	23.96	1.78	848	360	93.90	37.50	71.62
Febrero	30.73	16.62	24.46	6.60	936	390	91.90	33.09	66.64
Marzo	30.45	16.23	24.47	4.57	1015	430	89.30	31.98	66.08
Abril	31.34	17.36	25.36	49.75	1016	455	92.50	38.18	69.92
Mayo	30.95	20.36	26.39	54.06	986	445	91.50	46.26	71.77
Junio	34.83	21.76	27.93	17.01	977	415	90.70	33.90	68.37
Julio	34.87	21.98	28.11	9.64	968	425	90.10	34.30	66.99

Cuadro 12. Datos climáticos para la EEA de Isabela, durante los años 2006 al 2008.

	T. Máxima (°C)	T. Mínima (°C)	T. Prom (°C)	Precipitación (mm)	Rad. Máxima (wat/m^2)	Rad. Prom (wat/m^2)	HR Máxima (%)	HR Mínima (%)	HR Prom (%)
					2006				
Agosto	30.65	21.44	26.17	61.93	998	405	95.10	54.90	83.25
Septiembre	32.09	20.32	26.18	165.74	1009	420	95.80	52.97	82.50
Octubre	30.56	21.38	25.90	164.72	910	365	96.10	59.35	84.70
Noviembre	31.50	19.84	24.95	111.68	841	360	96.80	48.06	81.52
Diciembre	28.43	18.53	24.42	14.47	766	325	95.60	52.98	80.34
					2007				
Enero	28.81	16.20	23.41	60.41	863	355	96.10	41.63	80.00
Febrero	28.55	14.92	23.63	52.54	921	380	96.30	42.42	80.02
Marzo	28.68	16.82	23.50	253.81	983	375	96.80	53.31	81.38
Abril	31.64	17.77	24.25	147.72	1033	445	96.40	48.38	81.23
Mayo	29.88	19.77	25.12	286.80	1013	425	96.90	56.43	83.93
Junio	32.36	20.96	26.12	26.14	966	465	96.00	46.26	80.54
Julio	30.64	19.41	26.35	64.97	984	450	95.50	39.62	79.97
Agosto	31.15	20.73	26.23	123.60	991	410	95.90	55.09	81.86
Septiembre	30.06	20.72	25.57	142.64	1030	395	96.20	60.02	83.48
Octubre	31.14	20.48	25.15	118.78	950	340	95.90	47.40	82.76
Noviembre	29.30	17.79	23.40	192.13	857	340	96.60	50.19	82.79
Diciembre	26.76	15.62	22.62	157.36	783	325	96.30	60.28	82.11
					2008				
Enero	27.23	13.97	21.70	53.81	852	350	96.40	41.96	79.34
Febrero	26.67	14.39	22.25	47.46	935	415	94.80	53.13	77.72
Marzo	26.85	14.85	22.18	26.14	995	445	100.00	46.14	75.76
Abril	25.53	11.75	20.50	130.20	1022	430	100.00	51.60	88.94
Mayo	27.62	12.85	22.28	123.86	981	415	100.00	53.91	92.85
Junio	29.41	17.66	24.53	55.08	942	410	100.00	62.01	94.06
Julio	29.98	19.45	24.77	86.80	956	445	100.00	55.85	89.14

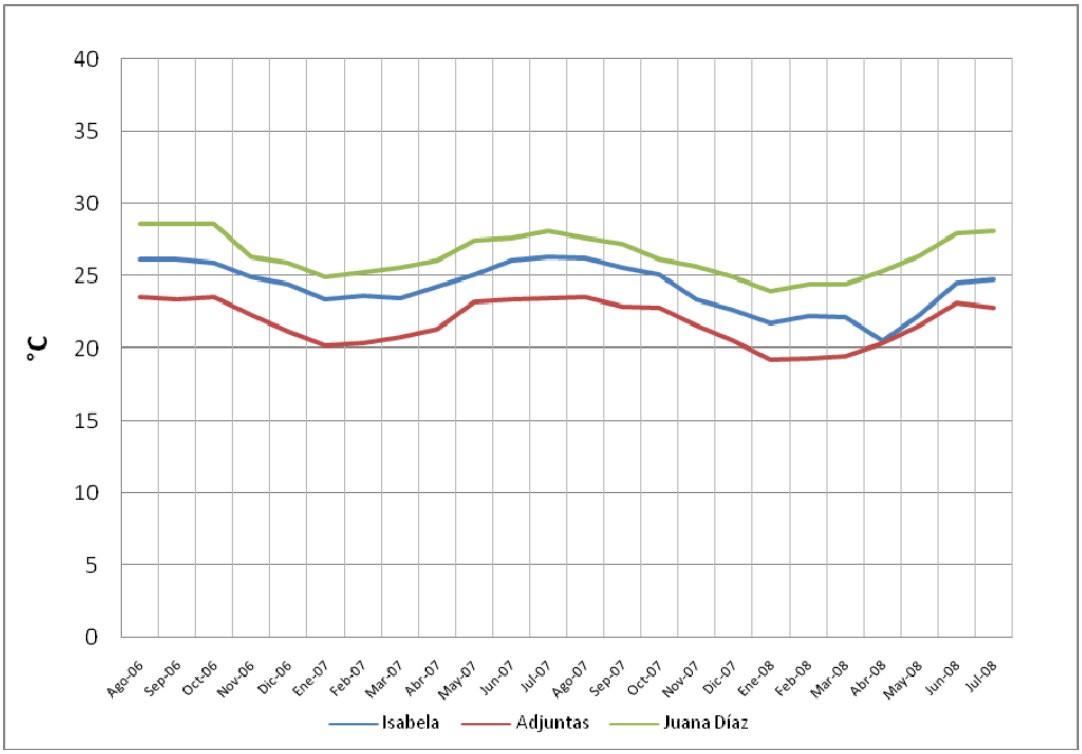

Figura 4. Temperatura (°C) promedio mensual, para las EEA de Isabela, Adjuntas y Juana Díaz, durante 2006 al 2008.

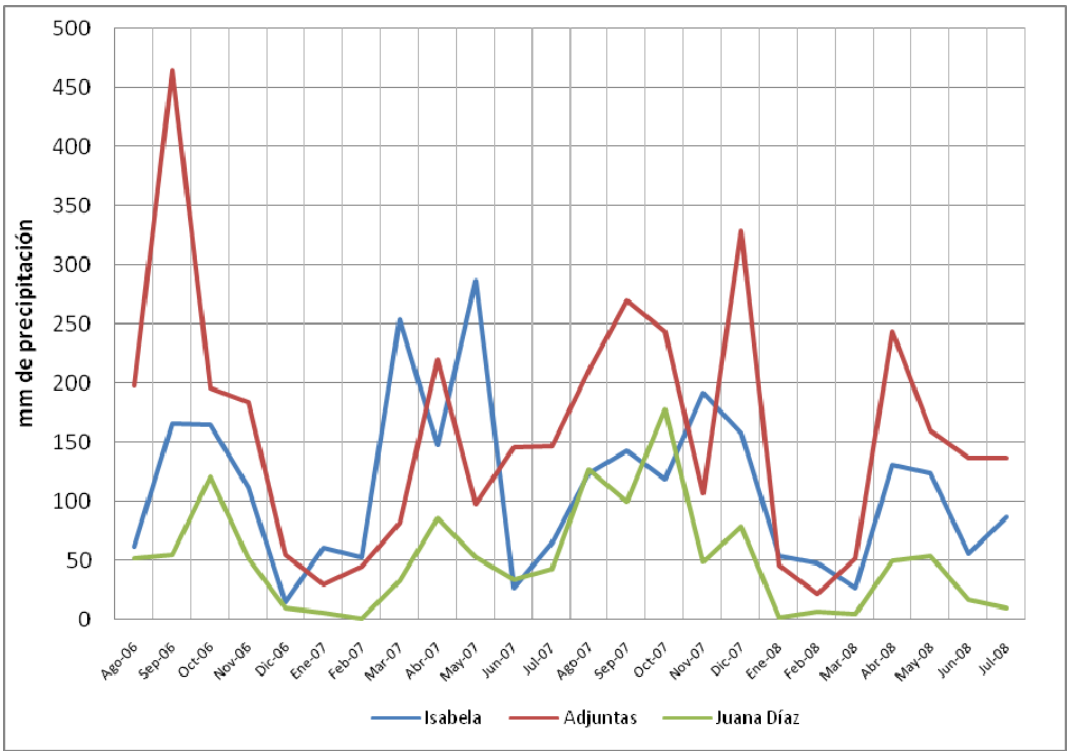

Figura 5. Precipitación (mm) mensual para las EEA de Isabela, Adjuntas y Juana Díaz, durante 2006 al 2008.

En la EEA de Adjuntas, durante los monitoreos realizados en las leguminosas *Lablab purpureus, Phaseolus lunatus, Canavalia gladiata, Mucuna pruriens* y *Pachyrhizus erosus*, se observó infección natural de *P. meibomiae* en *L. purpureus* durante dos siembras consecutivas (8 de junio y 8 de octubre del 2007), mientras que *P. lunatus* presentó infección natural solamente en la segunda siembra (8 de octubre del 2007). Durante las dos últimas siembras realizadas el 7 de febrero y el 20 de mayo del 2008, no se presentó infección natural para dichas leguminosas, en tanto que en *C. gladiata, M. pruriens* y *P. erosus,* no se presentó infección natural durante los cuatro períodos de siembra evaluados.

Los síntomas iniciales de la roya americana de la soya se observaron entre los 48 a 55 días después de la siembra (DDS), tanto para *L. purpureus* como para *P. lunatus,* no obstante, el porcentaje de incidencia inicial fue mayor para *P. lunatus* (74%), comparado con *L. purpureus,* 22 y 32% para la primera y segunda siembra, respectivamente (Cuadro 13). A partir de los 56 DDS, la incidencia de la enfermedad fue del 100% para las dos leguminosas evaluadas, manteniéndose en este porcentaje hasta la última evaluación (entre 64 y 71 DDS). La severidad fue mayor en *P. lunatus,* con un valor de 3 (Figura 3C) entre los 56 a 63 DDS, mientras que para *L. purpureus,* la escala de severidad fue de 2 (Cuadro 13 y Figura 3B).

Cuadro 13. Porcentaje de incidencia y severidad de *P. meibomiae* en *L. purpureus* y *P. lunatus,* durante el ciclo de evaluación en la EEA de Adjuntas.

DDS[a]	Siembra: 8 de junio 2007				Siembra: 8 de octubre 2007			
	L. purpureus		*P. lunatus*		*L. purpureus*		*P. lunatus*	
	I[b]	S[c]	I[b]	S[c]	I[b]	S[c]	I[b]	S[c]
0-7	0	1	0	1	0	1	0	1
8-15	0	1	0	1	0	1	0	1
16-23	0	1	0	1	0	1	0	1
24-31	0	1	0	1	0	1	0	1
32-39	0	1	0	1	0	1	0	1
40-47	0	1	0	1	0	1	0	1
48-55	22	2	0	1	32	2	74	2
56-63	100	2	0	1	100	2	100	3
64-71	100	2	0	1	100	2	100	3

[a]DDS = días después de la siembra.
[b]I = porcentaje de incidencia
[c]S = Escala de severidad; en donde: 1 = inmune, 2 = severidad menor al 5%, 3 = severidad entre 5 y 25%.

Los patrones climáticos, principalmente temperatura y precipitación, no presentan una clara relación con la infección observada en las diferentes leguminosas (Cuadro 10 y Figuras 6 y 7). La temperatura promedio en la EEA de Adjuntas durante la primera siembra de los hospederos (8 de junio 2007), fue de 23.2°C con una precipitación acumulada de 200 mm, mientras que para la segunda siembra (8 de octubre 2007), la temperatura promedio fue de 22.2°C, con una precipitación acumulada de 615 mm. Para los meses de febrero, marzo y abril del 2008, correspondientes a la tercera siembra de los hospederos (7 de febrero 2008), la temperatura promedio fue de 19.7°C con una precipitación acumulada de 320 mm, mientras que para la cuarta siembra (20 mayo del 2008), la temperatura promedio de los meses de mayo a julio del 2008 fue de 22.5°C con una precipitación acumulada de 430 mm (Cuadro 10).

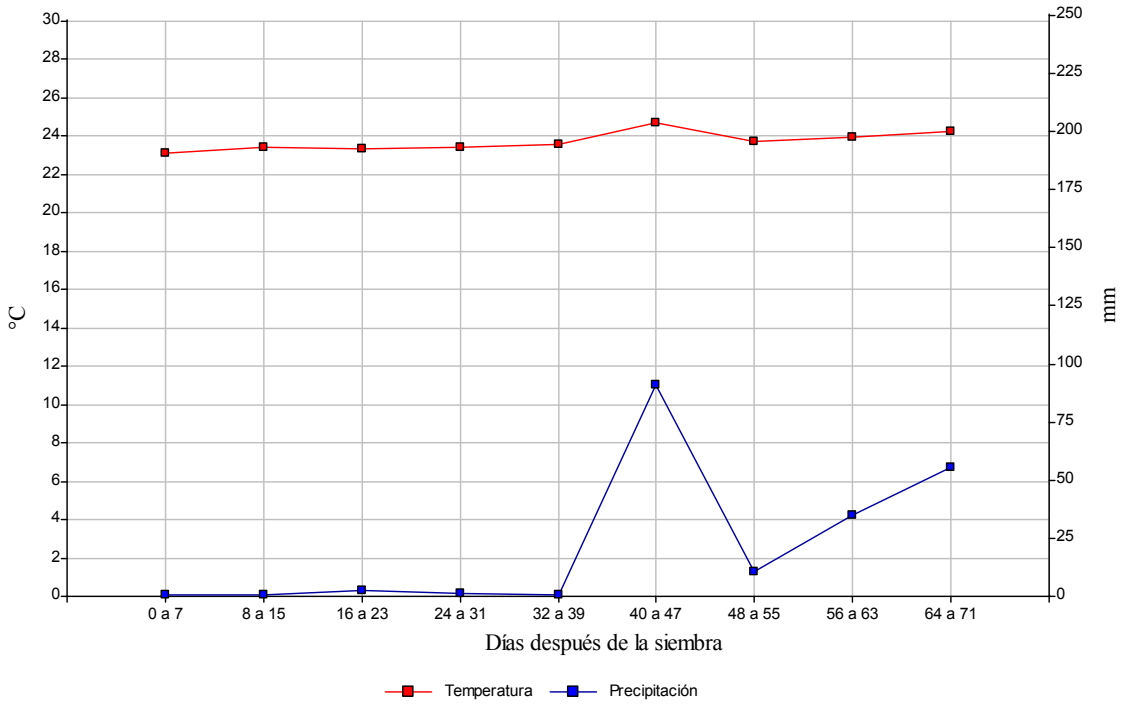

Figura 6. Temperatura (°C) y precipitación (mm) para la primera siembra de hospederos (8 de junio del 2007) en la EEA de Adjuntas.

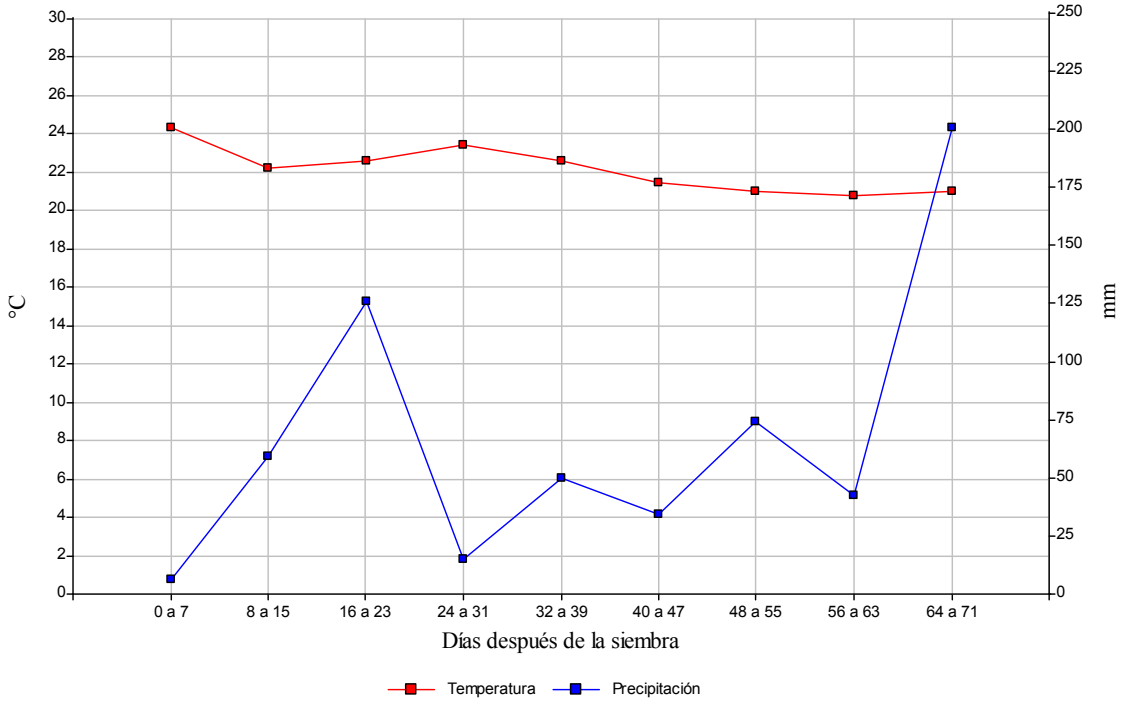

Figura 7. Temperatura (°C) y precipitación (mm) para la segunda siembra de hospederos (8 de octubre del 2007) en la EEA de Adjuntas.

La radiación solar promedio para los meses de junio a agosto del 2007 en Guilarte, zona geográficamente más cercana a la EEA de Adjuntas y ubicada a 1019 m.s.n.m, fue de 100 wat/m^2, mientras que durante la misma época, la radiación promedio en Isabela (128 m.s.n.m) y Juana Díaz (23 m.s.n.m) fue de 440 y 400 wat/m^2, respectivamente (Cuadro 14 y Figura 8). Para la segunda siembra de los hospederos (8 de octubre 2007), la radiación solar promedio en octubre, noviembre y diciembre fue de 85, 335 y 340 wat/m^2 para Guilarte, Isabela y Juana Díaz, respectivamente. Durante los meses de febrero a julio del 2008, se observó un incremento en la radiación solar promedio en las localidades de Isabela y Juana Díaz, (425 wat/m^2, para las dos localidades), mientras que en Guilarte la radiación solar se mantuvo relativamente constante, con un promedio de 100 wat/m^2. La radiación solar máxima en Guilarte para el segundo semestre del 2007, fue de 380 wat/m^2 (para el mes de julio), mientras que en Isabela fue de 1030 wat/m^2 en el mes de septiembre, y de 990 wat/m^2 en junio para Juana Díaz (Cuadros 11, 12 y 14). En la zona de Guilarte y la cordillera central de Puerto Rico (en donde se localiza la EEA de Adjuntas), la influencia de la nubosidad hace que la radiación solar sea menor en comparación con zonas de bajas altitudes (ubicación de las EEA de Isabela y Juana Díaz), en donde no existe influencia directa de dicha cordillera u otro accidente geográfico.

Cuadro 14. Radiación solar máxima y promedio en la localidad de Guilarte durante el 2007 y el 2008.

	Rad. Máxima (wat/m^2)	Rad. Prom (wat/m^2)
	2007	
Junio	371.8	95
Julio	381.9	110
Agosto	373.6	105
Septiembre	374.9	100
Octubre	356	90
Noviembre	306.9	90
Diciembre	297.8	85
	2008	
Enero	323	85
Febrero	335.7	105
Marzo	369.1	105
Abril	369.6	100
Mayo	374.9	110
Junio	356.3	95
Julio	275.7	90

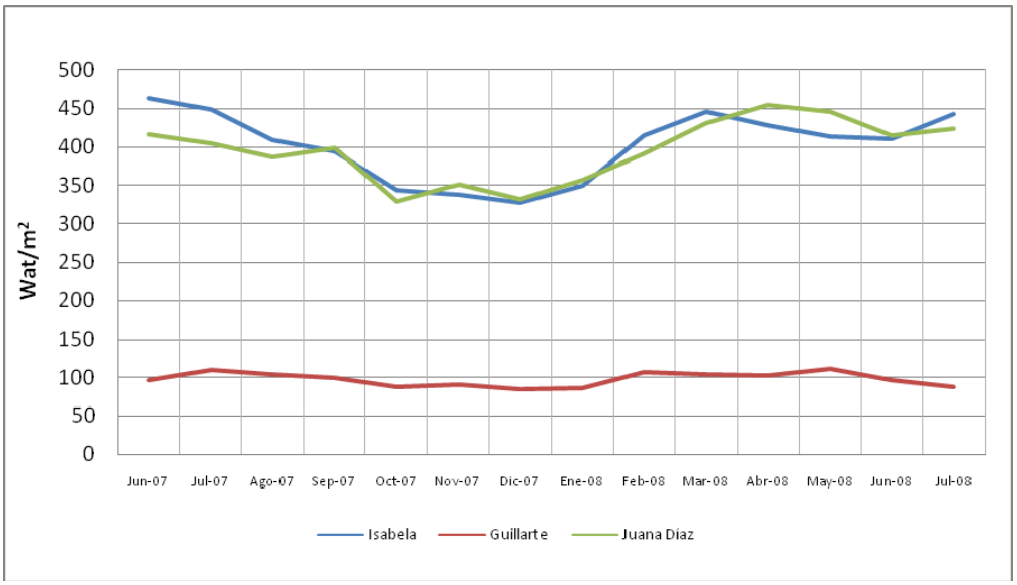

Figura 8. Radiación solar (Wat/m^2) promedio en Isabela, Guilarte y Juana Díaz, durante junio 2007 a julio 2008.

