COMPARACIÓN DE MÉTODOS PARA CUANTIFICAR SEVERIDAD DE LA ROYA DEL CAFETO EN DIFERENTES TAMAÑOS DE HOJAS

COMPARISON OF METHODS TO QUANTIFY SEVERITY OF COFFEE RUST IN DIFFERENT LEAF SIZES

Palomo-Bárcenas, Sebastian; Silva-Acuña, Ramón; Sánchez-Cuevas, Maria Claudia; Romero-Marcano, Guillermo

Sebastian Palomo-Bárcenas
Universidad de Oriente, Venezuela
Ramón Silva-Acuña
drramonsilvaa@gmail.com
Universidad de Oriente y Clínica Universitaria de Diagnóstico Agrícola, Venezuela
Maria Claudia Sánchez-Cuevas
Universidad de Oriente y Clínica Universitaria de Diagnóstico Agrícola, Venezuela
Guillermo Romero-Marcano
Escuela de Zootecnia, Venezuela

Revista ESPAMCIENCIA
Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí, Ecuador
ISSN: 1390-8103
Periodicidad: Semestral
vol. 13, núm. 2, 2022
revista@espam.edu.ec

Recepción: 30 Mayo 2022
Aprobación: 27 Diciembre 2022

URL: http://portal.amelica.org/ameli/journal/527/5274204006/

DOI: https://doi.org/10.51260/revista_espamciencia.v13i2.345

Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional.

Resumen: La roya del cafeto es la enfermedad más importante del cultivo, la severidad del daño foliar causado por el patógeno provoca abscisión foliar y repercute significativamente en la reducción de los rendimientos. Se realizó esta investigación con el objetivo de comparar el método visual con uno digital, en la cuantificación del porcentaje de severidad de la roya en diferentes tamaños de hojas. Las cuantificaciones de la enfermedad se realizaron en la Clínica Universitaria de Diagnóstico Agrícola de la Universidad de Oriente. Para la realización del experimento fueron recolectadas 360 hojas lesionadas con roya en plantaciones de Catuaí Rojo y divididas en tres grupos, categorizadas según el área foliar en grandes, medianas y pequeñas, cada grupo estuvo representado por 120 hojas, inicialmente evaluadas por el método visual por dos observadores con la ayuda de la escala diagramática y posteriormente con método digital mediante el análisis de imágenes con el programa ImageJ®. Se utilizó el diseño en bloques al azar con arreglo factorial 2x3 con diez repeticiones por unidad experimental. Los datos fueron procesados mediante análisis de varianza. Se constató que el porcentaje de severidad no presentó diferencias estadísticas para la metodología digital cuando se cambió el tamaño de las hojas; mientras que, para la metodología visual hubo influencia del tamaño de las hojas, observándose que la severidad estimada aumento a medida que el tamaño de las hojas disminuyó. El método digital es una alternativa confiable para la cuantificación de la severidad de ataque por la roya del cafeto.

Palabras clave: Herrumbre del café, enfermedad foliar, área esporulada, método digital.

Abstract: Coffee rust is the most important disease of the crop, the severity of leaf damage caused by the pathogen causes leaf abscission and significantly affects the reduction of yields. This investigation was carried out with the objective of comparing the visual method with a digital one, in the quantification of the percentage of severity of the rust in different sizes of leaves. The quantifications of the disease were carried out at the University Clinic for Agricultural Diagnostics at Oriente University. To carry out the experiment, 360 leaves injured with rust were

collected from Catuaí Rojo plantations and divided into three groups, categorized according to leaf area into large, medium and small, each group was represented by 120 leaves, initially evaluated by the visual method by two observers with the help of the diagrammatic scale and later with the digital method by analyzing images with the ImageJ® program. The randomized block design was used with a 2x3 factorial arrangement with ten repetitions per experimental unit. The data were processed by analysis of variance. It was found that the severity percentage did not present statistical differences for the digital methodology when the size of the sheets was changed; while, for the visual methodology, there was an influence of the size of the leaves, observing that the estimated severity increased as the size of the leaves decreased. The digital method is a reliable alternative for the quantification of the severity of attack by coffee rust.

Keywords: Coffee rust, foliar disease, sporulated area, digital method.

INTRODUCCIÓN

La roya de la hoja del café causada por el hongo Hemileia vastatrix Berk & Br., es la enfermedad más importante que afecta al cafeto. El daño foliar ocasionado tanto por la esporulación del hongo, como también por la necrosis de los tejidos en las áreas afectadas; además, de la caída de las hojas afectadas por efecto de la enfermedad, limitan de manera significativa la producción del cafeto. Esa reducción es producto de la afectación del principal órgano fotosintético de la planta, lo que imposibilita la producción de azúcares para el llenado de los frutos (Arneson, 2000; Waller et al. 2007). La disminución promedio de los rendimientos anuales ocasionada por la roya reporta un 35%, dependiendo de las condiciones ambientales y el control fitosanitario aplicado (Rodrigues y Gil de Oliveira, 2013). Esta enfermedad está considerada en el ámbito mundial como una de las siete más peligrosas que atacan las plantas tropicales y es sin duda la enfermedad más dañina del café (Subero, 2005).

El deterioro del cultivo es gradual, la producción sigue una oscilación estacional y en pocos años los niveles de producción se reducen a niveles no rentables para la sostenibilidad del cultivo; claro está, si no se consideran las medidas adecuadas de control, sea el uso de fungicidas sistémicos y/o protectores o con el uso de variedades resistentes (García, 2013). El patógeno también debilita a las plantas enfermas y en infecciones severas puede ocasionar muerte regresiva en ramas e incluso la muerte de los árboles (Zambolim, 2009; APS, 2021).

Por su parte, la severidad de una enfermedad se refiere al área de tejido de la planta que se encuentra enferma (Castaño-Zapata, 2017). La estimación de la severidad se utiliza para evaluar medidas de control, niveles de resistencia, eficiencia de fungicidas y para desarrollar modelos de pérdida de cosechas (Bock et al., 2010). Las evaluaciones de severidad durante la epidemia de la roya del café deben tener como objetivo asegurar que las estimaciones sean confiables y precisas (Silva-Acuña et al., 1999; Capucho et al., 2011).

Entre las técnicas de cuantificación de la severidad están las medidas relacionadas, la estimación visual (Cowling y Horsfall, 1978) y el uso de métodos electrónicos (Guzmán et al., 2003). Particularmente para el caso de las royas el método visual es el más utilizado para evaluar la severidad de la enfermedad, debido a su sencillez, rapidez y bajo costo, con el uso de escalas o claves pictográficas que muestran el aumento progresivo de las lesiones; estas escalas diagramáticas, muestran series o partes de plantas con diferentes niveles de gravedad de los síntomas (James, 1971; Navarro y Arauz, 1999; Sauceda-Acosta et al., 2015).

Para la roya del café existen diferentes escalas de determinación visual de la severidad, como la desarrollada por Kushalappa y Chaves (1978) que muestra una hoja de 50 cm2 con lesiones de 1, 3, 5, 7 y 10 %, donde el

evaluador debe comparar la hoja de la escala con la hoja real. Otras escalas, se han divulgado con la ayuda del internet como la de GSV-SINAVEF-LANREF (2016) la cual utiliza fotografías de hojas reales con diferentes porcentajes de severidad. Sin embargo, la debilidad de los métodos visuales es la variabilidad en los resultados, baja repetitividad, imprecisión, traducido en menor confiabilidad, lo cual frecuentemente ocurre debido al sesgo del observador, que genera medidas erradas (Sherwood et al., 1983; Kranz, 1988; Bock et al., 2008; Bade y Carmona, 2011).

La subjetividad del método visual puede deberse al cansancio y pérdida de concentración de los evaluadores, disminuyendo así su exactitud, por lo que puede ocurrir un intercambio sustancial entre la variabilidad (subjetividad). En algunos casos, es posible que sea necesario repetir la capacitación para aumentar la calidad del evaluador. La evaluación visual puede ser destructiva, si el material es recogido en el terreno para su posterior evaluación en el laboratorio, de esta manera, los evaluadores están propensos a diversas ilusiones (número/tamaño de la lesión y área infectada) (Bock et al., 2010); además de esas desventajas, es importante considerar que algunas enfermedades pueden extenderse en áreas extremadamente grandes en las hojas, lo que hace del monitoreo una tarea desafiante. Esos problemas pueden ser resueltos, o al menos minimizados mediante el uso de fotografías combinadas con algún tipo de procesamiento de imágenes y, en algunos casos, reconocimiento de patrones y herramientas de clasificación que permitan obtener resultados consistentes, precisos y sin necesidad de usar técnicas destructivas (Bock et al., 2008; Velázquez et al., 2011; García, 2013).