4.2. Presencia de *P. meibomiae* en hospederos silvestres de Puerto Rico

De los 14 municipios en donde se realizó el monitoreo de noviembre 2006 a junio 2008, nueve presentaron leguminosas infectadas con *P. meibomiae.* En total se monitorearon 131 especímenes de leguminosas, tanto silvestres como cultivadas, de las cuales 38, o el 29%, resultaron positivas para la roya americana de la soya, mientras 93 (71%) resultaron negativas (Cuadro 15). Durante el monitoreo realizado, no se encontraron muestras infectadas con la roya asiática de la soya, causada por el hongo *P. pachyrhizi,* información confirmada por medio de PCR (Figuras 9 y 10).

La fuente de inóculo más importante para *P. meibomiae,* lo constituyó *Lablab purpureus.* Veinte y nueve (29) de treinta y tres (33) especímenes resultaron infectados con *P. meibomiae*, siendo ésta la leguminosa silvestre más susceptible a la enfermedad. Otras especies infectadas con la roya americana fueron: *Vigna luteola, Macroptilium lathyroides, Pachyrhizus erosus, Phaseolus lunatus* y una leguminosa perteneciente al género *Vigna,* identificada mediante la secuenciación de la región ITS del rADN. El número de especímenes infectados con *P. meibomiae* en estas leguminosas fue menor al encontrado en *L. purpureus,* siendo *P. lunatus* y *V. luteola* las especies con igual número de muestras positivas (tres para cada especie), a pesar de que la relación entre muestras positivas fue mayor para *P. lunatus* (75% de sus muestras) en comparación con *V. luteola* (30% de sus muestras resultaron positivas). Una de las leguminosas de mayor distribución en Puerto Rico es *Pueraria phaseoloides*, de 20 especímenes recolectados, el 100% de los mismos resultó negativo para *P. meibomiae* (Cuadro 15).

Cuadro 15. Leguminosas monitoreadas infectadas con *P. meibomiae,* en catorce municipios de Puerto Rico durante noviembre 2006 a junio 2008.

Leguminosas	**Número de muestras con *P. meibomiae***	
	Positivas	**Negativas**
Cajanus cajan	0	2
Canavalia gladiata	0	3
Canavalia maritima	0	1
Centrosema plumieri	0	2
Chamaecrista nictitans	0	10
Clitoria ternatea	0	1
Crotalaria brevidens	0	1
Crotalaria juncea	0	1
Crotalaria retusa	0	7
Lablab purpureus	29	4
Macroptilium atropurpureum	0	1
Macroptilium lathyroides	1	17
Mucuna pruriens	0	2
Neonotonia wigthii	0	1
Pachyrhizus erosus	1	2
Phaseolus coccineus	0	1
Phaseolus lunatus	3	1
Phaseolus sp.	0	1
Pueraria phaseoloides	0	20
Rhynchosia reticulata	0	1
Teramnus sp.	0	2
Vigna luteola	3	7
Vigna sp.	1	0
Vigna unguiculata	0	3
Vigna vexillata	0	2
Total	**38**	**93**

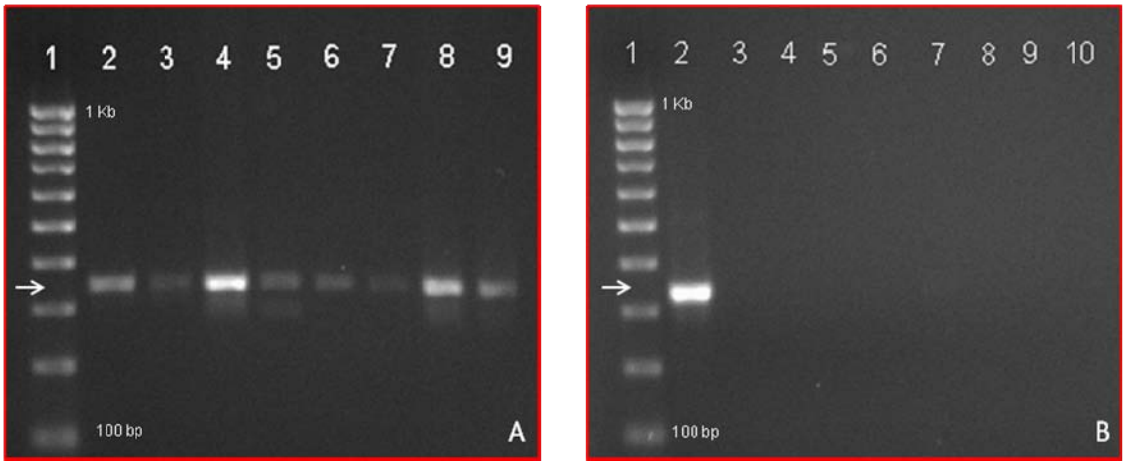

Figura 9. Gel de agarosa para la determinación de la roya de la soya en *Lablab purpureus*. A. PCR para *Pakopsora meibomiae,* utilizando los iniciadores Pme1/Pme2. 1 = escalera (100 bp), 2 = punto de monitoreo 21 (Adjuntas), 3 = punto de monitoreo 20 (Aibonito), 4 = punto de monitoreo 19 (Corozal), 5 = punto de monitoreo 26 (Adjuntas), 6 = punto de monitoreo 16 (Adjuntas), 7 = punto de monitoreo 17 (Aibonito), 8 = punto de monitoreo 22 (Barranquitas) y 9 = punto de monitoreo 25 (Jayuya). La flecha indica los productos de amplificación de PCR en 338 bp. B. PCR para *Pakopsora pachyrhizi,* utilizando los iniciadores Ppa1/Ppa2. 1 = escalera (100 bp), 2 = control positivo para *P. pachyrhizi,* 3 = punto de monitoreo 21 (Adjuntas), 4 = punto de monitoreo 20 (Aibonito), 5 = punto de monitoreo 19 (Corozal), 6 = punto de monitoreo 26 (Adjuntas), 7 = punto de monitoreo 16 (Adjuntas), 8 = punto de monitoreo 17 (Aibonito), 9 = de monitoreo 22 (Barranquitas) y 10 = punto de monitoreo 25 (Jayuya). La flecha indica el producto de amplificación de PCR en 332 bp.

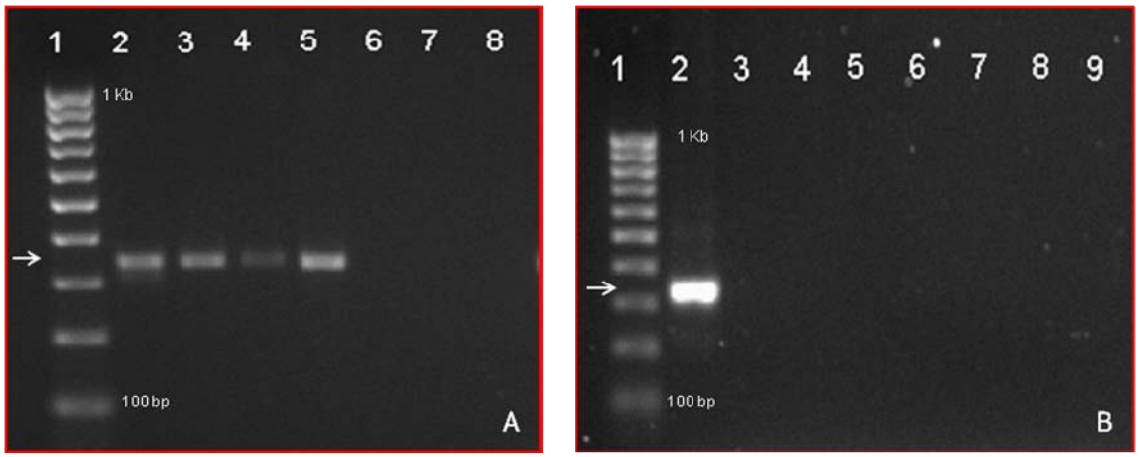

Figura 10. Gel de agarosa para la determinación de la roya americana de la soya en diferentes leguminosas. A. PCR para *Pakopsora meibomiae,* utilizando los iniciadores Pme1/Pme2. 1 = escalera (100 bp), 2 = *P. lunatus*, punto de monitoreo 5 (Isabela), 3 = *P. erosus,* punto de monitoreo 5 (Isabela), 4 = *V. luteola,* punto de monitoreo 5 (Isabela), 5 = *Vigna* sp., punto de monitoreo 32 (Adjuntas), 6 = *P. phaseoloides,* punto de monitoreo 10 (Jayuya), 7 = *C. gladiata,* punto de monitoreo 5 (Isabela), 8 = *M. pruriens,* Punto de monitoreo 21 (Adjuntas). La flecha indica los productos de amplificación de PCR en 338 bp. B. PCR para *Pakopsora pachyrhizi,* utilizando los iniciadores Ppa1/Ppa2. 1 = escalera (100 bp), 2 = control positivo para *P. pachyrhizi,* 3 = *P. lunatus*, punto de monitoreo 5 (Isabela), 4 = *P. erosus,* punto de monitoreo 5 (Isabela), 5 = *V. luteola,* punto de monitoreo 5 (Isabela), 6 = *Vigna* sp., punto de monitoreo 32 (Adjuntas), 7 = *P. phaseoloides,* punto de monitoreo 10 (Jayuya), 8 = *C. gladiata,* punto de monitoreo 5 (Isabela), 9 = *M. pruriens,* Punto de monitoreo 21 (Adjuntas). La flecha indica el producto de amplificación de PCR en 332 bp.

Del total de muestras positivas, el 76% correspondió a *L. purpureus,* siendo la leguminosa con mayor especímenes infectados con la roya americana. *Phaseolus lunatus* y *V. luteola,* fueron el segundo grupo de leguminosas con mayor número de especímenes infectados (8% cada una). El menor porcentaje de muestras infectadas perteneció al grupo conformado por *M. lathyroides, P. erosus* y *Vigna* sp. (una muestra positiva para cada especie) (Figura 11).

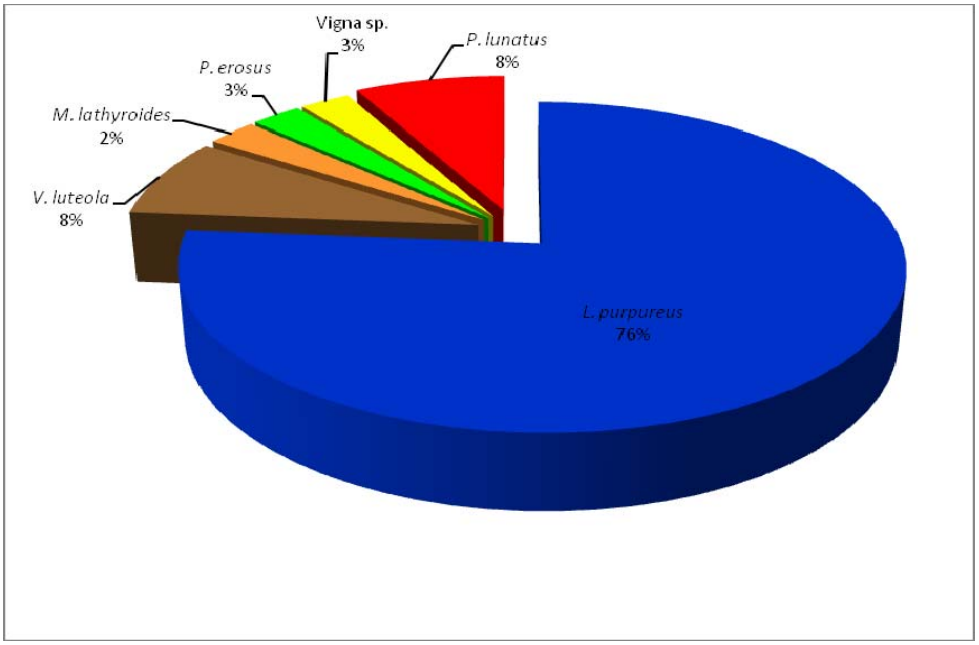

Figura 11. Distribución porcentual de muestras infectadas con *P. meibomiae,* de acuerdo al tipo de leguminosas identificadas, durante el monitoreo del 2006 al 2008.

El patrón de infección de *P. meibomiae* en *L. purpureus* fue irregular. Las hojas inferiores, normalmente cubiertas con vegetación, en donde la sombra cubría gran parte de la canopia de la planta, en su mayoría se observaron infectadas. En los sitios en donde se observó infección, se encontraron plantas de *L purpureus* inmunes al patógeno, a pesar de que el inóculo estuvo presente, posiblemente debido a una variabilidad genética del hospedero. En la misma planta se observaron foliolos libres de

enfermedad, en ramas en donde se encontraron foliolos con escala de severidad de 5 (mayor al 51%).

El mayor número de muestras infectadas con *P. meibomiae* se encontró en Adjuntas, con un 37% de muestras positivas. Los municipios de Isabela, Jayuya y Utuado obtuvieron un 16, 13 y 13% de muestras positivas, respectivamente, siendo los segundos y terceros en mayor abundancia. En Isabela, el número de muestras positivas provino de la EEA, en donde se encontró la leguminosa silvestre *V. luteola* y las leguminosas cultivadas *L. purpureus, P. lunatus* y *P. erosus*. Para el caso de *P. lunatus,* durante el monitoreo realizado el 8 de abril del 2008, se observó infección en los cultivares Christmas y Neeve. Estos son materiales provenientes de Estados Unidos, mientras que en una accesión local no se observó infección, a pesar de que dichos materiales se encontraron sembrados en forma contigua y en la misma fecha (Cuadro 16 y Figura 12). En los municipios de Mayagüez, Juana Díaz, Villalba, Orocovis y Naranjito, no se observaron muestras infectadas con *P. meibomiae*.

Cuadro 16. Leguminosas infectadas con *L. purpureus,* distribuidas por municipios monitoreados durante 2006 a 2008.

Leguminosa	**Municipio**	**Número de muestras con *P. meibomiae***
Lablab purpureus	Adjuntas	11
Phaseolus lunatus	Adjuntas	1
Macroptilium lathyroides	Adjuntas	1
Vigna sp.	Adjuntas	1
Lablab purpureus	Aibonito	3
Lablab purpureus	Barranquita	1
Lablab purpureus	Corozal	2
Lablab purpureus	Isabela	1
Vigna luteola	Isabela	2
Phaseolus lunatus	Isabela	2
Pachyrhizus erosus	Isabela	1
Lablab purpureus	Jayuya	4
Vigna luteola	Jayuya	1
Lablab purpureus	Moroviz	1
Lablab purpureus	Ponce	1
Lablab purpureus	Utuado	5

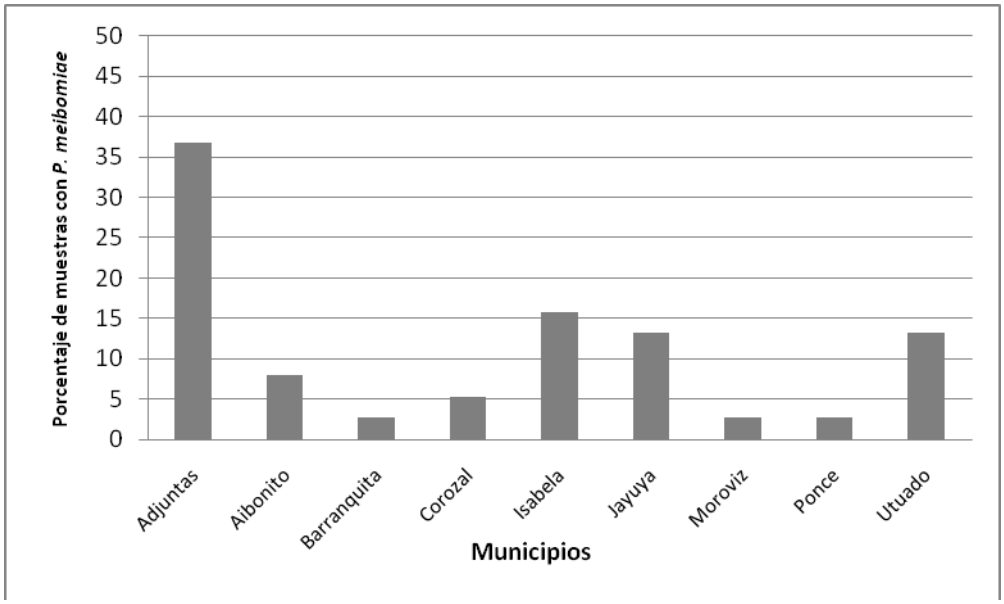

Figura 12. Distribución porcentual de leguminosas infectadas con *P. meibomiae,* de acuerdo a su municipio, durante 2006 a 2008.

El 37% de las muestras positivas para la roya americana se localizó entre los 501 y 600 m.s.n.m, manteniendo una distribución bimodal (Figura 13 y Cuadro 17). A una altitud superior a los 700 m.s.n.m no se observaron especímenes infectados con la enfermedad, mientras que entre los 101 y 200 m se identificaron 6 leguminosas infectadas, de las cuales una fue *L. purpureus*. Evidentemente, este número de especímenes provino de la zona de Isabela, en donde se ubica la EEA, y dada la gran diversidad de leguminosas cultivadas, el número de especímenes infectados fue moderado (seis en total). Debido a la gran cantidad de muestras positivas con roya americana en *L. purpureus,* en relación con el número total de leguminosas (76% del total de leguminosas, Figura 11), era de esperarse la similaridad de su distribución en función de la altitud, en comparación con el total de leguminosas. Sin embargo, el tipo de distribución es unimodal, en comparación con la bimodalidad de la distribución del total de las leguminosas. La diferencia en la tendencia de la distribución provino de la zona de Isabela, con una mayor diversidad de leguminosas infectadas con la enfermedad.

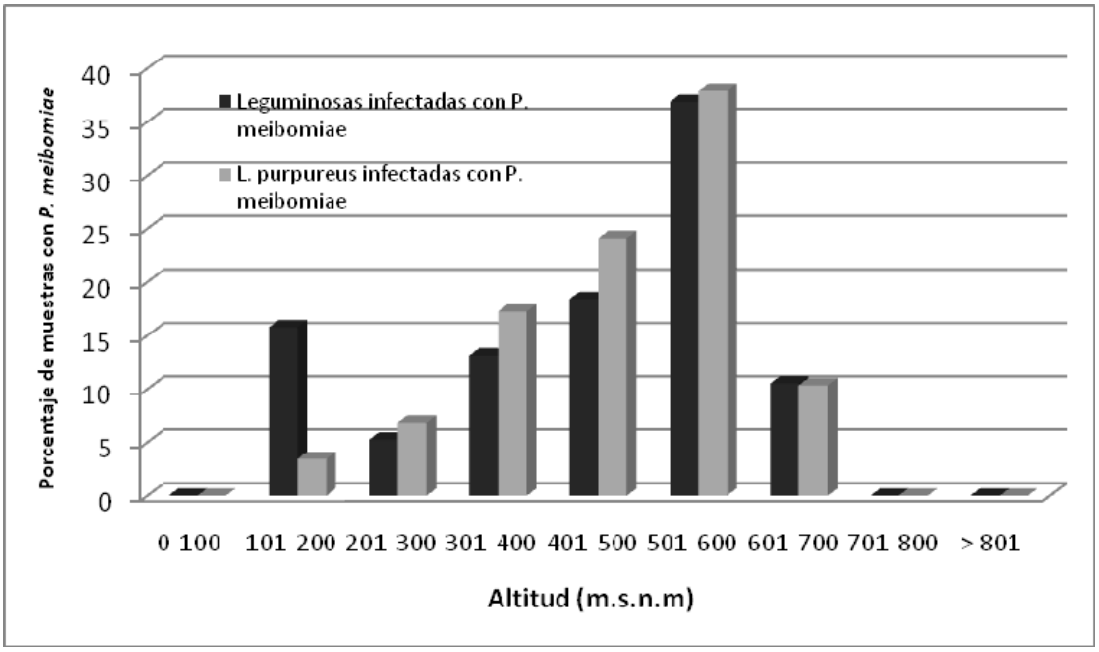

Figura 13. Distribución de muestras infectadas con *P. meibomiae,* en función de su altitud durante el 2006 al 2008.

Cuadro 17. Número de leguminosas infectadas con *P. meibomiae,* en función de su altitud durante el 2006 al 2008.