El procesamiento y análisis de imágenes fotográficas para la cuantificación de severidad de enfermedades foliares es una alternativa que permite identificar tamaño, forma y número de lesiones, dejando a un lado la subjetividad del método visual permitiendo obtener resultados precisos y exactos (Patil y Bodhe, 2011; Velázquez et al., 2011; Rathod et al., 2013). Assess® 2.0 e ImageJ® son programas para computadoras que permiten de forma rápida y sencilla la determinación del área foliar afectada utilizando imágenes digitales (García, 2013). ImageJ® permite determinar el área de objetos gráficos en los que se introduce una referencia de tamaño conocido; es un software libre disponible en la dirección electrónica http://rsbweb.nih.gov/ij/, desarrollado por el National Institutes of Health de Estados Unidos (Rasband, 2017).

En razón de lo antes señalado, el objetivo del ensayo fue comparar el método visual utilizando como referencia la escala desarrollada por Kushalappa y Chaves (1978) y el método digital que emplea fotografías procesadas en el software ImageJ® para la cuantificación de severidad de la roya del cafeto en diferentes tamaños de hojas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación del ensayo

El experimento se realizó en la Clínica Universitaria de Diagnóstico Agrícola (CUDA) del Postgrado de Agricultura Tropical de la Universidad de Oriente, Campus Juanico, en Maturín, estado Monagas, Venezuela, ubicada en las coordenadas geográficas 9° 45′ LN y 63° 11′ LO, a la altitud de 65 m (Climate-Data.org, 2020). Las hojas de café var. Catuaí rojo afectadas con roya se colectaron en la Estación Experimental Caripe del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA), ubicada en la población de San Agustín, parroquia la Guanota, municipio Caripe, a 63°32′35′′ LO y 10°12′40′′ LN (Satélite Magellan/Explorist), a la altitud de 1.132 m.s.n.m.

Tamaño y agrupamiento de las muestras

Se recolectaron y organizaron ascendentemente, en función del área foliar 360 hojas de café lesionadas con roya. Estas se dividieron en tres grupos de 120 cada uno, según el tamaño: grandes (69,85 a 128,58 cm2), medianas (43,99 a 69,84 cm2) y pequeñas (10,31 a 43,98 cm2). Cada una de las hojas fue evaluada visual y digitalmente, obteniendo 720 datos de severidad entre las dos metodologías. El cálculo del área foliar se realizó con ayuda del programa ImageJ®, según la metodología descrita por Rincón et al. (2012).

Evaluación visual de la severidad de la roya

Se utilizó como escala el diagrama elaborado por Kushalappa y Chaves (1978) (Figura 1). La evaluación fue realizada por dos personas con experiencia en el área y consistió en comparar el tamaño de las lesiones del diagrama con las de hojas muestreadas para cuantificar la severidad o el área foliar afectada por la enfermedad.

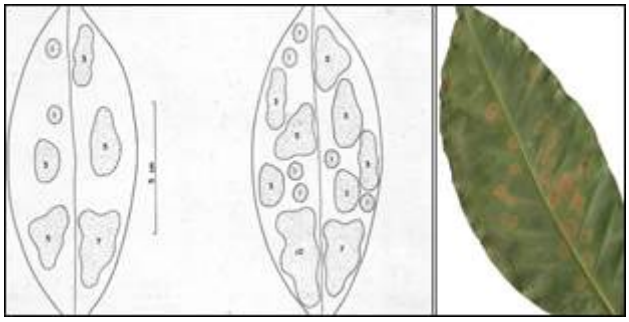

FIGURA 1
Escala para evaluar el porcentaje de área foliar afectada por roya del café (A) y hoja de cafeto afectada por roya (B).

Al finalizar la evaluación visual de severidad, los valores determinados individualmente por los dos evaluadores fueron promediados para cada hoja.

Evaluación digital de la severidad de la roya

Se fotografiaron las hojas con una cámara digital BenQ DC P1410 de 14 megapíxel, sobre un fondo blanco, el cual tenía impreso una línea de referencia de 3 cm, posteriormente las fotografías fueron pasadas de la memoria de la cámara a una carpeta de una computadora de escritorio. Para realizar la evaluación digital se descargó e instaló el software ImageJ® (Rasband, 2017).

La cuantificación de la severidad mediante el programa involucró una serie de pasos enmarcados en un procedimiento de tres etapas: primera etapa, definición de la escala; segunda etapa, cálculo del área foliar; y tercera etapa, cálculo del área afectada por roya (Figura 2).

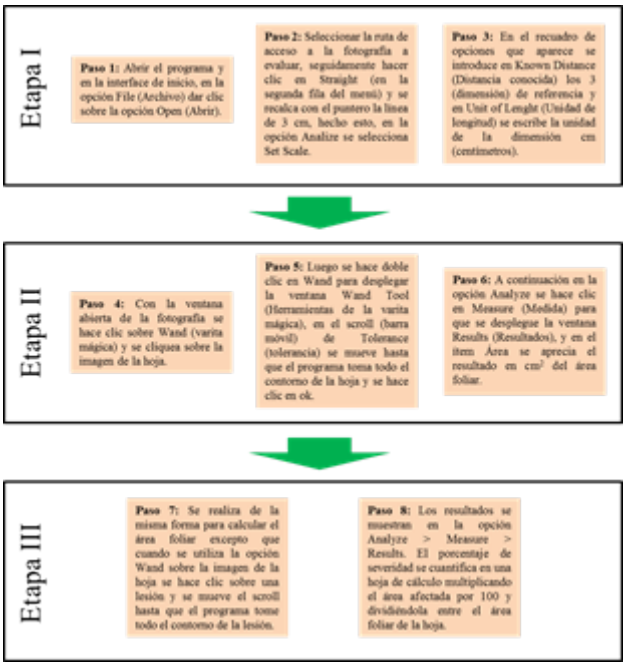

FIGURA 2
Procedimiento para cuantificar la severidad de la roya utilizando el programa ImageJ®
Etapa I: Definición de la escala; Etapa II: Cálculo del área foliar; y Etapa III: Cálculo del área afectada por roya.

Diseño del experimento y análisis estadístico

Los datos obtenidos de la evaluación visual y digital fueron organizados en una hoja de cálculo de una suite ofimática para computadoras. Los datos de los tres grupos de tamaño de hojas, se ordenaron desde la más pequeña hasta la más grande. Luego del ordenamiento en cada metodología y dentro de cada tamaño se parearon los valores de severidad de 12 hojas para obtener un promedio dejando entre cada hoja seleccionada 10 valores.

Al finalizar las combinaciones se obtuvo 10 promedios para cada tamaño de hoja, es decir, 30 promedios por método para un total de 60 promedios. Sobre los datos obtenidos se aplicó un diseño estadístico en bloques al azar con arreglo factorial 2x3 con 10 repeticiones, donde se estudiaron como factor A: las dos metodologías (visual y digital) y factor B: los tres tamaños de hojas (pequeñas, medianas y grandes). En consecuencia, se conformaron 60 unidades experimentales. Una vez comprobada la normalidad y la homogeneidad de los datos, fueron procesados a través de análisis de varianza (ANAVA) de estructura factorial y se utilizó la prueba de Tukey (α=5%) para la comparación de medias que resultaron significativas. Los procedimientos estadísticos se efectuaron con el software estadístico Infostat Versión 2020 (Di Rienzo et al., 2020).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis de varianza (Cuadro 1) aplicado sobre los porcentajes de severidad de la roya en las hojas de café detectó diferencias altamente significativas ($p \leq 0,01$) entre los métodos utilizados (visual y digital), así como también entre los tamaños de las hojas (pequeñas, medianas y grandes) y en la interacción métodos x tamaño.

CUADRO 1
Análisis de varianza del porcentaje de severidad de las hojas de café cuantificadas por el método visual y el digital en tres tamaños de hojas.