Altitud (m.s.n.m)	**Número de plantas infectadas con *P. meibomiae***					
	V. luteola	***P. lunatus***	***M. lathyroides***	***P. erosus***	***Vigna* sp.**	***L. purpureus***
0 a 100	0	0	0	0	0	0
101 a 200	2	2	0	1	0	1
201 a 300	0	0	0	0	0	2
301 a 400	0	0	0	0	0	5
401 a 500	0	0	0	0	0	7
501 a 600	0	1	1	0	1	11
601 a 700	1	0	0	0	0	3
701 a 800	0	0	0	0	0	0
Mayor a 801	0	0	0	0	0	0

4.3. Descripción de *Phakopsora meibomiae* en *Lablab purpureus* y otras leguminosas

Se observaron dos tipos de lesiones prevalecientes en *Lablab purpureus:* las lesiones conocidas como tipo TAN y las lesiones RB (café rojizo). En el haz de las hojas que presentaron la reacción TAN, se observaron lesiones café rojizas con bordes café obscuro. En el envés, las lesiones fueron poligonales, tipo regular, de tono rojo bronceado con presencia de pústulas pulverulentas crema con bordes rojizos entremezcladas con pústulas globosas de coloración crema claro. En el haz de las lesiones RB, las manchas fueron café rojizas con bordes café obscuro y centro más intenso, normalmente rodeado de un borde clorótico. En el envés se observaron lesiones poligonales de coloración café rojizo y borde obscuro con presencia de pústulas globosas de tono crema claro. En este tipo de lesiones se observaron una gran cantidad de lesiones aisladas, mientras que en las lesiones TAN, estas se unieron y formaron grandes zonas irregulares (Figura 14).

La longitud promedio de las lesiones evaluadas en 16 aislados fue de 0.72 mm, con un largo máximo de 0.92 mm (aislado LP13) y un mínimo de 0.60 mm (aislado LP6); mientras que su ancho promedio fue de 0.54 mm, con una valor máximo de 0.68 mm, para el aislado LP10, y un valor mínimo de 0.41 mm, para el aislado LP9 (Cuadro 18). La incidencia de la enfermedad fluctuó entre un 20% (aislado proveniente de Utuado) a un 90% (aislado proveniente de Jayuya), con una escala de severidad de 2 a 5, lo que demuestra la gran variabilidad en los índices de infección encontrados. En las lesiones RB, el número máximo de uredos por lesión individual fue de hasta dos, mientras que en las lesiones TAN su número máximo fue de hasta cinco. El número promedio de uredos por cm^2 fue de 31.6, con un valor máximo de 89.3 (aislado LP15), y un valor mínimo de 0.2, para los aislados LP11 y LP13. Al realizar este análisis, se

observó una gran variabilidad en los datos obtenidos, lo que se expresó en los altos valores de desviación estándar.

La gran variabilidad observada también se reflejó en el número de uredosporas por uredo. El promedio para los aislados de *L. purpureus* fue de 118.8 uredosporas/uredo, con un valor máximo de 211.2 (aislado LP8 de Barranquita), y un valor mínimo de 35 (aislado LP12 de Adjuntas). Para los aislados LP11 y LP13, debido a su reducido número de uredos (0.17/cm^2 para cada uno), no fue posible determinar este parámetro. El número de uredosporas/uredo se estableció en aislados provenientes de leguminosas silvestres, por tal razón no se pudo identificar la etapa de infección de las mismas. No obstante, la selección de los uredos fue bajo criterios similares en forma y estructura para todos los casos.

Las uredosporas observadas presentaron una forma de ovoide a elipsoidal, hialinas, con ornamentación. El largo promedio de dichas uredosporas fue de 23.53 µm, con un valor máximo de 25.09 (aislado LP14) y un valor mínimo de 20.36 µm (aislado LP12), mientras que el valor promedio de su ancho fue de 17.53 µm, con un valor máximo de 19.46, para el aislado LP8, y un valor mínimo de 16.23, para el aislado LP12. A diferencia del número de uredos por cm^2, y el número de uredosporas por uredo, el tamaño de las uredosporas (en términos de largo y ancho), presentaron una menor variabilidad (Cuadro 18 y Figura 16).

Cuadro 18. Descripción morfológica de 16 aislados de *Lablab purpureus* infectados con *P. meibomiae*, provenientes del monitoreo realizado durante 2006 al 2008.

Aislado	Municipio	Incidencia[a]	Severidad[b]	#Uredos/lesión[c]	Diámetro de lesión[d] (mm)		Tipo de reacción	# Uredos/cm^2[e]	# Uredosporas /uredo[f]	Tamaño de uredosporas (µm)[g]	
					Largo	Ancho				Largo	Ancho
LP1	Adjuntas	30	4	1 a 3	0.605	0.427	TAN	24.17 ± 19.84	61.00 ± 32.62	22.96 ± 4.15	16.53 ± 1.57
LP2	Utuado	20	4	0 a 4	0.700	0.520	TAN	16.00 ± 12.77	143.60 ± 86.66	24.26 ± 2.43	16.36 ± 2.19
LP3	Adjuntas	40	5	0 a 5	0.725	0.585	TAN	24.83 ± 19.11	73.20 ± 20.67	21.87 ± 1.23	19.44 ± 1.18
LP4	Corozal	75	3	1 a 5	0.680	0.480	TAN	64.67 ± 25.72	189.00 ± 39.83	24.39 ± 2.98	17.04 ± 2.01
LP5	Aibonito	75	4	1 a 5	0.665	0.512	TAN	30.50 ± 11.11	94.20 ± 38.82	22.64 ± 1.90	17.58 ± 1.35
LP6	Adjuntas	50	3	0 a 3	0.600	0.450	TAN	34.50 ± 12.05	167.20 ± 27.12	23.63 ± 2.51	17.24 ± 1.77
LP7	Aibonito	70	3	1 a 3	0.670	0.610	TAN	30.33 ± 11.13	191.20 ± 68.23	24.42 ± 2.31	17.78 ± 1.25
LP8	Barranquita	20	2	1 a 3	0.797	0.610	TAN	55.50 ± 42.08	211.20 ± 63.05	23.90 ± 3.51	19.46 ± 1.60
LP9	Corozal	65	3	0 a 2	0.670	0.412	RB	5.17 ± 2.79	102.60 ± 41.94	23.33 ± 2.40	18.06 ± 1.80
LP10	Jayuya	45	3	1 a 3	0.882	0.680	TAN	56.17 ± 33.71	102.60 ± 35.10	23.97 ± 2.76	17.32 ± 2.47
LP11	Jayuya	30	2	0 a 1	0.662	0.450	RB	0.17 ± 0.41	-	-	-
LP12	Adjuntas	30	3	1 a 4	0.815	0.612	TAN	9.67 ± 14.57	35.00 ± 18.34	20.36 ± 2.44	16.23 ± 2.20
LP13	Moroviz	20	2	0 a 1	0.922	0.642	RB	0.17 ± 0.41	-	-	-
LP14	Adjuntas	20	4	0 a 5	0.695	0.510	TAN	39.67 ± 21.19	108.00 ± 51.78	25.09 ± 2.56	17.30 ± 1.30
LP15	Jayuya	90	3	0 a 3	0.770	0.620	TAN	89.33 ± 39.02	83.40 ± 37.56	24.55 ± 2.67	17.00 ± 1.76
LP16	Isabela	20	2	0 a 3	0.620	0.490	TAN	25.33 ± 17.29	100.60 ± 45.08	24.54 ± 1.95	18.08 ± 1.34

[a]Relación porcentual entre el número de foliolos infectados con roya y el total de foliolos en tres ramas seleccionadas al azar.
[b]Escala de severidad en donde; 1 = inmune, 2 = severidad menor al 5%, 3 = severidad entre 5 y 25%, 4 = severidad entre 26 y 50%, 5 = severidad mayor al 51%.
[c]Rangos tomados de 20 lesiones individuales.
[d]Promedio de 10 lesiones individuales.
[e]Promedio y desviación estándar de 6 lecturas.
[f]Promedio y desviación estándar de 5 lecturas.
[g]Promedio y desviación estándar de 20 lecturas.

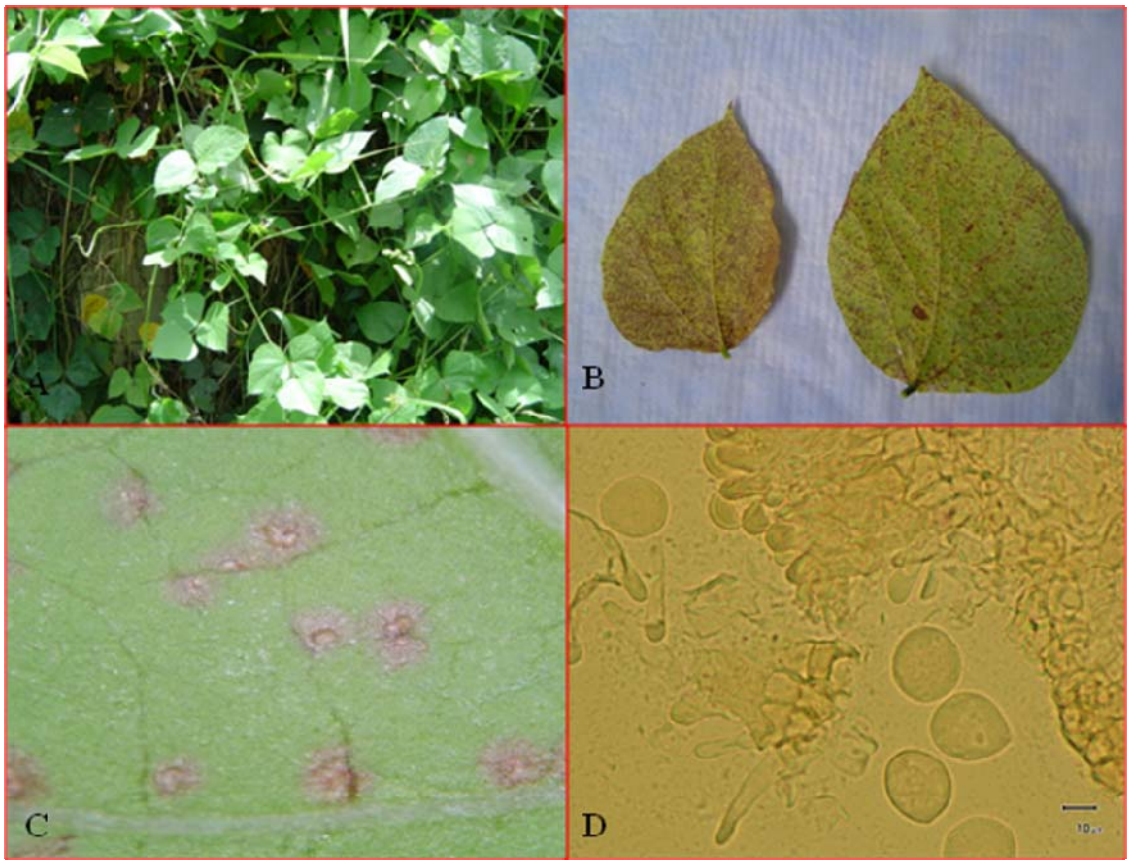

Figura 14. A. *Lablab purpureus* localizado en Corozal. B. Hojas infectadas con *P. meibomiae,* severidad de 5, provenientes de la zona de Adjuntas. C. Lesiones RB en *L. purpureus,* producidos por *P. meibomiae* (20X). D. Presencia de uredosporas y paráfisis de *P. meibomiae* (400 X).

Para el caso de *Phaseolus lunatus,* las lesiones observadas en el haz de la hoja fueron regulares, intervenales, de una coloración rojiza negruzca, mientras que en el envés las lesiones fueron rojo púrpuras con un tono bronceado y presencia de pústulas crema de aspecto pulverulentas y tipo globoso, reacción tipo TAN. La longitud de la lesión varió de 0.65 a 0.68 mm, y con diámetro de 0.45 mm (para los aislados de Adjuntas e Isabela) (Cuadro 19). El número promedio de uredos por cm^2 varió entre 9.8 y 21.2, mientras que el número promedio de uredosporas por uredo fluctúo entre 76.6 y 93.4. Morfológicamente, las uredosporas observadas tuvieron la misma forma y

estructura que las encontradas en *L. purpureus,* con una largo promedio que varió entre 23.64 y 24.20 µm, y un ancho de 17.86 a 18.06 µm (Figura 15C).

Las lesiones observadas en *Pachyrhizus erosus* fueron de coloración café rojizas con un ligero tono bronceado. En etapas avanzadas, la lesión se tornó café negruzco con bordes obscuros y centro más claro. Las pústulas observadas fueron escasas y presentaron una tonalidad crema obscura. En el aislado de *P. erosus* procedente de Isabela (PE), las lesiones observadas presentaron una dimensión promedio de 0.72 por 0.54 mm, con un número promedio de 3.7 uredos por cm^2, y un promedio de 7.3 uredosporas por uredo. Las uredosporas tuvieron una dimensión promedio de 22.11 por 18.08 µm, con similares características descritas en *L. purpureus* y *P. lunatus,* (Cuadro 19 y Figura 15A).

En *Vigna luteola,* las lesiones observadas en el haz fueron de coloración café rojizas con bordes negruzcos, de tipo poligonal, regular. En el envés de las hojas las lesiones tomaron una coloración café rojizas con bordes café obscuro. Las pústulas observadas fueron pulverulentas de coloración crema. El tamaño promedio de la lesión, evaluada en el aislado VL proveniente de Jayuya, fue de 0.84 mm de largo por 0.65 mm de ancho. Se contabilizaron un promedio de 13.3 uredos por cm^2 y un promedio de 119.2 uredosporas por uredo. Se observaron uredosporas de tipo ovoide a elipsoidal, hialinas y con ornamentación, con una longitud promedio de 23.53 por 18.08 µm. En los parámetros de uredos por cm^2 y uredosporas por uredo, se observó una alta variabilidad (Cuadro 19 y Figura 15D).

Cuadro 19. Descripción morfológica de diferentes leguminosas infectados con *P. meibomiae*, provenientes del monitoreo realizado durante 2006 al 2008.

Leguminosa	Aislado	Municipio	Severidad[a]	Diámetro de lesión[b] (mm)		Tipo de reacción	# Uredos/cm^2 [c]	# Uredosporas /uredo[d]	Tamaño de uredosporas (µm)[e]	
				Largo	Ancho				Largo	Ancho
P. luntaus	PL1	Adjuntas	3	0.680	0.450	TAN	21.17 ± 20.74	76.60 ± 34.36	24.20 ± 3.22	17.86 ± 1.67
P. luntaus	PL2	Isabela	3	0.653	0.448	TAN	9.83 ± 7.96	93.40 ± 14.94	23.64 ± 3.38	18.06 ± 1.95
P. erosus	PE	Isabela	2	0.725	0.545	RB	3.67 ± 5.54	7.33 ± 0.58	22.11 ± 3.77	18.08 ± 2.94
Vigna sp.	VI	Adjuntas	3	0.565	0.420	TAN	5.67 ± 3.21	85.67 ± 31.97	22.07 ± 2.67	17.56 ± 2.73
V. luteola	VL	Jayuya	3	0.837	0.647	TAN	13.33 ± 14.39	119.20 ± 79.94	23.53 ± 2.91	18.08 ± 1.56

[a]Escala de severidad en donde; 1 = inmune, 2 = severidad menor al 5%, 3 = severidad entre 5 y 25%, 4 = severidad entre 26 y 50%, 5 = severidad mayor al 51%.
[b]Promedio de 10 lesiones individuales.
[c]Promedio y desviación estándar de 6 lecturas.
[d]Promedio y desviación estándar de 5 lecturas.
[e]Promedio y desviación estándar de 20 lecturas.

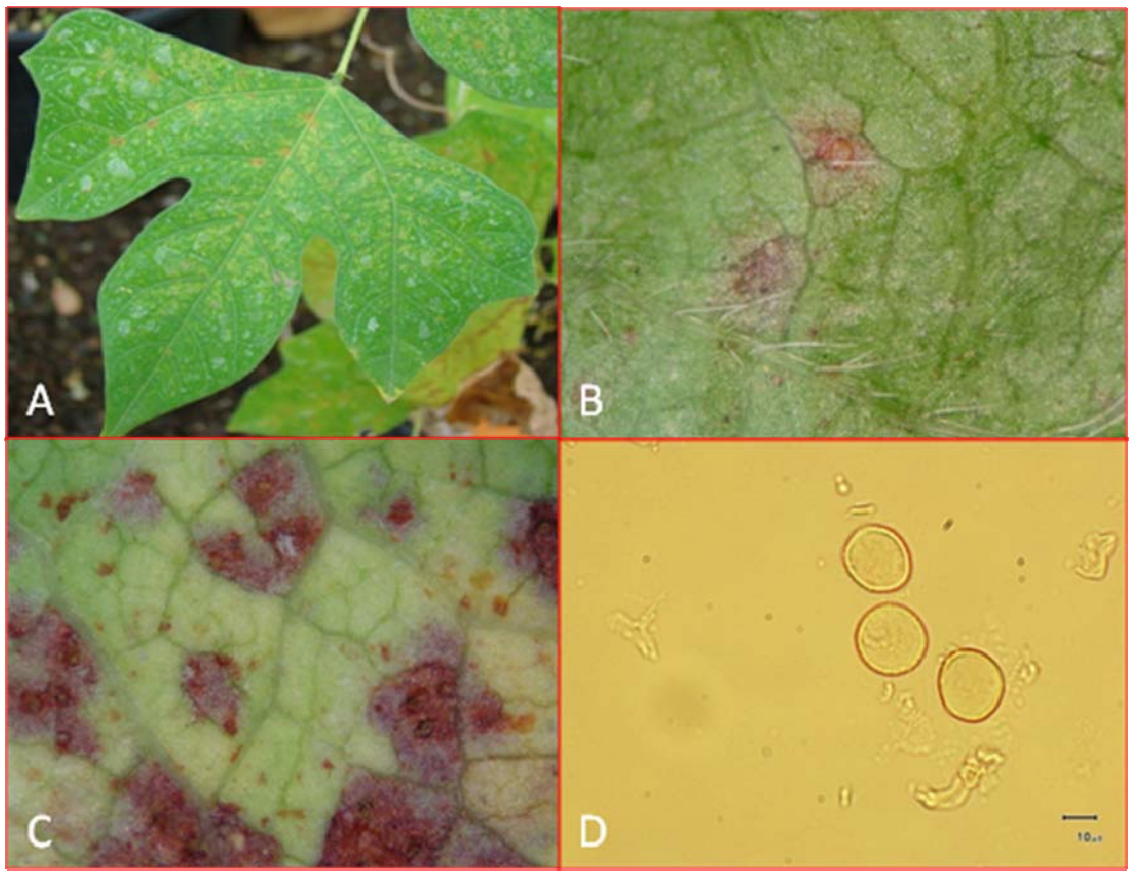

Figura 15. A. Hoja de *Pachyrhizus erosus* infectada con *P. meibomiae.* B. Lesiones producidas por *P. meibomiae* en *Vigna* sp., proveniente de Adjuntas (50X). C. Lesiones tipo TAN sobre *P. lunatus* (30X). D. Uredosporas de *P. meibomiae,* provenientes de corte de uredo de *V. luteola* (400X).

Vigna sp., presentó lesiones de coloración café negruzcas con bordes obscuros y centro claro, en el haz de la hoja; mientras que en el envés, las lesiones presentaron una coloración café rojiza, con pústulas pequeñas de coloración café claro y bordes obscuros. Las lesiones se presentaron sobre los márgenes de la nervadura secundaria y primaria. El tamaño promedio de la lesión, para el aislado VI procedente de Adjuntas, fue de 0.56 por 0.42 mm. Se observó un número reducido de uredos por cm^2, con un promedio de 5.7. El número promedio de uredosporas por uredo fue de 85.7, mientras

que el tamaño promedio de las uredosporas fue de 22.07 µm de largo por 17.56 µm de ancho (Cuadro 19 y Figura 15B).