Fuente de variación	Gl	SC	CM	F
Repetición	9	6,530	0,726	1,29ns
Métodos	1	209,880	209,880	373,45**
Tamaños	2	44,350	22,175	39,46**
Interacción Métodos x Tamaño	2	43,490	21,745	38,69**
Tamaño/Método	2	87,840	43,920	78,15**
Tamaño/Visual	1	87,835	87,835	156,29**
Tamaño/Digital	1	0,005	0,005	8,9x10-3ns
Error	40	22,470	0,562	
W (Will-Shapiro)		0,85ns		
P (Bartlett)		0,05		
CV (%)		14,88		

Al realizar la descomposición de la interacción se observó diferencias altamente significativas entre los métodos y los tres tamaños de hojas. El coeficiente de variación fue de 14,88 %. En la Figura 3 se muestran los valores promedios de severidad por método y tamaño de la hoja, apreciándose que para el método digital no existió diferencias estadísticas según la prueba de Tukey (5 %) cuando se pasó de un tamaño de hoja a otro, siendo los valores de severidad 2,77 % para las hojas pequeñas, 2,75 % para las medianas y 2,74 % para las grandes, mientras que en el método visual existieron diferencias al pasar de un tamaño de hoja a otro, siendo la severidad calculada en las hojas pequeñas estadísticamente superior según la prueba de Tukey (5%) a la severidad en las hoja medianas y en las grandes con 8,53; 4,34 y 6,52% respectivamente.

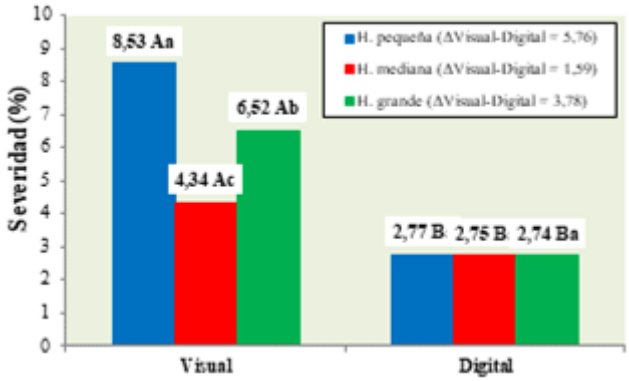

FIGURA 3
Interacción entre métodos de evaluación (Visual y Digital) y tamaños de hojas (pequeña, mediana y grande), sobre el porcentaje de severidad de la roya.
Letras mayúsculas distintas representan diferencia significativa entre métodos de evaluación (A, B); mientras que, letras minúsculas distintas representan diferencia significativa entre tamaños de hojas, dentro del método de evaluación (a, b, c).; Δ: Magnitud del umbral de diferencia entre métodos para cada tipo de hoja (H) muestreada

Se evidencia que la distancia porcentual (umbral) entre el método visual y el método digital es más pequeña cuando se evaluaron hojas medianas (umbral = 1,59 %), en cambio al evaluar hojas pequeñas y grandes el umbral entre los dos métodos aumentó a 5,76 y 3,78 % respectivamente. El comportamiento observado permite inferir que existe influencia del tamaño de la hoja al momento de cuantificar severidad de la enfermedad por el método visual; existe sobreestimación de la afección cuando se evalúan visualmente hojas grandes y aún más con hojas pequeñas, en cambio, al utilizar hojas medianas se obtienen valores más cercanos al método digital. Con el método digital se eliminan factores que perjudican la correcta evaluación

PDF generado a partir de XML-JATS4R

de los daños foliares como el cansancio, intensidad lumínica y la percepción porcentual del evaluador sobre el tamaño de las lesiones.

En un ensayo similar, Olmstead et al. (2001) compararon dos métodos diferentes (visual y computacional) para cuantificar la infección del mildiu en hojas de cerezo dulce, hallaron que la evaluación visual proporcionó estimaciones muy superiores de severidad en comparación con la computacional, de manera similar, Coninck et al. (2012) para determinar la gravedad de la enfermedad de la mancha foliar de Cercospora en remolachas azucareras compararon la exactitud de tres métodos para estimar la severidad de la enfermedad, utilizaron la evaluación visual, reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RCPTR) y procesamiento de imágenes utilizando el programa para computadoras Assess 2.0 de la APS, concluyeron que los métodos de imágenes digitales y el RCPTR tenían el potencial de aumentar la precisión y la sensibilidad de las evaluaciones al reducir el sesgo generado en las evaluaciones visuales. Bock et al. (2010) y Kwack et al. (2005) indican que los evaluadores tienden a sobreestimar si el área foliar afectada es muy grande o muy pequeña, afectando la precisión y exactitud de la estimación, estas observaciones se ratifican en esta investigación al demostrarse que en hojas pequeñas y grandes las lecturas están más alejada del método digital.

Los resultados de esta investigación también coinciden con los reportados por Sherwood et al. (1983) los cuales utilizaron análisis de imágenes para cuantificar la afección de Stagonospora en césped de jardín, estos autores concluyeron que el uso de métodos electrónicos generan resultados más exactos que las estimaciones visuales, debido a la existencia de factores externos como el tamaño de las hojas y de las lesiones, el color de la lesión, la intensidad de luz y la fatiga del evaluador al momento de la evaluación, los cuales, pueden afectar la precisión y exactitud de las evaluaciones visuales. De manera similar, Sauceda-Acosta et al. (2015) utilizaron el programa ImageJ® en la comparación de un método electrónico y un método visual para medir severidad de la roya del trigo (Puccinia triticina Eriksson) en hojas, constató que el método de análisis de imágenes digitales fue más preciso; además, facilitó la repetitividad y redujo la subjetividad en relación al método visual, también agregaron los autores que estos sistemas informáticos son capaz de diferenciar entre las lesiones, el área sana y regiones necróticas causadas por otros factores. Son capaces de medir con precisión el área foliar dañada por patógenos, al mismo tiempo que permite caracterizar el avance de la enfermedad mediante el número, tamaño y forma de las lesiones.

Price et al. (1993) pioneros en el uso de imágenes digitales para la cuantificación de severidad de la roya del café afirmó que el uso de estas metodologías computacionales genera resultados más precisos que las evaluaciones visuales y que los sistemas de imágenes poseen ventajas al proporcionar datos sobre la forma, área y perímetro de las lesiones individuales por la roya. Estos sistemas son útiles en el desarrollo de modelos epidemiológicos para la predicción de reducción en los rendimientos basada en el porcentaje de áreas sanas o enfermas de roya en la hoja del café e inclusive esta metodología podría extrapolarse a otras enfermedades del follaje. De forma similar, Tapia et al. (2014) compararon un método electrónico (programa Image Tool 3.0) y un método visual (escala propuesta por Capucho et al. (2011)) en la cuantificación de la severidad en hojas afectadas por la roya del café y constataron que los sistemas electrónicos permiten evaluar grandes cantidades de hojas de forma sencilla.

CONCLUSIONES

Imágenes digitales procesadas con el software Imagej® ofreció lecturas confiables en los datos de severidad de la roya del cafeto, independientemente del tamaño de la hoja.

El método visual usando la escala diagramática con la inclusión de diferentes tamaños de hojas hace menos confiable la cuantificación de la severidad en hojas pequeñas y grandes.

LITERATURA CITADA

APS (The American Phytopathological Society). 2021. Coffee rust (Hemileia vastatrix). Disponible en línea: http://www.apsnet. org/edcenter/intropp/lessons/fungi/Basidiomycetes/Pages/CoffeeRust.aspx. (Acceso 20.08.2021).

Arneson, P. 2000. Coffee rust. *The American* Phytopathological Society(APS). https://www.apsnet.org/edcenter/disandpath/fungalbasidio/pdlessons/Pages/CoffeeRust.aspx

Bade, C., Carmona, M. 2011. Comparison of methods to assess severity of common rust caused by Puccinia sorghi in maize. Tropical Plant Pathology. 36: 264-266.

Bock, C., Parker, P., Cook, A., Gottwald T. 2008. Visual rating and the use of image analysis for assessing different symptoms of citrus canker on grapefruit leaves. Plant Disease. 92: 530-541.

Bock, C., Parker, P., Gottwald T. 2010. Plant disease severity estimated visually, by digital photography and image analysis, and by hyperspectral imaging. Critical Reviews in *P*lant Sciences 29:59-107.

Capucho, A., Zambolim, L., Duarte, H., Vaz G. 2011. Development and validation of a standard area diagram set to estimate severity of leaf rust in *Coffea arabica* and *C. canephora.* Plant Pathology. 60: 1144-1150.

Castaño-Zapata, J. 2017. Conferencia Magistral: Conceptos básicos de fitoepidemiología. Revista Palmas. Bogotá (Colombia), 38 (4):67–70.