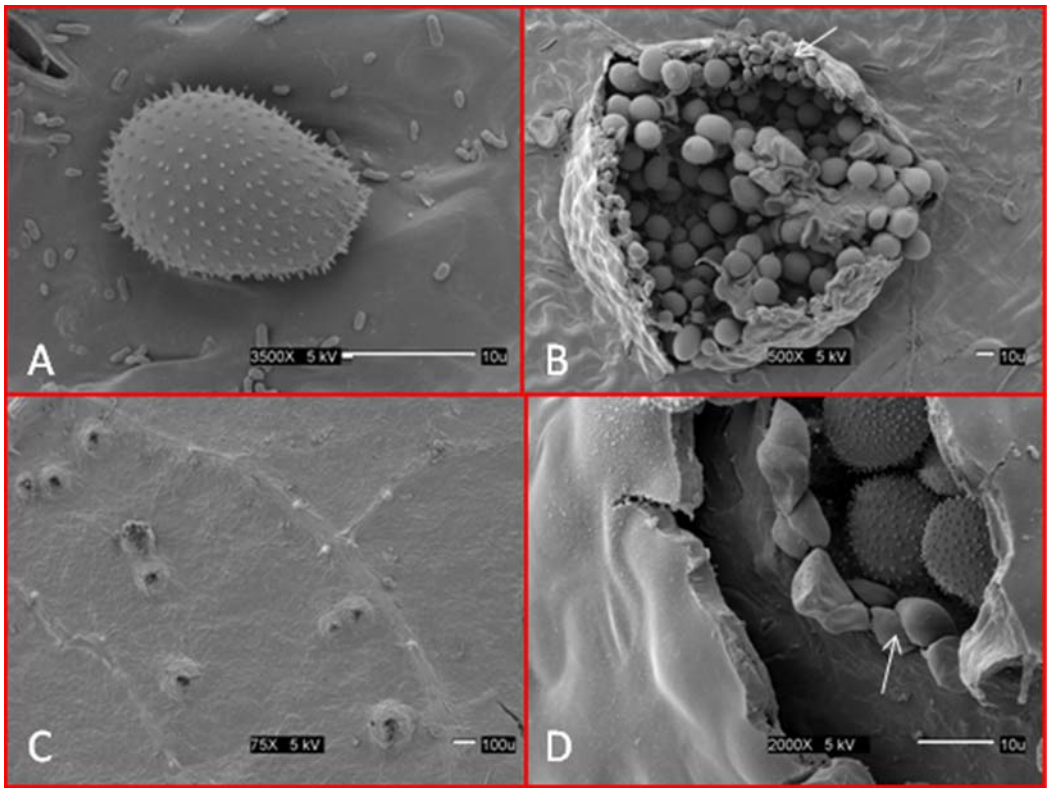

Figura 16. Microscopía Electrónica de Rastreo para *P. meibomiae.* A. Uredospora en *L. purpureus* (3500X). B. Abertura de uredo, liberación de uredosporas y presencia de paráfasis en *L. purpureus* (500X). C. Distribución de uredos en el envés de la hoja de *L. purpureus* (75X). D. Ruptura de epidermis durante la liberación de uredosporas en *P. lunatus* (2000X). La flecha señala la paráfisis.

De acuerdo a los resultados obtenidos, la distribución, tamaño y características de los uredos de *P. meibomiae* dependió de la interacción con su hospedero. En *L. purpureus,* se observó un gran número de uredos distribuidos en el envés de la hoja, en donde se presentaron diferentes niveles de aberturas (desde completamente abiertas, hasta uredos con presencia de poro con diámetro pequeño) y diferente nivel de producción de uredosporas dentro de cada uredo (Figura 16C). Para el caso de *P. erosus,* el nivel de producción de uredos fue bajo al igual que su producción de uredosporas (Cuadro 19 y Figuras 17A y 17C). La influencia de la infección de *P.*

meibomiae es marcada en la estructura citológica de la planta, ya que la zona cercana a la lesión (zona en donde se encuentran los uredos) presentó una desintegración de su estructura celular (Figura 17A).

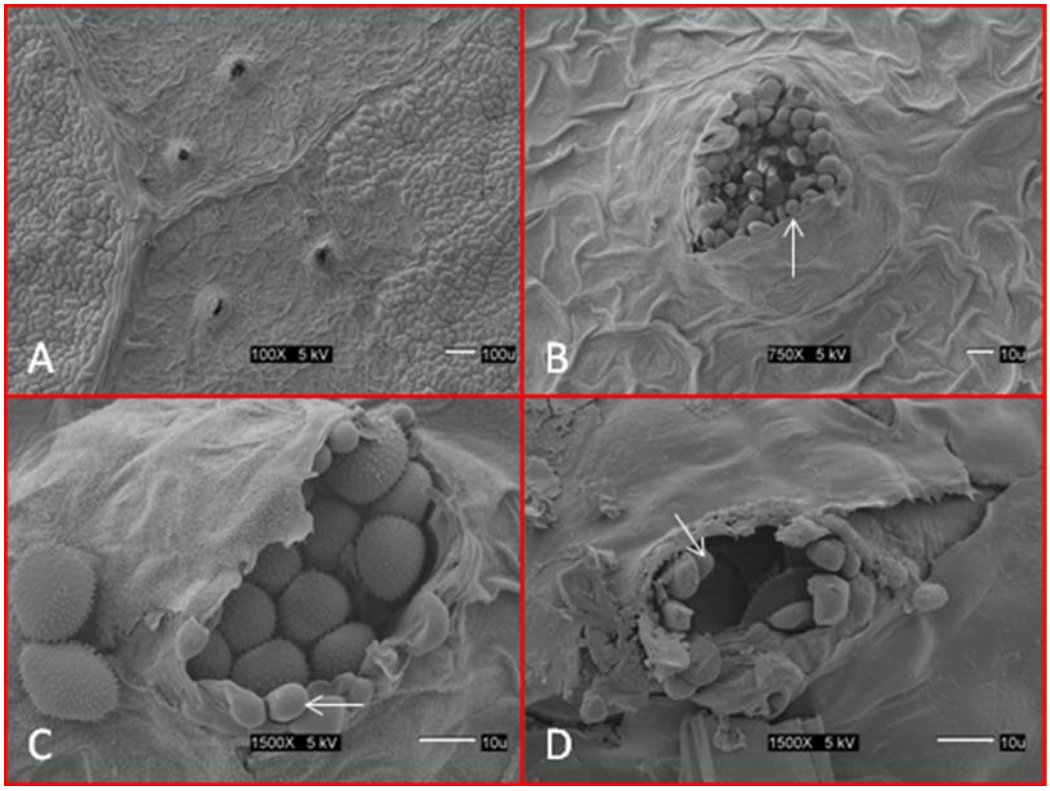

Figura 17. Microscopía Electrónica de Rastreo para *P. meibomiae.* A. Estructura citológica de *P. erosus* en tejido infectado y sano (100 X). B. Presencia de paráfisis y abertura de uredo en *P. erosus* (750 X). C. Abertura de uredo y liberación de uredosporas en *P. erosus* (1500 X). D. Ruptura de epidermis y presencia de paráfisis en uredo de *V. luteola* (1500 X). La flecha señala la paráfisis.

La ruptura de la epidermis de la hoja, para la liberación de las uredosporas, fue mucho más pronunciada en *P. lunatus* y *V. luteola*, en comparación con *P. erosus.* Para el caso de *P. lunatus*, la epidermis presentó un diámetro de 3 µm (Figuras 16D, 17C y 17D). La paráfisis se ubicó en las paredes interiores del uredo y se observó con mayor abundancia en aquellos que presentaron una menor esporulación y un diámetro reducido (figura 17B y 17D).

Con la prueba de ELISA para la identificación de la roya asiática de la soya, *P. pachyrhizi,* se detectaron falsos positivos para *P. meibomiae*, ya que muestras infectadas con roya americana de la soya resultaron positivas para roya asiática (Cuadro 20). En forma cualitativa, se observaron reacciones positivas para *L. purpureus* provenientes de los sitios de monitoreo 2, 4 y 6, mientras que produjo una reacción intermedia para *P. erosus* proveniente de la EEA de Isabela. La reacción fue negativa para *V. luteola, M. lathyroides, G. max*, *P. phaseoloides* y para *L. purpureus* procedente de Adjuntas, sitio de monitoreo 1.

Cuadro 20. Prueba de ELISA para la identificación de *P. pachyrhizi* en leguminosas monitoreadas durante el 2006 al 2008.

Leguminosa	**Sitio de monitoreo**	**Municipio**	**Reacción ELISA[a]**
Control positivo			+
L. purpureus	2	Adjuntas	+
L. purpureus	1	Adjuntas	-
L. purpureus	4	Adjuntas	+
V. luteola	2	Adjuntas	-
M. lathyroides	1	Adjuntas	-
G. max	21	Adjuntas	-
P. phaseoloides	4	Adjuntas	-
P. erosus	5	Isabela	+/-
P. phaseoloides	5	Isabela	-
G. max	5	Isabela	-
L. purpureus	6	Utuado	+
Control negativo			-

[a] + = Reacción positiva, - = Reacción negativa, +/- = Reacción intermedia.

4.4. Rango de hospederos para *P. meibomiae*

De las quince especies de leguminosas evaluadas, once presentaron susceptibilidad a la roya americana de la soya. *Canavalia gladiata, C. brevidens, M. pruriens* y *P. phaseoloides* fueron inmunes, mientras que *C. juncea, C. retusa, G. max* (Línea 2053 A, y cultivar Williams), *L. purpureus, M. lathyroides, P. erosus, P. lunatus, P. vulgaris* (cultivar Verano)*, R. reticulata, V. luteola* y *V. unguiculata* presentaron susceptibilidad, datos confirmados utilizando PCR (Figura 18). El período de incubación más corto se observó en *P. vulgaris* y *P. lunatus* con 3.23 y 3.29 días, respectivamente, a pesar de que *V. unguiculata* con 3.33 días presentó un período de incubación cercano a estas dos especies.

La leguminosa con el período de incubación más largo fue *C. retusa* (6.22 días), seguido de *R. reticulata* y *P. erosus* con 6.00 y 5.94 días, respectivamente (Cuadro 21 y Figura 19). Para el caso de *G. max,* su período de incubación fue de 4.52 y 4.92 días para el cultivar Williams y la línea 2053 A, respectivamente. El período de latencia más corto fue para *P. vulgaris* y para *P. lunatus* con 6.27 y 6.40 días, respectivamente, seguidos por *M. lathyroides* y *L. purpureus* con 6.86 y 6.95 días, respectivamente. El período de latencia más largo se observó en *R. reticulata* con 11.00 días, seguido por *V. unguiculata* con 10.95 días. En el caso de la soya, tanto para el cultivar Williams como para la línea 2053 A, su período de latencia fue uno de los más largos con 10.39 y 10.92 días, respectivamente (Cuadro 21 y Figura 19). El reducido número de plantas evaluadas para especies como *R. reticulata, P. phaseoloides* y *C. retusa,* se debió a la baja calidad de la semilla y la difícil obtención de plantas sanas disponibles para el experimento después de 21 días de su siembra.

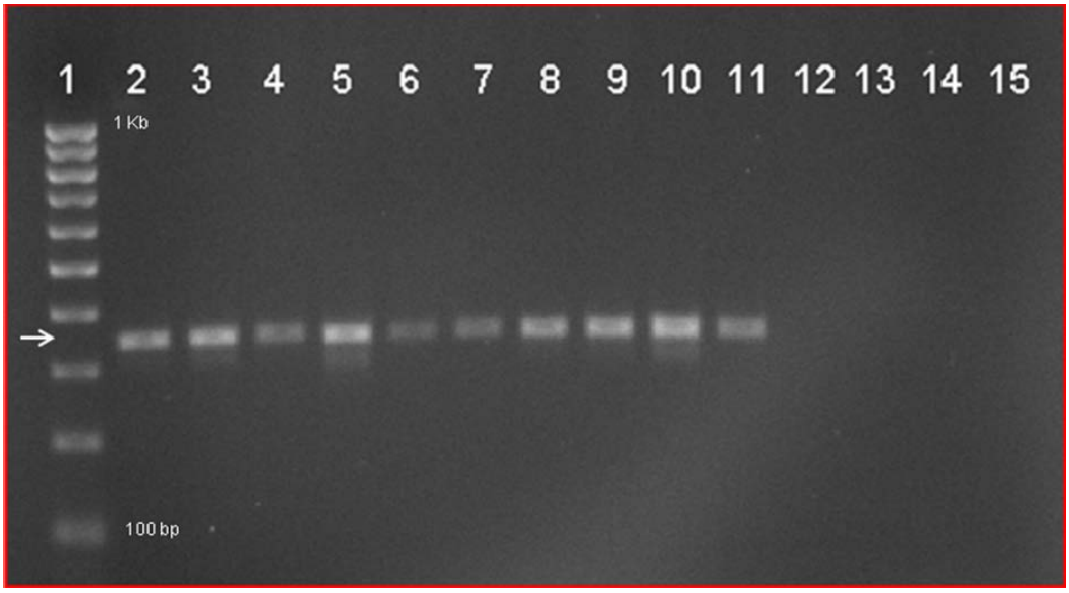

Figura 18. Gel de agarosa para la determinación de *Phakopsora meibomiae,* en el estudio de rango de hospederos, utilizando PCR con los iniciadores Pme1/Pme2. 1 = escalera (100 bp), 2 = *L. purpureus,* 3 = *P. lunatus*, 4 = *G. max*, 5 = *P. vulgaris*, 6 = *V. luteola*, 7 = *P. erosus*, 8 = *M. lathyroides*, 9 = *V. unguiculata,* 10 = *C. retusa,* 11 = *C. juncea,* 12 = *P. phaseoloides,* 13 = *M. pruriens,* 14 = *C. gladiata,* 15 = *C. brevidens.* La flecha indica los productos de amplificación de PCR en 338 bp.

Cuadro 21. Período de incubación y de latencia para *P. meibomiae,* en la evaluación de 15 especies de leguminosas bajo condiciones de vivero.

Hospedero	**n[a]**	**Período de incubación (días)**		**n[a]**	**Período de latencia (días)**	
		Promedio	**D.E[b]**		**Promedio**	**D.E[b]**
Canavalia gladiata	21	-	-	21	-	-
Crotalaria brevidens	15	-	-	15	-	-
Crotalaria juncea	31	3.65	0.91	9	10.44	1.59
Crotalaria retusa	9	6.22	1.20	5	9.60	0.55
Glycine max 2053 A	13	4.92	0.49	13	10.92	0.76
Glycine max Williams	21	4.52	0.51	18	10.39	1.50
Lablab purpureus	21	3.52	0.51	20	6.95	0.94
Macroptilium lathyroides	31	4.52	0.77	28	6.86	0.80
Mucuna pruriens	22	-	-	22	-	-
Pachyrhizus erosus	17	5.94	1.03	8	10.75	1.39
Phaseolus lunatus	21	3.29	0.46	20	6.40	0.60
Phaseolus vulgaris	22	3.23	0.53	22	6.27	0.55
Pueraria phaseoloides	5	-	-	5	-	-
Rhynchosia reticulata	2	6.00	0.00	2	11.00	0.00
Vigna luteola	37	3.38	0.64	34	7.76	1.56
Vigna unguiculata	21	3.33	0.48	20	10.95	1.05

[a]n = número de plantas evaluadas.
[b]D.E = desviación estándar.

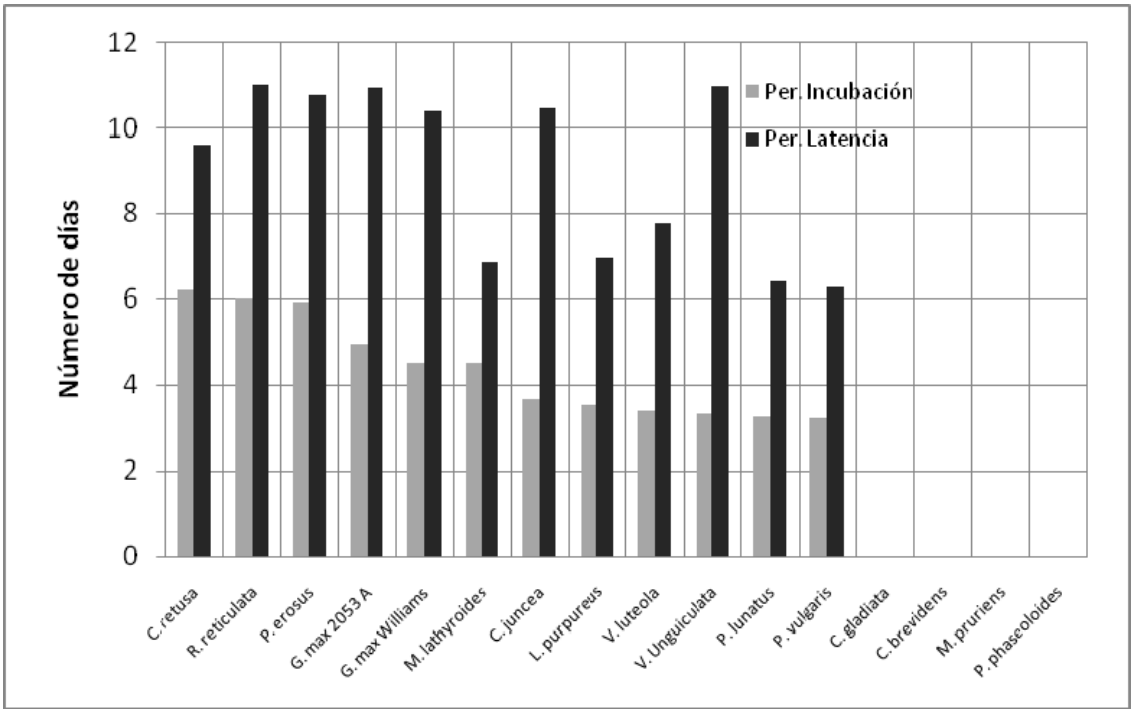

Figura 19. Período de incubación y de latencia para *P. meibomiae* en 15 especies de leguminosas evaluadas bajo condiciones de vivero.

Durante el período de incubación se observaron síntomas variados, dependiendo de la interacción entre la roya americana de la soya y su hospedero. Normalmente, los primeros síntomas se presentaron como pequeños puntos café-rojizos de tono bronceado, para el caso de *L. purpureus, P. lunatus, P. vulgaris* y *G. max,* mientras que en *V. luteola,* se presentaron manchas rojizas de tono bronceado. En *C. retusa,* los primeros síntomas se observaron como puntos necróticos con centro de coloración café-crema y borde café obscuro. Para el caso de *M. lathyroides* y *C. juncea,* dichos síntomas se presentaron como puntos bronceados, tipo aceitoso, de coloración café claro (para *M. lathyroides*), y manchas tipo aceitosas de coloración café obscuro (*C. juncea*). *V. unguiculata* presentó síntomas marcadamente diferentes a los descritos anteriormente, iniciando con pequeños puntos de coloración café-rojizo de tipo bronceado para

posteriormente formar una depresión en el centro de la lesión, de una coloración café obscura.

El mayor número de uredos por lesión individual lo produjo *P. vulgaris* con un promedio de 5.79, seguido de *P. lunatus* con 4.74. *Lablab purpureus,* produjo un 60% menos, con un promedio de 2.32, mientras que *G. max,* cultivar Williams produjo un mayor número en comparación con la línea 2053 A (1.80 versus 1.42). La especie que produjo el menor número de uredos por lesión individual fue *P. erosus,* con un promedio de 0.64 (Cuadro 22 y Figura 20). La desviación estándar más alta se encontró en las especies que presentaron el valor más alto (*P. vulgaris* y *P. lunatus*), debido a que la distribución de sus valores fueron muy variables (valor máximo de 14 y mínimo de 2 para *P. vulgaris*).

A través de la microscopía electrónica de rastreo se pudo observar claramente el patrón de formación y liberación de uredosporas, en los hospederos en donde no se encontró infección natural. En *P. vulgaris*, se observó la gran variabilidad en el tamaño de los uredos y la gran producción de uredosporas (Figuras 23A y 23B). El poro del uredo fue amplio y la formación de paráfisis limitada exclusivamente a la pared interna del mismo. Su tamaño promedio fue de 133.18 µm, con un valor máximo de 220 µm y un mínimo de 47.30 µm (Cuadro 23). En *M. lathyroides,* la abundante presencia de pubescencia en la hoja constituye una barrera natural que posiblemente impide el establecimiento de *P. meibomiae* (Figura 21C y 21D). La ruptura de la epidermis en el tejido foliar fue más pronunciada, la formación de uredosporas fue menor y la presencia de paráfisis fue más abundante. El uredo presentó un tamaño promedio de 127.17 µm. El poro del uredo observado en *G. max* fue de un diámetro pequeño, a través del cual se observó una escasa liberación de uredosporas, y una gran producción de paráfisis

(Figuras 21E y 21F). La ruptura de la epidermis fue abrupta, a través de la cual se formaron los uredos. Su tamaño promedio fue de 108.75 µm para el cultivar Williams, y de 113.95 µm para la línea 2053 A. La leguminosa que presentó el mayor diámetro promedio de uredo fue *C. retusa,* con 161.29 µm, mientras que *P. erosus* presentó el menor diámetro promedio con 100.48 µm (38% menor en comparación con *C. retusa*) (Cuadro 23).

Cuadro 22. Número de uredos de *P. meibomiae* por lesión individual, en la evaluación de 15 especies de leguminosas bajo condiciones de vivero.

Hospedero	**n[a]**	**Número de Uredos/lesión individual**			
		Promedio	**D.E[b]**	**Mínimo**	**Máximo**
Canavalia gladiata	-	-	-	-	-
Crotalaria brevidens	-	-	-	-	-
Crotalaria juncea	36	1.86	1.61	0	5
Crotalaria retusa	8	1.50	1.69	0	4
Glycine max 2053 A	100	1.42	0.70	0	3
Glycine max Williams	100	1.80	0.80	0	4
Lablab purpureus	100	2.32	1.10	1	6
Macroptilium lathyroides	100	1.54	1.02	0	4
Mucuna pruriens	-	-	-	-	-
Pachyrhizus erosus	44	0.64	0.75	0	2
Phaseolus lunatus	100	4.74	2.04	1	11
Phaseolus vulgaris	100	5.79	2.52	2	14
Pueraria phaseoloides	-	-	-	-	-
Rhynchosia reticulata	-	-	-	-	-
Vigna luteola	100	1.93	1.52	0	6
Vigna Unguiculata	100	1.71	1.30	0	6

[a]n = número de repeticiones evaluadas.
[b]D.E = desviación estándar.

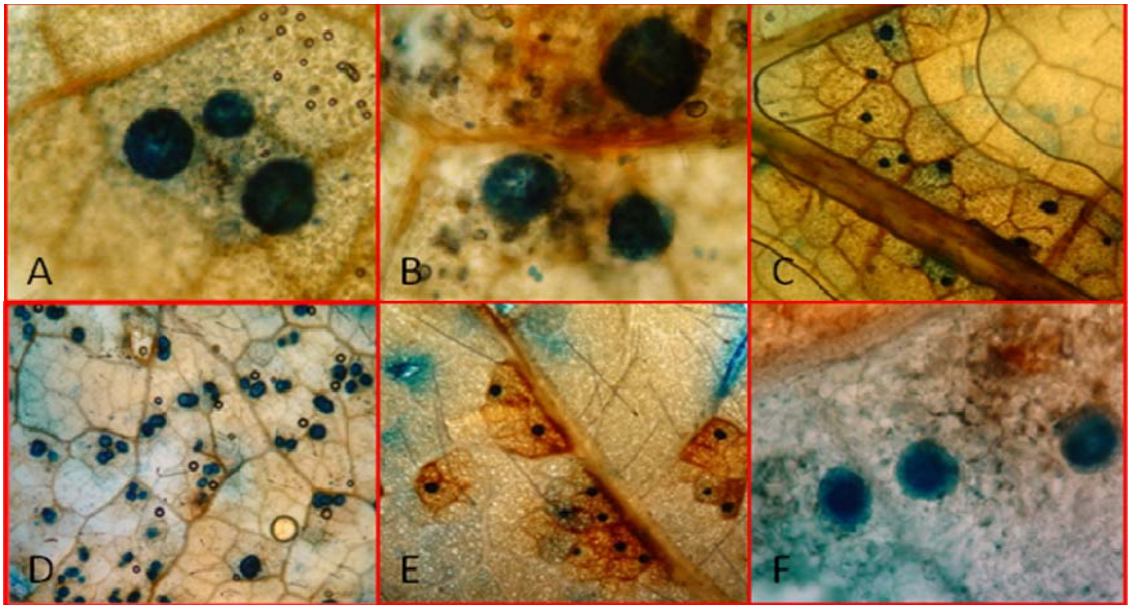

Figura 20. Uredos de *P. meibomiae* en tejido de hoja teñido con azul de algodón, durante el estudio de rango de hospederos. A. *Lablab purpureus* (200 X). B. *Phaseolus lunatus* (200 X). C. *Pachyrhizus erosus* (40 X). D. *Macroptilium lathyroides* (40 X). E. *Glycine max* Cultivar Williams (40 X). F. *Vigna luteola* (200 X).

Cuadro 23. Diámetro de uredos de *P. meibomiae*, en la evaluación de 15 especies de leguminosas bajo condiciones de vivero.

Hospedero	**n[a]**	**Diámetro de uredo (µm)**			
		Promedio	**D.E[b]**	**Mínimo**	**Máximo**
Canavalia gladiata	-	-	-	-	-
Crotalaria brevidens	-	-	-	-	-
Crotalaria juncea	50	137.35	29.14	66.00	203.20
Crotalaria retusa	12	161.29	30.52	113.50	217.80
Glycine max 2053 A	50	113.95	17.79	78.80	152.20
Glycine max Williams	50	108.75	16.71	64.20	142.60
Lablab purpureus	50	127.69	24.37	79.60	196.70
Macroptilium lathyroides	50	127.17	22.67	84.00	203.20
Mucuna pruriens	-	-	-	-	-
Pachyrhizus erosus	34	100.48	21.47	50.20	141.70
Phaseolus lunatus	50	136.60	38.34	59.80	224.00
Phaseolus vulgaris	50	133.18	39.29	47.30	220.00
Pueraria phaseoloides	-	-	-	-	-
Rhynchosia reticulata	-	-	-	-	-
Vigna luteola	50	109.63	28.57	59.40	198.90
Vigna Unguiculata	50	114.27	26.69	48.00	167.60

[a]n = número de repeticiones evaluadas.
[b]D.E = desviación estándar.

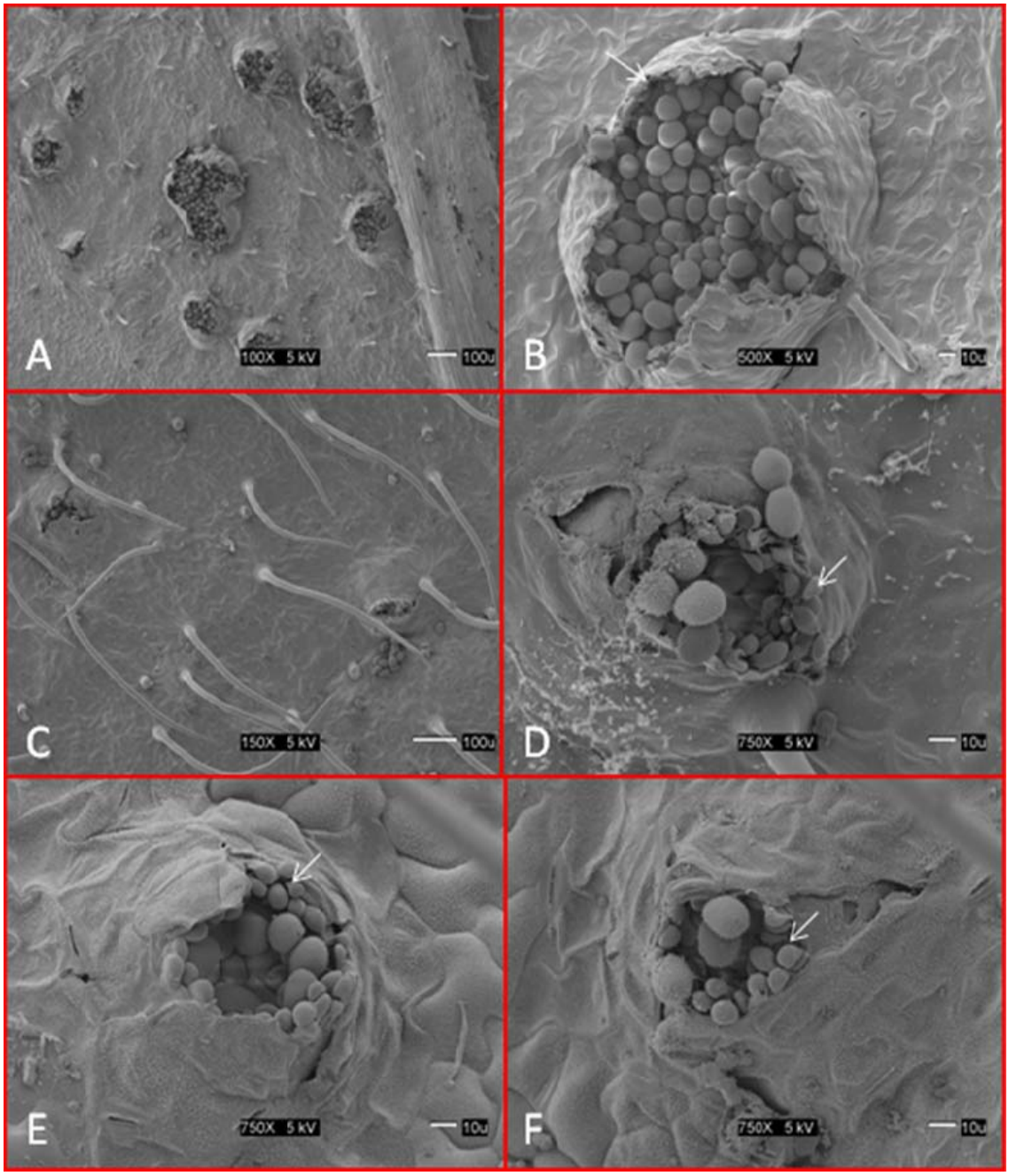

Figura 21. Microscopía Electrónica de Rastreo para *P. meibomiae.* A. Distribución de los uredos en *P. vulgaris* (100 X). B. Liberación de uredosporas y presencia de paráfisis en *P. vulgaris* (500 X). C. Presencia de pubescencia y uredos en *M. lathyroides* (150 X). D. Liberación de uredosporas y presencia de paráfisis en uredo de *M. lathyroides* (750 X). E. Estructura del uredo, presentando paráfisis y uredosporas en *G. max* (750 X). F. Ruptura de epidermis y liberación de uredosporas en *G. max* (750 X). La flecha señala la paráfisis.

La prueba de ELISA para la determinación de *P. pachyrhizi,* presentó falsos positivos en hospederos infectados con *P. meibomiae,* resultados similares a los observados en el monitoreo de hospederos silvestres. De manera cuantitativa, se determinó que *V. unguiculata* presentó una absorbancia superior al control en más del 100%, siendo el valor más alto encontrado. *Glycine max* (línea 2053 A), *L. purpureus* y *P. erosus* obtuvieron valores de absorbancia superiores al observado en el control positivo (Cuadro 24). El valor de absorbancia del control positivo fue de 1.019, para el control negativo fue de 0.308, mientras que para los hospederos que obtuvieron una reacción inmune: *C. gladiata, C. brevidens, M. pruriens* y *P. phaseoloides,* sus valores fueron de 0.254, 0.408, 0.496 y 0.564, respectivamente.

Cuadro 24. Prueba de ELISA para la identificación de *P. pachyrhizi* en el estudio de rango de hospederos de *P. meibomiae.*

Hospedero	**Absorbancia (nm)**
Control positivo	1.019
Control negativo	0.308
Canavalia gladiata	0.254
Crotalaria brevidens	0.408
Crotalaria juncea	0.355
Crotalaria retusa	0.278
Glycine max 2053 A	1.177
Glycine max Williams	0.993
Lablab purpureus	1.058
Macroptilium lathyroides	0.598
Mucuna pruriens	0.496
Pachyrhizus erosus	1.125
Phaseolus lunatus	0.476
Phaseolus vulgaris	0.579
Pueraria phaseoloides	0.564
Rhynchosia reticulata	0.458
Vigna luteola	0.519
Vigna unguiculata	2.053

4.5. Caracterización molecular de *P. meibomiae*

Al realizar el análisis de la secuencia de la región ITS1, 5.8S e ITS2 del ADN ribosomal de los ocho aislados de *Phakopsora,* infectando *L. purpureus,* y compararlas con las secuencias depositadas en el GeneBank, a través de BLAST, se observó un porcentaje de similaridad entre el 98 y el 100% con la especie *Phakopsora meibomiae.* La cobertura de la homología de la región secuenciada, comparada con la especie identificada, fluctúo entre el 81 al 100%. El número de bases distintas o "gaps" que se encontraron fluctúo entre 1 a 7 bases, siendo el aislado LP23 el que presentó un mayor número de bases diferentes en relación a la secuencia tipo de *P. meibomiae* (Cuadro 25).

Cuadro 25. Identificación molecular de aislados de *Phakopsora,* procedentes de *L. purpureus,* utilizando la secuenciación de la región ITS del rADN y el programa BLAST.

Aislado	Identificación en BLAST	% homología	% cobertura	Número de bases idénticas	Número de bases diferentes
LP17	*Phakopsora meibomiae*	99	87	461/463	2/463
LP18	*P. meibomiae*	100	99	458/463	4/463
LP19	*P. meibomiae*	99	83	461/462	1/462
LP20	*P. meibomiae*	99	82	432/435	3/435
LP21	*P. meibomiae*	99	86	401/405	4/405
LP22	*P. meibomiae*	99	100	440/443	3/443
LP23	*P. meibomiae*	98	86	423/430	7/430
LP24	*P. meibomiae*	98	81	441/447	6/447

A través de la construcción del árbol filogenético, con el método Neighbor-Joining, utilizando los aislados secuenciados de *Phakopsora* y especies relacionadas evolutivamente, se observó la formación de un clado o grupo monofilético. Los aislados de *Phakopsora* formaron un grupo monofilético con la especie *P. meibomiae,* con un valor bootstrap de 100%, indicando la estrecha relación evolutiva entre los aislados secuenciados. La especie evolutivamente más relacionada a este clado correspondió a *P. pachyrhizi,* formando un segundo clado con un valor bootstrap de 100%, ambas

especies pertenecientes a la familia Phakopsoraceae. Las especies *Uromyces vignae* y *U. appendiculatus*, al igual que las especies *Puccinia coronata* f. sp. *avenae* y *P. hordei,* formaron un clado para cada género, con valores bootstrap de 100%, para cada uno. Estas especies forman parte de la familia *Puccinaceae* y se observa una clara relación evolutiva entre ellas. La especie *Tranzschelia discolor* presentó una relación evolutiva más estrecha a las especies *U. vignae, U. appendiculatus, P. coronata* f. sp. *avenae* y *P. hordei*, en comparación con las especies *P. pachyrhizi* y *P. meibomiae. Hemileia vastatrix,* al formar parte del Subphylum Pucciniomycotina, presenta una relación evolutiva estrecha con las especies analizadas, pertenecientes a las familias Phakopsoraceae, Pucciniaceae y Uropyxidaceae. La especie *Ustilago hordei,* Subphylum Ustilaginomycotina, y la especie *Boletus mirabilis,* Subphylum Agaricomycotina, presentan una mayor relación evolutiva entre ellas, en comparación con las especies que forman parte del Subphylum Pucciniomycotina, y fueron incluidas como "outgroups" o grupos distantes en el análisis filogenético (Figura 22).

Figura 22. Árbol filogenético obtenido por el método Neighbor-Joining utilizando la prueba bootstrap con 1000 repeticiones, a través del análisis de la secuencia del rADN de ocho aislados de *Phakopsora* y especies relacionadas.

5. DISCUSIÓN

5.1. Evaluación de la infección natural de la roya americana de la soya en lotes experimentales

Durante los dos años de evaluación (2006-2008) no se observó infección natural de *P. meibomiae* en lotes de soya en ninguna de las tres localidades. Sin embargo en otras leguminosas como *Lablab purpureus* y *Phaseolus lunatus,* en la localidad de Adjuntas, se pudo determinar la aparición de síntomas hasta un nivel de severidad de 3 (entre 5 y 25%). Los datos obtenidos indican que las condiciones para la infección de *P meibomiae* fueron apropiadas, a pesar de que los niveles de severidad fueron bajos comparados con observaciones de severidad de esta especie en *L. purpureus* en condiciones silvestres. Es interesante anotar que la soya no fue susceptible a *P. meibomiae* en la localidad de Adjuntas, a pesar de la existencia de inóculo. La presencia de *P. meibomiae* en la EEA de Adjuntas fue observada en *L. purpureus* a finales de los meses de julio y noviembre del 2007, para las siembras del 8 de junio y 8 de octubre, respectivamente, mientras que en *P. lunatus* se observó solamente a finales del mes de noviembre. *Lablab purpureus,* tiene un hábito de crecimiento indeterminado, con período de floración restringido a los meses de diciembre y enero, por lo que durante el inicio de la infección (48 a 55 días después de la siembra) se presentó en estado vegetativo, con 10 a 11 nudos en el tallo principal.

Al no existir información sobre la epidemiologia de *P. meibomiae* y la susceptibilidad de los diversos hospederos, es muy complicado determinar las condiciones apropiadas para su infección. Sin embargo, conociendo que la temperatura promedio para las siembras del 8 de junio y 8 de octubre fue de 23.3°C y de 22.2°C, respectivamente, temperatura considerada óptima para los procesos de germinación y

desarrollo de la roya asiática de la soya, se considera que estas fueron ideales para la infección (Del Ponte et al., 2006; Bromfield 1984; Melching et al., 1989). Las temperaturas mínimas observadas en el primer cuatrimestre del 2007 fueron de 13.4, 12.4, 14.2 y 15.1°C, y pudieron influir en el establecimiento y desarrollo del patógeno; ya que, noches frías con horas continuas a temperaturas inferiores a los 15°C reducen notablemente el período de latencia y de incubación (Del Ponte et al., 2006).

La soya presenta susceptibilidad a la roya (sobre todo a la asiática) durante todos sus estados de desarrollo, y a nivel de campo se han observado severas epidemias únicamente durante los estados reproductivos (en floración y llenado de vaina), no existiendo variedades resistentes (Kawuki et al., 2004). Lo anterior permite predecir que en las localidades estudiadas no hubo inóculo de *P. pachyrhizi* ya que las condiciones climáticas fueron apropiadas para su establecimiento.

Para el caso de *P. lunatus,* al momento de la infección (durante la segunda siembra), se encontró en estado de floración R2. Los porcentajes de incidencia reflejaron un incremento drástico de la enfermedad (del 32 al 100% en *L. purpureus*), sobre todo para la segunda siembra, lo que pudo ser influenciado por la alta precipitación observada durante este período de siembra (615 mm), en comparación con los 200 mm correspondientes a la primera siembra. Estos resultados fueron similares a los reportados en 1976, en donde se observó el inicio de una epidemia de roya de la soya en *Phaseolus coccineus* línea MITA-Pc-H-64 en el mes de abril, mientras que para mediados de septiembre, 59 de 73 selecciones presentaron roya. Para 1976, la precipitación acumulada de mayo a septiembre fue de 673 mm, un tanto inferior a la reportada en el 2007 con 870 mm (Vakili 1976; Vakili y Bromfield 1976). Inicialmente a esta roya se identificó como *P. pachyrhizi*, siendo posteriormente reclasificada como

P. meibomiae, mediante análisis morfológico (1992) y análisis molecular, a través de la secuenciación de la región ITS del ADN ribosomal, en el 2002 (Ono et al., 1992; Frederick et al., 2002; Bonde et al., 2006).

En 2007 no se observó presencia de roya en la soya, a pesar de encontrarse aledaño al lote de *L. purpureus* y de *P. lunatus,* infectados con *P. meibomiae*, distinto a lo observado en agosto de 1976 en donde se reportó presencia de roya en los cultivares de soya Williams, Biloxi, Hardee y Santa Rosa, en lotes adyacentes a *P. coccineus*. A finales de noviembre del 2007 la severidad de *P. meibomiae* en *P. lunatus* fue del 5 al 25%, mientras que en septiembre de 1976, la severidad reportada en soya fue del 80%, en el cultivar Santa Rosa, y del 50% en Biloxi, mientras que para el cultivar Williams se observó defoliación (Vakili 1976).

Geográficamente Puerto Rico se encuentra localizado en una latitud considerada de alto riesgo, ya que favorece el establecimiento de la roya asiática de la soya (18 a 27° N), lo que podría ser considerada una gran limitante para la producción local de soya (Pivonia et al., 2005; Frederick et al., 2002; Bonde et al., 2006). No obstante en monitoreos en lotes experimentales y de producción de soya, e incluso en leguminosas silvestres, no se ha reportado la presencia de esta especie.

Durante la década de los 70´s, a nivel de todo el continente americano, se observó un resurgimiento de *P. meibomiae* en diferentes leguminosas. Casos como los observados en Brasil y Colombia en 1979 en soya, Costa Rica en 1975 en habichuela y 1976 en soya, fueron posiblemente ocasionados por las condiciones climáticas presentes durante aquella década. No obstante, estos brotes fueron controlados (Bromfield 1984).

La radiación solar, especialmente la ultravioleta, juega un papel importante en la mortalidad de uredosporas. Considerando la zona de Guilarte (1019 m.s.n.m)

geográficamente más cercana a la EEA de Adjuntas, se puede considerar sus patrones de nubosidad similares (guardando las diferencias relacionadas a su altitud), la radiación máxima en un día caluroso (29 de julio 2007) fue de 8.2 MJ/m^2, mientras que para Juana Díaz e Isabela fue de 22.0 (5 de mayo 2008) y 15.4 (25 de septiembre 2007) MJ/m^2, respectivamente. Dos a tres días con alta radiación solar, en Juana Díaz e Isabela, son suficientes para inhibir la germinación de uredosporas, considerando niveles críticos entre 27.3 a 60 MJ/m^2. Para la zona de Guilarte, y por ende la de Adjuntas, puede llegar a los 8 días en donde la radiación acumulada pudiera superar los 60 MJ/m^2, esto es días seguidos con alta radiación solar. Esto pudo influir en la presencia de la roya en los lotes de Adjuntas y no en los de Isabela y Juana Díaz (Isard et al., 2006; Pan et al., 2006).

Durante el estudio realizado la enfermedad más importante presente en la soya fue la necrosis del tallo asociada con Carlavirus. En monitoreos realizados entre el 2005 al 2006, y el 2006 al 2008 su incidencia fue similar tanto en Juana Díaz como en Isabela (entre el 5 al 40% en la línea 2053 A). A pesar de los porcentajes observados, estos pueden incrementar notablemente de acuerdo al cultivar. En el 2007, en la EEA de Isabela se reportó una incidencia del 100% en líneas susceptibles (Rodrigues et al., 2008; Viteri 2008). La necrosis del tallo se presentó durante la etapa vegetativa 3 (V3), ocasionando daños considerables a partir de la etapa reproductiva 1 (R1). Las incidencias de las enfermedades causadas por *Cercospora sojina*, *Peronospora manshurica, Xanthomonas campestris, Sclerotium rolfsii, Phoma* sp., *Phomopsis* sp. y *Soybean Mosaic Virus,* no presentaron un impacto negativo al cultivo en las tres localidades evaluadas, lo cual se compara con la información obtenida en años anteriores (Viteri 2008).

5.2. Distribución de *P. meibomiae* en hospederos silvestres

La cordillera central que corre de este a oeste, divide a la isla en zonas ecológicamente diversas, lo que produce diversos patrones climáticos. Durante los dos años de monitoreo se observó que *L. purpureus* fue el hospedero más importante para *P. meibomiae,* resultado similar al reportado en 1979 (Vakili 1979). Los tipos de *L. purpureus* encontrados en Puerto Rico presentan dos clases de flor, siendo el más común el de flor blanca con semillas de color café claro y de tono bronceado. También se observan el tipo de *Lablab* de flores violáceas y semillas crema blanquecina.

La presencia de *P. meibomiae* en *L. purpureus* se observó durante todo el año en la zona montañosa centro oeste (300 a 1100 m.s.n.m), con una mayor distribución durante los meses de julio a septiembre, mientras que en la zona de Isabela (130 m.s.n.m), la presencia de roya americana se restringió a los meses de abril a noviembre. Se observó infección en *V. luteola* en el mes de noviembre, mientras que en *P. lunatus, L. purpureus* y *P. erosus,* la infección se observó en el mes de abril. La temperatura y precipitación influyeron notablemente en el establecimiento y desarrollo de la enfermedad. En el mes de abril en la zona de Isabela, la temperatura promedio fue de 24.2 y 20.5°C y la precipitación fue de 150 y 130 mm para 2007 y 2008, respectivamente. En estimaciones realizadas entre 1976 a 1980, se estableció una reducción de 1°C por cada 100 metros de incremento en altitud (Vakili 1981; Vakili 1979; Vakili y Bromfield 1976). Durante el 2007, la temperatura promedio mínima y máxima en la zona centro oeste, se registró en los meses de enero y agosto, respectivamente. En enero de ese año, los registros promedios de temperatura en Utuado (253 m), como el sitio más bajo de la región central, fue de 23°C, mientras que la temperatura promedio estimada para Villalba (1096 m), como lo zona de mayor altitud

monitoreada, correspondió a 15°C, lo que pudiera explicar el menor número de muestras con infección de roya americana obtenidas durante el primer trimestre del 2007.

De enero a abril del 2007 se obtuvieron 6 muestras infectadas con *P. meibomiae*, de mayo a agosto 16, y de septiembre a diciembre 4, obteniendo una sola muestra positiva en abril del 2007 a una altitud de 520 m (temperatura promedio de 20°C). El 42% de las muestras positivas se recolectaron durante los meses de mayo a agosto del 2007, con una precipitación acumulada de 600 mm, comprobando que la precipitación y la humedad están relacionadas con la distribución de la enfermedad (Del Ponte et al., 2006; Bromfield 1984; Vakili 1981).

Es interesante anotar que la presencia de *P. meibomiae* en *L. purpureus* estuvo restringida a las hojas inferiores, normalmente protegidas por la canopia de la planta y sobre todo por la sombra proyectada por árboles de diferentes especies. El crecimiento de *Lablab purpureus* está asociado a la presencia de diferentes especies, que sirven como soporte para el crecimiento de esta leguminosa trepadora. Estas condiciones son importantes para la formación de un microambiente favorable. Debido a la alta humedad relativa, combinada con la temperatura fresca, se condensa y forma una película de agua superficial sobre la hoja durante las primeras horas de la mañana, pudiendo extenderse por más de 10 o 12 hora, cuando la radiación solar disminuye, permitiendo el establecimiento exitoso de la roya (Sinclair et al., 1989; Monte et al., 2003; Melching et al., 1989; Bromfield 1984).

La humedad, expresada como agua libre sobre el follaje, es importante en el establecimiento y desarrollo del patógeno, requiriendo un mínimo de 6 a 7 horas de humedad para el establecimiento de la roya de la soya (Melching et al., 1989; Bromfield

1984). Este período de agua libre es mayor en comparación a otras especies de royas; ya que, para la infección de la roya de la hoja del maíz y de la roya común del trigo, el período mínimo de agua libre sobre el follaje es de 3 y 4 horas, respectivamente (Godoy et al., 1999; Sache y De Vallavieille 1993).

La segunda leguminosa más importante como hospedero de la roya americana fue *P. lunatus,* con 8% de las muestras positivas. Esta leguminosa se encontró exclusivamente en las EEA de Adjuntas e Isabela, en lotes experimentales o en áreas de multiplicación para producción de semilla. Durante los monitoreos realizados en la década de los 70´s, se observó esta misma tendencia en la infección de la roya americana, no obstante la distribución de esta leguminosa fue más extensa, ubicándose en jardines de casas y en vallas naturales de separación entre las mismas (Vakili 1976). Durante abril del 2008, la infección observada en la EEA de Isabela en esta leguminosa, se restringió a los materiales provenientes de Estados Unidos, mientras que una accesión local fue inmune. Esto evidencia posibles genes de resistencia a la roya americana presentes en dicha accesión.

No se observó la presencia de telia y teliosporas durante los dos años de monitoreo, lo que contrastó notablemente con los resultados obtenidos en 1978, en donde se recolectaron, entre los 750 y 800 m.s.n.m, dos muestras de *L. purpureus* con presencia de telias de tamaño pequeño, desarrolladas durante el mes de noviembre (Vakili 1981). Las teliosporas pudieron haber influido en la supervivencia de *P. meibomiae* durante un período de tiempo prolongado y por consiguiente haber mantenido el inóculo latente en *L. purpureus.*

Debido a la heterogénea y muy dispersa distribución de *L. purpureus,* sobre todo en el área centro oeste, fue muy difícil estimar el desarrollo de la enfermedad a lo largo

del tiempo. Inicialmente se seleccionaron sitios de monitoreo en los municipios de Adjuntas, Corozal y Barranquitas, no obstante transcurridos de 30 a 45 días de su instalación, el departamento de transportación y obras públicas eliminó la leguminosa y otras plantas desarrolladas a los alrededores, como parte del control de malezas en los bordes de las carreteras.

5.3. Caracterización morfológica de *P. meibomiae*

El 81% de los aislados de *P. meibomiae* en *L. purpureus,* presentaron una reacción tipo TAN, caracterizada por el color de la lesión café rojizo de tipo bronceado con una presencia de hasta 5 uredos por lesión individual y abundante esporulación. Las lesiones RB se caracterizaron por presentar una coloración café rojizas y poca presencia de uredos (hasta 2 por lesión individual), de coloración crema y tipo globoso. Las lesiones TAN producidas por *P. pachyrhizi,* en soya y otras leguminosas, producen abundante esporulación con presencia de uredos pulverulentos, mientras que la reacción RB se caracteriza por el menor número de pústulas y presencia de uredos globosos. (Bromfield 1984). En *P. meibomiae,* los uredos pulverulentos, típicos de las lesiones TAN, se observaron entremezclados con aquellos crema globosos (típicos de la reacción RB), por lo que es posible que la reacción TAN, característica de la roya asiática de la soya, en materiales susceptibles, sea algo diferente a la reacción TAN en *L. purpureus.*

Del mismo modo, las lesiones RB observadas en *L. purpureus* y en otras leguminosas, mostraron una amplia gama de reacciones, desde la café rojiza, pasando por café obscura o café claro con ligera tonalidad rojiza. Resultados similares se observaron en la reacción diferencial en líneas de soya frente a la inoculación de aislados de *P. meibomiae* y de *P. pachyrhizi* (Bonde et al., 2006; USDA 2008).

Se determinó una ligera variación en el área promedio de la lesión individual en *L. purpureus* la cual fue de 0.38 mm^2, mientras que para *P. lunatus* el promedio fue de 0.30 mm^2. Para el caso de *P. erosus* el área de la lesión fue de 0.39 mm^2, y para *V. luteola* fue de 0.54 mm^2. Estos resultados fueron similares a los observados en soya infectada con aislados de *P. pachyrhizi* provenientes de Australia y Taiwan, en donde el área de la lesión individual varió de 0.4 a 0.5 mm^2, hasta llegar a 1 mm^2 en estados avanzados de la enfermedad (Bromfield 1984; Vakili y Bromfield 1976). Existió poca variación en el tamaño de las uredosporas de las diferentes leguminosas silvestres, ya que su forma y estructura se mantuvieron similares. Su largo fluctúo entre 20.36 a 25.09 µm, mientras que su ancho fue de 16.23 a 19.46 µm, valores que se encuentran dentro del rango establecido en 1992 para la delimitación de las diferentes especies de *Phakopsora* (Ono et al., 1992).

No existen reportes para *P. meibomiae* sobre el número de uredosporas producidas por uredo, ya que es una variable difícil de establecer y de cuantificar. Para *P. pachyrhizi* se han obtenido valores entre 2028 a 6600 esporas por lesión durante 39 días de colección en aislados procedentes de Australia y Taiwan, respectivamente (Bromfield 1984). Considerando que los uredos pueden formarse activamente hasta cuatro semanas después de la inoculación, y que la producción de uredosporas en el uredo continúa desarrollándose hasta por tres semanas después del inicio de la esporulación, la tasa de producción de uredosporas es alta y de allí el riesgo de que se produzca una grave epidemia cuando las condiciones ambientales sean favorables (Marchetti et al., 1975). Los rangos promedio de uredosporas por uredo fueron amplios (de 35 a 211) considerando el mismo tipo de lesión de donde se obtuvieron (lesiones tipo TAN). Esto pudo deberse, entre otras causas, a la gran variabilidad de estructuras

urediales observadas y distintos períodos de desarollo en las leguminosas, lo que hizo que la producción de esporas haya sido variable y muy heterogénea (Bromfield 1984).

La estructura del uredo, la distribución y abertura del poro, provocan que la lluvia y el viento jueguen un papel importante en la diseminación de las uredosporas. Las gotas de lluvia lavan las uredosporas y caen a tejidos aledaños libres de la enfermedad. Adicionalmente, las gotas salpican de una planta a otra, transportando las uredosporas, mientras que el viento es capaz de transportar por distancias mayores el inóculo primario y secundario (Del Ponte et al., 2006; Bromfield 1984; Pan et al., 2006).

La utilización de tetróxido de osmio en la post fijación de las muestras, para el análisis con microscopía electrónica de rastreo, ha permitido la visualización clara de micrografías de los uredos y uredosporas de la roya asiática de la soya y otras especies de royas. No obstante, la metodología que se utilizó en la presente investigación no incorporó este reactivo, entre otras razones, por su toxicidad. Los resultados obtenidos en las imágenes de microscopía, demuestran que es posible producir micrografías de alta calidad sin la utilización de dicho reactivo (May-De Mio et al., 2006).

5.4. Rango de hospederos de *P. meibomiae*

El establecimiento de la infección de *P. meibomiae* fue difícil durante el desarrollo del experimento. La infección de *P. meibomiae,* en las leguminosas evaluadas, se logró únicamente, mediante la irrigación aérea durante las 48 horas posteriores a la inoculación. Adicionalmente las leguminosas evaluadas se mantuvieron bajo sombra (50%), durante el experimento. Esto confirma las observaciones realizadas durante tres años de estudio, donde *L. purpureus* requiere sombra para la presencia de

roya. La ausencia de roya en soya en las zonas productoras en la Isla, ubicadas en la zona semiárida con exposición solar permanente y baja humedad relativa, posiblemente limita el establecimiento del patógeno y su posterior infección.

La única técnica de inoculación que fue eficiente para producir infección de roya fue mediante hojas infectadas como fuente de inóculo, adheridas al envés de las hojas de plantas sanas. Esta técnica se ha utilizado eficientemente para esta especie de roya en años anteriores (Vakili 1976).

Trabajos realizados en 1981 con *P. pachyrhizi,* demostraron que los períodos de incubación y de latencia más largos, en especies nativas de *Glycine,* se observaron en *G. falcata* y *G. latrobeana,* mientras que los períodos más cortos de incubación y latencia se presentaron en *G. tabacina* (Burdon y Marshall 1981a). Para el caso de *P. meibomiae,* poco se sabe sobre estos parámetros en los diferentes hospederos en los que es capaz de producir infección, ya que durante la década de los 70, los trabajos que se realizaron en Puerto Rico se basaron en la descripción de la reacción que desarrollaba dicha roya en el hospedero inoculado con el aislado procedente de Adjuntas (Vakili 1976, Bromfield 1984).

Las dos especies de *Phaseolus* evaluadas, *P. lunatus* y *P. vulgaris,* presentaron períodos más cortos de incubación (3.29 y 3.23 días, respectivamente) y latencia (6.40 y 6.27 días, respectivamente). *Phakopsora meibomiae* se estableció en un período más corto en estas leguminosas, en comparación con los 6.22 días (período de incubación) que se observó en *C. retusa,* posiblemente debido a la gran pubescencia y la capa cuticular gruesa presente en la hoja. En la soya, el período de incubación y de latencia para el cultivar Williams, considerado como susceptible a la roya de la soya, fue de 4.52 y 10.39 días, respectivamente. Trabajos realizados con un aislado de *P. pachyrhizi*

procedente de Australia en soya cultivar Dare, demostraron períodos de incubación y de latencia más largos (6.0 y 13.7 días, respectivamente) en comparación con los obtenidos para *P. meibomiae* (Burdon y Marshall 1981b).

El número promedio de uredos por lesión individual en soya fluctúo entre 1.42 y 1.80, para la línea 2053 A y cultivar Williams, respectivamente. Estos resultados son similares a los reportados en el 2006, en donde se obtuvieron valores promedio entre 1.4 a 2.2, al evaluar aislados de *P. meibomiae,* procedentes de Puerto Rico y de Brasil, en nueve cultivares de soya (Bonde et al., 2006). La susceptibilidad de *P. vulgaris* y de *P. lunatus* a *P. meibomiae,* se evidenció al observarse valores promedios de uredos por lesión individual de 5.79 y 4.74, y diámetros de uredos de 133.18 y 133.60 µm, para *P. vulgaris* y *P. lunatus,* respectivamente. Se ha demostrado que *P. vulgaris* es más susceptible a aislados de *P. meibomiae,* provenientes de Brasil y de Puerto Rico, que a *P. pachyrhizi* proveniente de Taiwan (Miles et al., 2007). La alta producción de uredos por lesión individual, observada en las especies de *Phaseolus* (un 66% más alta en comparación con *L. purpureus*), hace que se utilicen estas especies para la multiplicación del inóculo de *P. meibomiae* para diferentes trabajos desarrollados con esta roya (Frederick et al., 2002; Bonde et al., 2006).

Inoculaciones realizadas con aislados de *P. meibomiae* en diferenciales de soya, conteniendo genes de resistencia *Rpp*, sugieren la presencia de razas fisiológicas. Para confirmar esta información, es necesario realizar trabajos similares en *P. vulgaris,* a través de la utilización de líneas diferenciales que contengan genes de resistencia a *Uromyces appendiculatus* (Bonde et al., 2006; Vakili y Bromfield 1976; Miles et al., 2007).

P. erosus presentó el menor número de uredos por lesión individual (0.64) y el diámetro de uredo más corto (100.48 µm), 21 días después de la inoculación. No obstante, al observar el desarrollo de las lesiones tres meses después de la inoculación, se observó un incremento en la esporulación, sobre todo en hojas inferiores y en estado de senescencia. Esto podría indicar el lento desarrollo de uredos y uredosporas de *P. meibomiae* en ciertas especies.

Una de las leguminosas de mayor distribución en la isla es *P. phaseoloides.* En la inoculación realizada, se observó una reacción inmune, con ausencia de esporulación. A diferencia de *P. lobata* (ampliamente distribuida en Sud América y Norte América), un hospedero de *P. pachyrhizi*, *P. phaseoloides* no representa riesgo como hospedero alterno para la roya americana de la soya en Puerto Rico (Carmona et al., 2005; Harmon et al., 2006; Isakeit et al., 2006; Koenning et al., 2007).

5.5. Caracterización molecular de aislados de *Phakopsora*

Los ocho aislados de *Phakopsora,* provenientes de *L. purpureus* colectados en Puerto Rico, fueron identificados como *P. meibomiae.* Mediante la secuenciación de la región ITS1-5.8S-ITS2 del rADN, se encontró una similaridad superior al 98% con *P. meibomiae,* aislados Puerto Rico PR (accesión AF333502) y Brazil 82-1 (accesión AF333501). La secuenciación de los espaciadores de transcripción internos (ITS) y el espacio intergénico de las unidades repetidas del rADN nuclear, es una técnica muy utilizada en el análisis filogenético de un amplio rango de organismos pertenecientes a diferentes grupos taxonómicos. (White et al., 1990). Los genes ribosomales presentan una gran cantidad de copias a lo largo del genoma, poseen zonas variables y conservadas, y pueden ser amplificadas y secuenciadas mediante la utilización de

iniciadores universales, ligados a sus secuencias conservadas, por lo que son utilizados en la identificación molecular de hongos y otros grupos taxonómicos (Henson y French 1993).

La variación en el porcentaje de homología entre los aislados de *Phakopsora*, se debió a la relación entre la similitud y diferencias en el número de bases en su respectiva cobertura con respecto a la especie identificada. La dificultad en la extracción del ADN de los parásitos obligados (grupo en el que se encuentra la roya americana de la soya), sumada a los problemas asociados con la amplificación de la región ITS, contribuyeron a la variación observada en los aislados, especialmente entre los aislados LP23 y LP24. Esta situación es similar a la observada en la roya de la hoja de la vid, causada por *P. euvitis,* en donde se observaron diferencias en 20 bases al secuenciar la región ITS2 de aislados provenientes de Japón y del este de Australia. No obstante, un aislado de *P. euvitis* de Japón, presentó una diferencia de una base en los sitios 170 y 367 de la región ITS2, en comparación con 18 diferentes aislados procedentes del mismo país (Chatasiri y Ono 2008).

Al comparar la secuencia de la región ITS de aislados de *P. meibomiae* y *P. pachyrhizi,* se observaron 49 nucleótidos diferentes o gaps en la región ITS1, equivalente al 77.5% de identidad entre las dos especies, mientras que la secuenciación de la región ITS2 reveló un porcentaje de identidad aproximado al 68.5%, equivalente a un número de 64 nucleótidos diferentes o gaps entre las dos especies (Frederick et al., 2002). Esta diferencia en la región ITS, produce la separación filogenética de las dos especies, corroborada por las diferencias morfológicas encontradas en sus estados teliales (Ono et al., 1992).

De acuerdo a lo observado en la construcción del árbol filogenético, *Tranzschelia discolor* se encuentra más cercano evolutivamente a las especies *Uromyces vignae, U. appendiculatus, Puccinia coronata* f. sp. *avenae, P. hordei, Phakopsora Pachyrhizi* y *P. meibomiae* en comparación con *Hemileia vastatrix,* especies pertenecientes al Subphylum Pucciniomycotina. Las especies *Ustilago hordei* (Ustilaginomycotina) y *Boletus mirabilis* (Agaricomycotina) presentan entre ellas una distancia evolutiva menor, en comparación con especies del Subphylum Pucciniomycotina (Cummins y Hiratsuka 2004; Hibbett et al., 2007).

6. CONCLUSIONES

- La roya americana de la soya, *Phakopsora meibomiae,* no produjo infección natural en soya, en lotes experimentales localizados en las EEA de Adjuntas, Juana Díaz e Isabela.
- *Phakopsora meibomaie* infectó naturalmente lotes experimentales de *Lablab purpureus* y *Phaseolus lunatus,* en la EEA de Adjuntas, en los meses de junio a octubre del 2007.
- La severidad de *P. meibomiae* observada en *L. purpureus* fue menor al 5%, mientras que en *P. lunatus* fue entre el 6 y el 25%.
- Se observó la presencia de *P. meibomiae* infectando naturalmente *L. purpureus, P. lunatus, Vigna luteola, Macroptilium lathyroides, Pachyrhizus erosus* y *Vigna* sp.
- En el municipio de Adjuntas, se reportó el 37% de *L. purpureus* infectado con *P. meibomiae.*
- La infección natural de *P. meibomiae,* en leguminosas silvestres y cultivadas, se observó entre los 101 y 700 metros sobre el nivel del mar.
- Se determinó que *Canavalia gladiata, Crotalaria brevidens, Mucuna pruriens* y *Pueraria phaseoloides,* presentaron una reacción inmune a *P. meibomiae*.
- El período de incubación y de latencia más cortos se observó en *P. lunatus* y *P. vulgaris.*
- Mediante la secuenciación de la región ITS del rADN, se determinó que los aislados de *Phakopsora* colectados en *L. purpureus,* correspondieron a *P. meibomiae.*

- No se observó presencia de *Phakopsora pachyrhizi* en lotes experimentales ni en leguminosas silvestres.

7. RECOMENDACIONES

- Identificar las condiciones óptimas, de temperatura y humedad, para los procesos de germinación y establecimiento de la roya americana de la soya en leguminosas silvestres y cultivadas.
- Realizar estudios epidemiológicos con *P. meibomiae,* en *L. purpureus* y *P. lunatus,* para determinar la curva de progreso de la enfermedad.
- Determinar la presencia de razas fisiológicas en aislados de *P. meibomiae* utilizando líneas diferenciales de soya con genes de resistencia *Rpp* y líneas diferenciales de habichuela conteniendo los genes de resistencia *Ur*.
- Realizar monitoreos de la roya americana de la soya en leguminosas silvestres en la zona este de Puerto Rico.
- Desarrollar técnicas moleculares como RFLP, AFLP, microsatélites, entre otras, para la determinación de la variabilidad genética y evolutiva de *P. meibomiae.*

8. LITERATURA CITADA

Agrios, G. N. 2005. Plant Pathology, Fifth Edition. Academic Press Inc., San Diego, California, 952 pp.

Alexopoulus, C.J., C. W. Mims y M. Blackwell. 1996. Introductory Mycology. Jhon Willey & Sons Inc, New York, 564pp.

Anónimo. 2001. Consensus document on compositional considerations for new varieties of soybean: key food and feed nutrients and antinutrients. Head of Publications Service OECD, Paris, 30 pp.

Bonde, M. R., J. S. Melching y K. R. Bromfield. 1976. Histology of the suscept-pathogen relationship between *Glycine max* and *Phakopsora pachyrhizi,* the cause of soybean rust. Phytopathology 66: 1290-1294.

Bonde, M. R., S. E. Nester, C. N. Austin, C. L. Stone y R. D. Frederick. 2006. Evaluation of virulence of *Phakopsora pachyrhizi* and *P. meibomiae* isolates. Plant Disease 90(6): 709-716.

Bonde, M. R., G. L. Peterson y W. M. Dowler. 1988. A comparison of isoenzimes of *Phakopsora pachyrhizi* from the eastern hemisphere and the new world. Phytopathology 78(11): 1491-1494.

Bradley, C. A. 2008. Fungicide resistance management in soybean. En: A. Dorrance, M. Draper y D. Hershman (ed.). Using foliar fungicides to manage soybean rust, pp. 57-60. Land-Grant Universities Cooperating NCERA-208 y OMAF, Columbus.

Brent, K. J. y D. W. Hollomon. 2007. Fungicide resistance: The assessment of risk. Fungicide Resistance Action Committee, Brussels, 53 pp.

Bromfield, K. R. 1984. Soybean rust, Monograph No.11. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, 57 pp.

Bromfield, K. R. y E. E. Hartwig. 1980. Resistance to soybean rust and mode of inheritance. Crop Science 20: 254-255.

Burdon, J. J. y D. R. Marshall. 1981a. Evaluation of Australian native species of *Glycine* for resistance to soybean rust. Plant Disease 65(1): 44-45.

Burdon, J. J. y D. R. Marshall. 1981b. Inter- and intra-specific diversity in the disease-response of *Glycine* species to the leaf-rust fungus *Phakopsora pachyrhizi.* Journal of Ecology 69: 381-390.

Cárcamo Rodríguez, A., J. Aguilar Ríos y J. R. Hernández. 2006. First report of Asian Soybean Rust caused by *Phakopsora pachyrhizi* from Mexico. Plant Disease 90(9): 1260.

Carmona, M. A., C. Fortugno y P. L. Achával. 2005. Morphologic and pathometric characterization of the Asian soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) on kudzu (*Pueraria lobata*) in Argentina. Plant Disease 89 (10): 1132.

Chatasiri, S. y Y. Ono. 2008. Phylogeny and taxonomy of the Asian grapevine leaf rust fungus, *Phakopsora euvitis,* and its allies (Uredinales). Mycoscience 49: 66-74.

Cremlyn, R. 1990. Plaguicidas modernos y su acción bioquímica. Limusa, México, 356 pp.

Cummins, G. B. y Y. Hiratsuka. 2004. Illustrated genera of rust fungi, Third edition. American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, 240pp.

Del Ponte, E. M., C. V. Godoy, X. Li y X. B. Yang. 2006. Predicting severity of asian soybean rust epidemics with empirical rainfall models. Phytopathology 96(7): 797-803.

Dorrance, A., D. Hershman y M. Draper. 2008. Economic importance of soybean rust. En: A. Dorrance, M. Draper y D. Hershman (ed.). Using foliar fungicides to manage soybean rust, pp. 11-19. Land-Grant Universities Cooperating NCERA-208 y OMAF, Columbus.

Fernández, J. 2005. Incidencia y caracterización: morfológica, patogénica y genética de *Alternaria* spp. en cultivos de cebolla del sur de Puerto Rico. Tesis M.S. Universidad de Puerto Rico, Mayagüez, P.R., 167 pp.

FRAC. 2007. FRAC Code List2. http://www.frac.info/frac/publication/anhang/FRAC_Code_List_2007_web.pdf.

Frederick, R. D., C. L. Synder, G. L. Peterson y M. R. Bonde. 2002. Polymerase chain reaction assay for the detection and discrimination of the soybean rust pathogens *Phakopsora pachyrhizi* and *P. meibomiae.* Phytopathology 92(2): 217-227.

Galloway, J. 2008. Effective management of soybean rust and frogeye leaf spot using a mixture of flusilazole and carbendazim. Crop Protection 27: 566-571.

Godoy, C. V., L. Amorim y A. Bergamin. 1999. Influence of leaf wetness duration and temperature on the development of maize rust caused by *Puccinia polysora.* Fitopatol. Bras. 24:160-165.

Godoy, C. V. y M. G. Canteri. 2004. Efeitos protector, curativo e erradicante de fungicidas no controle da ferrugem da soja causada por *Phakopsora pachyrhizi,* em casa de vegetação. Fitopatol. Bras. 29: 97-101.

Harmon, C. L., P. F. Harmon, T. A. Mueller, J. J. Marois y G. L. Hartman. 2006. First report of *Phakopsora pachyrhizi* telia on kudzu in the United States. Plant Disease 90(3): 380.

Hartman, G. L., M. R. Bonde, M. M. Miles y R. D. Frederick. 2004. Variation of *Phakopsora pachyrhizi* isolates on soybean. En: Proceedings VII World Soybean Research Conference, 29 Febrero al 5 Marzo. Foz do Iguassu, Brasil, 440-446 pp.

Hartman, G. L., T. C. Wang y T. Hymowitz. 1992. Sources of resistance to soybean rust in perennial *Glycine* species. Plant Disease 76(4): 396-399.

Hartman, G. L., M. R. Miles y R. D. Frederick. 2005. Breeding for resistance to soybean rust. Plant Disease 89(6): 664-666.

Hartman G. L., M. R. Miles y R. D. Frederick. 2004. Epidemiology and spread of soybean rust. American seed trade association conference proceedings 1-9.

Hartwig, E. E. 1986. Identification of a fourth major gene conferring resistance to soybean rust. Crop Science 26: 1135-1136.

Hartwig, E. E. y K. R. Bromfield. 1983. Relationships among three genes conferring specific resistance to rust in soybeans. Crop Science 23: 237-239.

Henson, J. M. y R. French. 1993. The polymerase chain reaction and plant disease diagnosis. Annu. Rev. Phytopathol. 31: 81-109.

Hibbett, D. S., M. Binder, J. F. Bischoff, M. Blackwell, P. F. Cannon, O. E. Eriksson, S. Huhndorf, T. James, P. M. Kirk, R. Lu Cking, H. Thorstein Lumbsch, F. Lutzoni, P. B. Matheny, D. J. Mclaughlin, M. J. Powell, S. Redhead, C. L. Schoch, J. W. Spatafora, J. A. Stalpers, R. Vilgalys, M. C. Aime, A. Aptroot, R. Bauer, D. Begerow, G. L. Benny, L. A. Castlebury, P. W. Crous, Y. Dai, W. Gams, D. M. Geiser, G. W. Griffith, C. Gueidan, D. L. Hawksworth, G. Hestmark, K. Hosaka, R. A. Humber, K. D. Hyde, J. E. Ironside, U. Ko~Ljalg, C. P. Kurtzman, K. Larsson, R. Lichtwardt, J. Longcore, J. Mia Dlikowska, A. Miller, J. Moncalmo, S. Mozley-Standridge, F. Oberwinkler, E. Parmasto, V. Reeb, J. D. Rogers, C. Roux, L. Ryvarden, J. P. Sampaio, A. Schu¨bler, J. Sugiyama, R. G. Thorn, L. Tibell, W. A. Untereiner, C. Walker, Z. Wang, A. Weir, M. Weiss, M. M. White, K. Winka, Y. Yao y N. Zhang. 2007. A higher-level phylogenetic classification of the fungi. Mycological Research 111(5): 509-547.

Imazaki, I., Y. Homma, M. Kato, S. Vallone, J. T. Yorinori, A. A. Henning, H. Iizumi y S. Koizumi. 2006. Genetic relationships between *Cercospora kikuchii* populations from South America and Japan. Phytopathology 96(9): 1000-1008.

Isakeit, T., M. E. Miller, R. Saldaña, L. W. Barnes, J. M. McKemy, M. E. Palm, K. A. Zeller, R. DeVries-Paterson y L. Levy. 2006. First report of rust caused by *Phakopsora pachyrhizi* on soybean and kudzu in Texas. Pant Disease 90(7): 971.

Isard, S. A., N. S. Dufault, M. R. Miles, G. L. Hartman, J. M. Russo, E. D. De Wolf y W. Morel. 2006. The effect of solar irradiance on the mortality of *Phakopsora pachyrhizi* urediniospores. Pant Disease 90(7): 941-945.

Isard, S. A., J. M. Russo. 2007. Sentinel plots in the United States: Modeling the seasonal spread of soybean rust in North America. En: A. Dorrance, M. Draper y D. Hershman (ed.). Using foliar fungicides to manage soybean rust, pp. 39-40. Land-Grant Universities Cooperating NCERA-208 y OMAF, Columbus.

Kawuki, R. S., P. Tukamuhabwa y E. Adipala. 2004. Soybean rust severity, rate of rust development, and tolerance as influenced by maturity period and season. Crop Protection 23: 447-455.

Koenning, J. K., J. W. Frye, S. C. Butler y T. C. Creswell. 2007. First report of *Phakopsora pachyrhizi* on kudzu (*Pueraria Montana* var. *lobata*) in North Carolina and increased incidence of soybean rust on soybean in 2006. Pant Disease 91(5): 637.

Lamour, K., L. Finley, K. Snover, J. Stack, R. Hammerschmidt, J. Jacobs, J. Byrne, P. Harmon, A. Vitoreli, G. Wisler, C. Harmon, L. Levy, K. Zeller, C. Stone, D. Luster y R. Frederick. 2006. Early detection of asian soybean rust using PCR. Online. Plant Health Progress doi: 10.1094/PHP-2006-0524-01-RS.

Levy, C. 2005. Epidemiology and chemical control of soybean rust in Southern Africa. Plant Disease 89(6): 669-674.

Livingston, M., R. Johannson, S. Daberkow, M. Roberts, M. Ash y V. Breneman. 2004. Economic and policy implications of wind-borne entry of asian soybean rust into the United State. www.ers.usda.gov.

Linch, T. N., J. J. Marois, D. L. Wright, P. F. Harmon, C. L. Harmon, M. R. Miles y G. L. Hartman. 2006. First report of soybean rust caused by *Phakopsora pachyrhizi* on *Phaseolus* spp. in the United States. Plant Disease 90(7): 970.

Lutz, M., R. Bauer, D. Begerow y F. Oberwinkler. 2004. *Tuberculina:* Rust relatives attack rusts. Mycologia 96(3): 614-626.

Marchetti, M. A., F. A. Uecker y K. R. Bromfield. 1975. Uredial development of *Phakopsora pachyrhizi* in soybeans. Phytopathology 65: 822-823.

May-De Mio, L. L., Q. S. Novaes y E. Alves. 2006. Metodologias de preparação de amostras de ferrugem para estudos morfológicos de urediniósporos por meio de microscopia electrônica de varredura. Summa Phytopathologica 32(3): 267-273.

McLean, R. J. y Byth D. E. 1981. Histological studies of the pre-penetration development and penetration of soybeans by rust, *Phakopsora pachyrhizi* Syd. Aust. J. Agric. Res. 32: 435-443.

McLean, R. J. y Byth D. E. 1980. Inheritance of resistance to rust (*Phakopsora pachyrhizi*) in soybeans. Aust. J. Agric. Res. 31:951-956.

Meirelles, S. A. 2007. Quantificação de parâmetros da pré-penetração e monocíclicos relacionados ao patossistema *Phakopsora pachyrhizi*–soja. Tesis PhD. Universidade de São Paulo, Piracicaba, BR., 64pp.

Melching, J. S., W. M. Dowler, D. L. Koogle y M. H. Royer. 1989. Effects of duration, frequency, and temperature of leaf wetness periods on soybean rust. Plant Disease 73(2): 117-122.

Miles, M. R., G. L. Hartman, C. Levy y W. Morel. 2003. Current status of soybean rust control by fungicides. Pesticide Outlook 14: 197-200.

Miles, M. R., G. L. Hartman y R. D. Frederick. 2005. Management of asian soybean rust. En: Proceedings Illinois crop protection technology conference, 5 and 6 January, pp. 23-27. University of Illinois, Urbana.

Miles, M. R, R. D. Frederick y G. L. Hartman. 2003. Soybean rust: Is the U.S. soybean crop at risk? http://www.apsnet.org/online/feature/rust/.

Miles, M. R., M. A. Pastor-Corrales, G. L. Hartman y R. D. Frederick. 2007. Differential response of common bean cultivars to *Phakopsora pachyrhizi.* Plant Disease 91(6): 698-704.

Navarini, L. 2008. Resposta de cultivares de soja ao controle químico de ferrugem asiática. Tesis M.S. Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, BR., 86 pp.

Ono, Y., P. Buriticá y J. F. Hennen. 1992. Delimitation of *Phakopsora, Physopella* and *Cerotelium* and their species on leguminosae. Mycol. Res. 96(10): 825-850.

Pan, Z., X. B. Yang, S. Pivonia, L. Xue y R. Pasken. 2006. Long-term prediction of soybean rust entry into the continental United States. Plant Disease 90(7): 840-846.

Pastor-Corrales, M. A. y R. D. Frederick. 2008. Resistance to the soybean rust pathogen (*Phakopsora pachyrhizi*) in common bean cultivar CNC. Annu. Rep. Bean Improv. Coop. 51: 20-21.

Peterson, G. L., R. D. Frederick y M. R. Bonde. 1998. Sequence comparison of rRNA ITS regions to differentiate the soybean rust species *Phakopsora pachyrhizi* and *P. meibomiae.* Phytopathology 88(9): S70-71.

Pivonia, S. y X. B. Yang. 2006. Relating epidemic progress from a general disease model to seasonal appearance time of rusts in the United States: implications for soybean rust. Phytopathology 96(4): 400-407.

Pivonia, S. y X. B. Yang. 2004. Assessment of the potential year-round establishment of soybean rust throughout the world. Plant Disease 88(5): 523-529.

Posada-Buitrago, M. L. y R. D. Frederick. 2005. Expressed sequence tag analysis of the soybean rust pathogen *Phakopsora pachyrhizi.* Fungal Genetics and Biology 42: 949-962.

Rodrigues, J., D. Viteri, C. Estévez de Jensen y E. W. Kitajima. Occurrence of a whitefly transmitted *Carlavirus* in soybean in Puerto Rico. Phytopathology 98(6): S134.

Rossi, R. L. 2003. First Report of *Phakopsora pachyrhizi*, the causal organism of soybean rust in the province of Misiones, Argentina. Plant Disease 87(1): 102.

Rytter, J. L., W. M. Dowler y K. R. Bromfield. 1984. Additional alternative hosts of *Phakopsora pachyrhizi,* causal agent of soybean rust. Plant Disease 68(9): 818-819.

Sache, I. y C. De Vallavieille. 1993. Comparison of the wheat brown and yellow rusts for monocyclic sporulation and infection processes, and their polyciclic consequences. J. Phytopathol. 138(1): 55-65.

Saksirirat, W. y H. Hoppe. 1991. Teliospore germination of soybean rust fungus (*Phakopsora pachyrhizi* Syd.). J. Phytopathol. 132(4): 339-342.

Sbragia, R. J. 1975. Chemical control of plant diseases: an exciting future. Annu. Rev. Phytopathology 13: 257-269.

Shannon, W., K. Blascheck y E. Gonzalez de Mejia. 2005. Allergenic proteins in soybean: processing and reduction of P34 allergenicity. Nutrition Reviews 63(2): 47-58.

Schwinn, F. J. y P. Margot. 1991. Control with chemicals. En: D. Ingram y P. Williams (ed.). Advances in Plant Pathology, pp. 225-265. Academic Press Limited, San Diego, California.

Sikora, E. y D. Hershman. 2008. Soybean rust in review: 2004-2007. En: A. Dorrance, M. Draper y D. Hershman (ed.). Using foliar fungicides to manage soybean rust, pp. 20-28. Land-Grant Universities Cooperating NCERA-208 y OMAF, Columbus.

Sinclair, J. B. y P. A. Backman. 1989. Compendium of soybean diseases, Third edition. American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, 106 pp.

Sousa, P. F. C., E. Alves y H. A. Castro. 2006. Influência da temperatura no desenvolvimiento de teliósporos de *Phakopsora pachyrhizi* em folíolos de soja. Summa Phytopathologica 32(3): 227-231.

Soystat. 2008. World statistics. http://www.soystats.com/

Tenuta, A., D. Hershman, M. Draper y A. Dorrance. 2008. Fungicide basics. En: A. Dorrance, M. Draper y D. Hershman (ed.). Using foliar fungicides to manage soybean rust, pp. 48-56. Land-Grant Universities Cooperating NCERA-208 y OMAF, Columbus.

Ulloa, M. y R. T. Hanlin. 2006. Illustrated dictionary of Mycology. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, 448 pp.

USDA. 2008. Symptoms of soybean rust on soybean and other legumes. http://www.usda.gov/soybeanrust/downloads/soybean_rust_symptoms.pdf

Vakili, N. G. 1981. Distribution of *Phakopsora pachyrhizi* on *Lablab purpureus* in Puerto Rico. Plant Disease 65(10): 817-819.

Vakili, N. G. 1979. Field survey of endemic leguminous hosts of *Phakopsora pachyrhizi* in Puerto Rico. Plant Disease Reporter 63(11): 931-935.

Vakili, N. G. 1976. Field observations and host range of soybean rust, *Phakopsora pachyrhizi,* in Puerto Rico. En: Proccedings of the workshop on soybean rust in the western hemisphere, 14-17 November, pp. 4-15. Institute of Tropical Agriculture, Mayagüez.

Vakili, N. G. y K. R. Bromfield. 1976. Phakopsora rust on soybean and other legumes in Puerto Rico. Plant Disease Reporter 60(12): 995-999.

Van Der Plank, J. E. 1963. Plant diseases: epidemics and control. Academic Press Inc., New York, 349 pp.

Villavicencio A. L., G. B. Fanaro, M. M. Araújo, S. Aquino, P. V. Silva y J. Mancini-Filho. 2007. Detection of *Phakopsora pachyrhizi* by polymerase chain reaction (PCR) and use of germination test and DNA comet assay after e-beam processing in soybean. Radiation Physics and Chemistry 76: 1878-1881.

Viteri, D. 2008. Artrópodos plaga y enfermedades que afectan al cultivo de la soya [*Glycine max* L. (Merr.)] en Puerto Rico: monitoreo e identificación. Tesis M.S. Universidad de Puerto Rico, Mayagüez, PR., 145 pp.

White, T. J., T. Bruns, S. Lee y J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En: M. Innis, D. Gelfand, J. Sninsky y T. White (ed.). PCR Protocols a guide to methods and applications, pp. 315-322. Academic Press, San Diego, California.

Yang, X. B. 2008. The importance of risk assessment. En: A. Dorrance, M. Draper y D. Hershman (ed.). Using foliar fungicides to manage soybean rust, pp. 29-34. Land-Grant Universities Cooperating NCERA-208 y OMAF, Columbus.

Yang, X. B. 2007. NCSRP and USA protocol for soybean rust sentinel plots. http://www.stopsoybeanrust.com/images/NCRSP_USDA%20.pdf

Yeh, C. C., A. T. Tschanz y J. B. Sinclair. 1981. Induced teliospore formation by *Phakopsora pachyrhizi* on soybeans and other hosts. Phytopathology 71(10): 1111-1112.

Yorinori, J. T., W. M. Paiva, R. D. Frederick, L. M. Costamilan, P. F. Bertagnolli, G. E. Hartman, C. V. Godoy y J. Nunes. 2005. Epidemics of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi*) in Brazil and Paraguay from 2001 to 2003. Plant Disease 89(6): 675-677.

APÉNDICE 1

Monitoreos realizados en Puerto Rico durante 2006-2008.

FECHA	LATITUD	LONGITUD	ALTITUD (ft)	CULTIVO	PRESENCIA DE *P. meibomiae*
03-Nov-06	N 18°11.897´	W 066°47.895´	1487	*Lablab purpureus*	SI
				Pueraria phaseoloides	NO
				Chamaecrista nictitans	NO
10-Nov-06	N 18°11.162´	W 066°45.411´	1886	*Lablab purpureus*	SI
				Vigna luteola	NO
				Macroptilium lathyroides	NO
				Vigna vexillata	NO
10-Nov-06	N 18°11.810´	W 066°47.840´	1638	*Vigna luteola*	NO
				Crotalaria retusa	NO
				Lablab purpureus	SI
				Pueraria phaseoloides	NO
				Macroptilium lathyroides	NO
				Chamaecrista nictitans	NO
10-Nov-06	N 18°10.474´	W 066°47.962´	1840	*Lablab purpureus*	SI
				Pueraria phaseoloides	NO
17-Nov-06	N 18º28.012´	W 067º03.289´	425	*Canavalia gladiata*	NO
				Pachyrhizus erosus	NO
				Mucuna pruriens	NO
17-Nov-06	N 18º12.920´	W 066º43.535´	831	*Lablab purpureus*	SI
17-Nov-06	N 18º11.897´	W 066º43.729´	1487	*Lablab purpureus*	SI
17-Nov-06	N 18º14.692´	W 066º43.258´	742	*Lablab purpureus*	SI
07-Abr-07	N 18°12.455´	W 066°48.551´	1707	*Lablab purpureus*	SI
				Phaseolus sp.	NO
24-Abr-07	N 18º28.012´	W 067º03.289´	425	*Vigna luteola*	SI
28-Abr-07	N 18°10.180´	W 066°39.144´	2475	*Pueraria phaseoloides*	NO
				Rhynchosia reticulata	NO
				Chamaecrista nictitans	NO
28-Abr-07	N 18°11.632´	W 066°37.516´	1392	*Lablab purpureus*	SI
				Pueraria phaseoloides	NO
				Macroptilium lathyroides	NO
28-Abr-07	N 18°13.040´	W 066°36.072´	1369	*Lablab purpureus*	SI
28-Abr-07	N 18°12.990	W 066°37.911	1431	*Lablab purpureus*	NO
				Macroptilium lathyroides	NO
				Cajanus cajan	NO
28-Abr-07	N 18°14.611´	W 066°39.661´	979	*Crotalaria retusa*	NO
				Pueraria phaseoloides	NO
				Macroptilium lathyroides	NO
28-Abr-07	N 18°18.041´	W 066°37.201´	1154	*Lablab purpureus*	SI
				Macroptilium lathyroides	NO
28-Abr-07	N 18°12.489´	W 066°43.560´	1140	*Lablab purpureus*	SI
				Pueraria phaseoloides	NO

FECHA	LATITUD	LONGITUD	ALTITUD (ft)	CULTIVO	PRESENCIA DE *P. meibomiae*
10-May-07	N 18°08.207´	W 066°17.524´	2028	*Lablab purpureus*	SI
10-May-07	N 18°17.171´	W 066°15.938´	1214	*Macroptilium lathyroides*	NO
10-May-07	N 18°16.908´	W 066°18.224´	1764	*Lablab purpureus*	SI
				Pueraria phaseoloides	NO
				Macroptilium lathyroides	NO
				Chamaecrista nictitans	NO
10-May-07	N 18°08.248´	W 066°17.550´	2078	*Lablab purpureus*	SI
05-Jun-07	N 18°28.012´	W 067°03.289´	425	*Vigna luteola*	SI
08-Jun-07	N 18°10.474´	W 066°47.961´	1838	*Lablab purpureus*	SI
				Canavalia gladiata	NO
				Mucuna pruriens	NO
				Pachyrhizus erosus	NO
22-Jun-07	N 18°10.474´	W 066°47.961´	1838	*Phaseolus lunatus*	SI
				Macroptilium lathyroides	SI
				Crotalaria retusa	NO
29-Jun-07	N 18°10.474´	W 066°47.961´	1838	*Crotalaria retusa*	NO
10-Jul-07	N 18°08.207´	W 066°17.524´	2028	*Lablab purpureus*	SI
10-Jul-07	N 18°11.210´	W 066°18.904	1916	*Lablab purpureus*	SI
10-Jul-07	N 18°16.908´	W 066°18.224´	1764	*Lablab purpureus*	SI
				Pueraria phaseoloides	NO
				Macroptilium lathyroides	NO
				Chamaecrista nictitans	NO
				Cajanus cajan	NO
10-Jul-07	N 18°17.171´	W 066°15.938´	1214	*Macroptilium lathyroides*	NO
				Crotalaria retusa	NO
10-Jul-07	N 18°14.136´	W 066°17.342´	2002	*Pueraria phaseoloides*	NO
				Vigna luteola	SI
				Macroptilium lathyroides	NO
				Chamaecrista nictitans	NO
18-Jul-07	N 18°09.662´	W 066°30.529´	2502	*Pueraria phaseoloides*	NO
				Chamaecrista nictitans	NO
18-Jul-07	N 18°11.016´	W 066°30.372´	1891	*Lablab purpureus*	SI
				Vigna luteola	NO
				Pueraria phaseoloides	NO
18-Jul-07	N 18°13.040´	W 066°36.072´	1369	*Lablab purpureus*	SI
18-Jul-07	N 18°10.180´	W 066°39.143´	2476	*Lablab purpureus*	NO
				Pueraria phaseoloides	NO
				Macroptilium atropurpureum	NO
18-Jul-07	N 18°11.679´	W 066°37.482´	1390	*Lablab purpureus*	SI
18-Jul-07	N 18°16.796´	W 066°45.225´	1473	*Vigna luteola*	NO
				Macroptilium lathyroides	NO
				Pueraria phaseoloides	NO
				Chamaecrista nictitans	NO
				Vigna vexillata	NO

FECHA	LATITUD	LONGITUD	ALTITUD (ft)	CULTIVO	PRESENCIA DE *P. meibomiae*
24-Ago-07	N 18°19.576´	W 066°24.234´	774	*Lablab purpureus*	NO
				Teramnus sp.	NO
	N 18°11.170´	W 066°45.365´	1964	*Vigna luteola*	NO
				Crotalaria retusa	NO
				Chamaecrista nictitans	NO
				Macroptilium lathyroides	NO
				Crotalaria brevidens	NO
				Lablab purpureus	SI
28-Ago-07	N 18°11.171´	W 066°45.363´	1964	*Pueraria phaseoloides*	NO
	N 18°10.855´	W 066°46.123´	1842	*Lablab purpureus*	SI
14-Sep-07	N 18°10.179´	W 066°35.254´	3597	*Centrosema plumieri*	NO
				Chamaecrista nictitans	NO
	N 18°10.855´	W 066°46.123´	1842	*Lablab purpureus*	SI
				Vigna sp.	SI
				Pueraria phaseoloides	NO
				Vigna luteola	NO
				Macroptilium lathyroides	NO
14-Sep-07	N 18°13.034´	W 067°08.911´	71	*Pueraria phaseoloides*	NO
				Vigna unguiculata	NO
				Centrosema plumieri	NO
				Macroptilium lathyroides	NO
12-Nov-07	N 18°01.543´	W 066°31.511´	1002	*Lablab purpureus*	SI
				Vigna unguiculata	NO
				Macroptilium lathyroides	NO
				Pueraria phaseoloides	NO
06-Dic-07	N 18°05.925´	W 066°38.714´	1101	*Lablab purpureus*	SI
				Vigna luteola	NO
				Pueraria phaseoloides	NO
24-Ene-08	N 18°18.260´	W 066°34.615´	1125	*Teramnus sp.*	NO
				Crotalaria retusa	NO
				Macroptilium lathyroides	NO
				Pueraria phaseoloides	NO
				Lablab purpureus	SI
08-Abr-08	N 18°28.012´	W 067°03.289´	425	*Lablab purpureus*	SI
				Phaseolus lunatus C.V neeve	SI
				Phaseolus lunatus C.V. Christmas been	SI
				Pachyrhizus erosus	SI
				Phaseolus lunatus (local)	NO
				Canavalia gladiata	NO
				Canavalia maritima	NO
				Vigna unguiculata	NO
				Crotalaria juncea	NO
				Phaseolus coccineus	NO
11-Jun-08	N 18°01.640´	W 066°31.625´	177	*Lablab purpureus*	NO
				Clitoria ternatea	NO
				Neonotonia wigthii	NO

APÉNDICE 2

Alineamiento múltiple para aislados de *P. meibomiae* utilizando el programa BioEdit, versión 7.0.4.1, a través del parámetro ClustalW

```
             ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                 5          15         25         35         45         55
P.meibomiae  GGAAGTAAAA GTCGTAACAA GGTTTCCGTA GGTGAACCTG CGGAAGGATC ATTAATAAAA
LP17         ---------- ---------- --CTTCCGTA GGGTAACCTG CGGAAGGATC ATTAATAAAA
LP18         ---------- ---------- --CTTCCGTA GGGTAACCTG CGGAAGGATC ATTAATAAAA
LP19         ---------- ---------- ---TTCCGTA GGTGAACCTG CGGAAGGATC ATTAATAAAA
LP20         ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ATTAATAAAA
LP21         ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
LP22         ---------- ---------- ---------- ---------- --GAAGGATC ATTAATAAAA
LP23         ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----ATAAAA
LP24         ---------- ---------- ---------- --------TG CGGAAGGATC ATTAATAAAA

             ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                 65         75         85         95        105        115
P.meibomiae  AGCTTAAAAA AGAGTGCACT TAATTGTGGC TCTAAACACA AAACTTTTTA TATAAACCCA
LP17         AGCTTAAAAA AGAGTGCACT TAATTGTGGC TCTAAACACA AAACTTTTTA TATAAACCCA
LP18         AGCTTAAAAA AGAGTGCACT TAATTGTGGC TCTAAACACA AAACTTTTTA TATAAACCCA
LP19         AGCTTAAAAA AGAGTGCACT TAATTGTGGC TCTAAACACA AAACTTTTTA TATAAACCCA
LP20         AGCTTAAAAA AGAGTGCACT TAATTGTGGC TCTAAACACA AAACTTTTTA TATAAACCCA
LP21         ---------- ---------- TAATTGTGGC TCTAAACACA AAACTTTTTA TATAAACCCA
LP22         AGCTTAAAAA AGAGTGCACT TAATTGTGGC TCTAAACACA AAACTTTTTA TATAAACCCA
LP23         AGCTTAAAAA AGAGTGCACT TAATTGTGGC TCTAAACACA AAACTTTTTA TATAAACCCA
LP24         AGCTTAAAAA AGAGTGCACT TAATTGTGGC TCTAAACACA AAACTTTTTA TATAAACCCA

             ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                125        135        145        155        165        175
P.meibomiae  TTTAAACTGG CTCAGCTACT TCATTGAAGT TTTTGGGCAA ATCACAGCTT TGAAAAAAGT
LP17         TTTAAACTGG CTCAGCTACT TCATTGAAGT TTTTGGGCAA ATCACAGCTT TGAAAAAAGT
LP18         TTTAAACTGG CTCAGCTACT TCA-TGAAGT TTTTGGGCAA ATCACAGCTT TGAAAAAAGT
LP19         TTTAAACTGG CTCAGCTACT TCATTGAAGT TTTTGGGCAA ATCACAGCTT TGAAAAAAGT
LP20         TTTAAACTGG CTCAGCTACT TCATTGAAGT TTTTGGGCAA ATCACAGCTT TGAAA---GT
LP21         TTTAAACTGG CTCAGCTACT TCATTGAAGT TTTTGGGCAA ATCACAGCTT TGAAAAAAGT
LP22         TTTAAACTGG CTCAGCTACT TCATTGAAGT TTTTGGGCAA ATCACAGCTT TGAAAAAAGT
LP23         TTTAAACTGG CTCAGCTACT TCATTGAAGT TTTTGGGCAA ATCACAGCTT TGAAAAAAGT
LP24         TTTAAACTGG CTCAGCTACT TCATTGAAGT TTTTGGGCAA ATCACAGCTT TGAAAAAAGT

             ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                185        195        205        215        225        235
P.meibomiae  TGCAAATCAT CTATTATATC ATTGTCATTT TTTATTTTAT TAAATAACCA AAGTCACAAA
LP17         TGCAAATCAT CTATTATATC ATTGTCATTT TTTATTTTAT TAAATAACCA AAGTCACAAA
LP18         TGCAAATCAT CTATTATATC ATTGTCATTT TTTATTTTAT TAAATAACCA AAGTCACAAA
LP19         TGCAAATCAT CTATTATATC ATTGTCATTT TTTATTTTAT TAAATAACCA AAGTCACAAA
LP20         TGCAAATCAT CTATTATATC ATTGTCATTT TTTATTTTAT TAAATAACCA AAGTCACAAA
LP21         TGCAAATCAT CTAT--TATC ATTGTCATTT TTTATTTTAT TAAATAACCA AAGTCACAAA
LP22         TGCAAATCA- CTATTATATC ATTGTCATTT TTTATTTTAT TAAATAACCA AAGTCACAAA
LP23         TGCAAATCAT CTATTATATC ATTGTCATTT TTTATTTTAT TAAATA---- AAGTCACAAA
LP24         TGCAAATCAT CTATTATATC ATTGTCATTT --TATTTTAT TAAATAACCA AAGTCACAAA

             ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                245        255        265        275        285        295
P.meibomiae  GAATGTTTTA TAAATTTTAA AAAATATATA TAACTTTTAG CAATGGATCT CTAGGCTCTC
LP17         GAATGTTTTA TAAATTTTAA AAAATATATA TAACTTTTAG CAATGGATCT CTAGGCTCTC
LP18         GAATGTTTTA TAAATTTTAA AAAATATATA TAACTTTTAG CAATGGATCT CTAGGCTCTC
LP19         GAATGTTTTA TAAATTTTAA AAAATATATA TAACTTTTAG CAATGGATCT CTAGGCTCTC
LP20         GAATGTTTTA TAAATTTTAA AAAATATATA TAACTTTTAG CAATGGATCT CTAGGCTCTC
LP21         GAATGTTTTA TAAATTTTAA AAAATATATA TAACTTTTAG CAATGGATCT CTAGG--CTC
LP22         GAATGTTTTA TAAATTTTAA AAAATATATA TAACTTTTAG CAATGGATCT CTAGGCTCTC
LP23         GAATGTTTTA TAAATTTTAA AAAATATATA TAACTTTTAG CAATGGATCT CTAGGCTCTC
LP24         GAATGTTTTA TAAATTTTAA AAAATAT--A TAACTTTTAG CAATGGATCT CTAGGCTCTC

             ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                305        315        325        335        345        355
P.meibomiae  ATATCGATGA AGAACACAGT GAAATGTGAT AATTAATGTG AATTGCAGAA TTCAGTGAAT
LP17         ATATCGATGA AGAACACAGT GAAATGTGAT AATTAATGTG AATTGCAGAA TTCAGTGAAT
LP18         ATATCGATGA AGAACACAGT GAAATGTGAT AATTAATGTG AATTGCAGAA TTCAGTGAAT
```

```
LP19         ATATCGATGA AGAACACAGT GAAATGTGAT AATTAATGTG AATTGCAGAA TTCAGTGAAT
LP20         ATATCGATGA AGAACACAGT GAAATGTGAT AATTAATGTG AATTGCAGAA TTCAGTGAAT
LP21         ATATCGATGA AGAACACAGT GAAATGTGAT AATTAATGTG AATTGCAGAA TTCAGTGAAT
LP22         ATATCGATGA AGAACACAGT GAAATGTGAT AATTAATGTG AATTGCAGAA TTCAGTGAAT
LP23         ATATCGATGA AGAACACAGT GAAATGTGAT AATTAATGTG AATTGCAGAA TTCAG--AAT
LP24         ATATCGATGA AGAACACAGT GAAATGTGAT AATTAATGTG AATTGCAGAA TTCAGTGAAT

             ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                365        375        385        395        405        415
P.meibomiae  CATCAAGTTT TTGAACGCAC CTTGCACCTT TTGGTATTCC AAAAGGTACA CCTGTTTGAG
LP17         CATCAAGTTT TTGAACGCAC CTTGCACCTT TTGGTATTCC AAAAGGTACA CCTGTTTGAG
LP18         CATCAAGTTT TTGAACGCAC CTTGCACCTT TTGGTATTCC AAAAGGTACA CCGGTTTGAG
LP19         CATCAAGTTT TTGAACGCAC CTTGCACCTT TTGGTATTCC AAAAGGTACA CCTGTTTGAG
LP20         CATCAAGTTT TTGAACGCAC CTTGCACCTT TTGGTATTCC AAAAGGTACA CCTGTTTGAG
LP21         CATCAAGTTT TTGAACGCAC CTTGCACCTT TTGGTATTCC AAAAGGTACA CCTGTTTGAG
LP22         CATCAAGTTT TTGAACGCAC CTTGCACCTT TTGGTATTCC AAAAGGTACA CCTGTTTGAG
LP23         CATCAAGTTT TTGAACGCAC CTTGCACCTT TTGGTATTCC AAAAGGTACA CCTGTTTGAG
LP24         CATCAAGTTT TTGAACGCAC CTTGCACCTT TTGGTATTCC AAAAGGTACA CCTGT--GAG

             ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                425        435        445        455        465        475
P.meibomiae  TGTCATGAAT TATTCTCAAC TCTTTCTTTA TTTACTTGAA GAAAAGCATG TTGGATTTTG
LP17         TGTCATGAAT TATTCTCAAC TCTTTCTTTA TTTACTTGAA GAAAAGCATG TTGGATTTTG
LP18         TGTCATGAAT TATTCT-AAC TCTTTCTTTA TTTACTTGAA GAAAAGCATG TTGGATTTTG
LP19         TGTCATGAAT TATTCTCAAC TCTTTCTTTA TTTACTTGAA GAAAAGCATG TTGGATTTTG
LP20         TGTCATGAAT TATTCTCAAC TCTTTCTTTA TTTACTTGAA GAAAAGCATG TTGGATTTTG
LP21         TGTCATGAAT TATTCTCAAC TCTTTCTTTA TTTACTTGAA GAAAAGCATG TTGGATTTTG
LP22         TGTCATGAAT TATTCTCAAC TCTTTCTTTA TTTACTTGAA GAAAAGCATG TTGGATTTTG
LP23         TGTCATGAAT TATTCTCAAC TCTTTCTTTA TTTACTTGAA GA-AAGCATG TTGGATTTTG
LP24         TGTCATGAAT TATTCTCAAC TCTTTCTTTA TTTACTTGAA GAAAAGCATG TTGGATTTTG

             ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                485        495        505        515        525        535
P.meibomiae  AGTGCATATA TATATGGTGT AATAATAACA AACATTTCAT CATTGATTTA TATAAAGGAA
LP17         AGTGCATATA TATATGGTGT AATAATAACA AACATTTCAT CATTGATTTA TATAAAGGAA
LP18         AGTGCATATA TATATGGTGT AATAATAACA AACATT---- ---------- ----------
LP19         AGTGCATATA TATATGGTGT AATAATAACA AACATTTCAT CATTGATTTA TATAAAGGAA
LP20         AGTGCATATA TATATGGTGT AATAATAACA AACATTTCAT CATTGATTTA TATAAAGGAA
LP21         AGTGCATATA TATATGGTGT AATAATAACA AACATTTCAT CATTGATTTA TATAAAGGAA
LP22         AGTGCATATA TATATGGTGT AATAATAACA AACATTTCAT CATTGAT--- TATAAAGGAA
LP23         AGTGCATATA TATATGGTGT AATAATAACA AACATTTCAT CATTGATTTA TATAAAGGAA
LP24         AGTGCATATA TATATGGTGT AATAATAACA AACATTTCAT CATTGATTTA TATAAAGGAA

             ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                545        555        565        575        585        595
P.meibomiae  TATATATAGT ATTAAATTAT TATTATTATT AAATTTTAAG ACCTCAAATC AGGTGGGACT
LP17         TATATATA-- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
LP18         ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
LP19         TATATATAGT ATTAAATTAT TATTATTATT AAATTT---- ---------- ----------
LP20         TATATATAGT ATTAAATTAT TATTATTATT AAATTTTA-- ---------- ----------
LP21         TATATATAGT ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
LP22         TATATATAGT ATTAAATTAT TATTATTATT AAATTTTAAG ACCTCAAATC A---------
LP23         TATATATAGT AT-------- ---------- ---------- ---------- ----------
LP24         TATATATAGT ATTAAATTAT TATTATTATT AAATTTTAAG ACCTCAA--- ----------

             ....|....| ....|....| ....|....| ....|
                605        615        625        635
P.meibomiae  ACCCACTGAA CTTAAGCATA TCAATAAGCG GAGGA
LP17         ---------- ---------- ---------- -----
LP18         ---------- ---------- ---------- -----
LP19         ---------- ---------- ---------- -----
LP20         ---------- ---------- ---------- -----
LP21         ---------- ---------- ---------- -----
LP22         ---------- ---------- ---------- -----
LP23         ---------- ---------- ---------- -----
```

```
LP24          ---------- ---------- ---------- -----
```