Coninck, B., Amand, O., Delauré, S., Lucas, S., Hias, N., Weyens, G., Mathys, J., De Bruyne, E., Cammue, B. 2012. The use of digital image analysis and real-time PCR fine-tunes bioassays for quantification of *Cercospora* leaf spot disease in sugar beet breeding.Plant Pathol. 61:76-84.

Cowling, E., Horsfall, J. 1978. Monitoring epidemics: host. In: Campbell C, Madden L. (Eds). Introduction to plant disease epidemiology. Wiley-Interscience, Ann Arbor, USA. 552 p.

García, D. 2013. Incidencia y severidad de la roya del café (Hemileia vastatrix) y evaluación de alternativas químicas para su control. Escuintla: Universidad Rafael Landívar, Facultad de Ciencias Ambientales y Agrícolas, Licenciatura en Ciencias Agrícolas con Énfasis en Cultivos Tropicales [Disertación Grado Ingeniero Agrónomo*]*, 61 p.

CLIMATE-DATA.ORG. 2020. Datos climáticos mundiales (en línea). Consultado 10 ene. 2021. Disponible en:https://es.climate-data.org/

Di Rienzo, J., Casanoves, F., Balzarini, M., González, L., Tablada, M., Robledo, C. 2020. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL http://www.infostat.com.ar.

GSV-SINAVEF-LANREF (Dirección General De Sanidad Vegetal – Sistema Nacional De Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria – Laboratorio Nacional De Referencia Epidemiológica Fitosanitaria). 2016. Escalas de severidad de roya del café en hoja y planta. En línea: http://www.cesaveson.com/files/docs/campanas/vigilancia/fichas2016/ROYAcafeto.pdf. (Acceso 04.10.2021).

Guzmán, P., Gómez, G., Rivillas, O., Oliveros, T. 2003. Utilización del procesamiento de imágenes para determinar la severidad de La Mancha de Hierro del Cafeto, en hojas de café. Cenicafe, 54(3):258-265.

James, W. 1971. An illustrated series of assessment keys for plant diseases, their preparation and usage. Canadian Plant Disease Survey. 51:39-65.

Kranz, J. 1988. Measuring plant disease. In: Kranz J, Rotem J (Eds). Experimental Techniques in Plant Disease Epidemiology. Springer, Berlin, Germany, pp. 35-50.

Kushalappa, A., Chaves, G. 1978. Assessment key for percent coffee leaf area rusted. *Fitopatología Brasileira. 3*:119.

Kwack, M., Kim, E., Lee, H., Kim, J., Chun, S., Kim, K. 2005. Digital image analysis to measure lesion area of cucumber anthracnose by *Colletotrichum orbiculare*. Journal of General Plant Pathology. 71:418-421.

Navarro, J., Arauz, L. 1999. Exactitud y repetitividad de dos métodos para la evaluación de la severidad de enfermedades fungosas en el fruto de la papaya (*Carica papaya*). Agronomía Costarricense. 23:89-96.

Olmstead, J., Lang, G., Grove, G. 2001. Assessment of severity of powdery mildew infection of sweet cherry leaves by digital image analysis. Hortscience. 36:107-111.

Patil, S., Bodhe, S. 2011. Leaf disease severity measurement using image processing. International Journal of Engineering and Technology. 3:297-301.

Price, T., Gross, R., Wey, J., Osborne, C. 1993. A comparison of visual and digital image-processing methods in quantifying the severity of coffee leaf rust (*Hemileia vastatrix*). Aust J Exp Agric. 33: 97-101.

Rasband, W. 2017. ImageJ, US National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA. Disponible en: http://rsbweb.nih.gov/ij/. (04.10.2021).

Rathod, A., Tanawal, B., Shah, V. 2013. Image processing techniques for detection of leaf disease. International. Journal of Advanced Research in Computer Science and Software Engineering, 3: 397-399.

Rincón, N., Olarte, M., Pérez J. 2012. Determinación del Área Foliar en Fotografías Tomadas con una Cámara Web, un Teléfono Celular o una Cámara Semiprofesional. Rev. Fac. Nal. Agr. Medellín 65(1):6399-6405.

Rodrigues, A., Gil de Oliveira, E. 2013. Desafios do manejo no controle de doenças do café. Visão Agrícola 12: 51-54. https://www.esalq.usp.br/visaoagricola/sites/default/files/va12-fitossanidade02.pdf.

Sauceda-Acosta, C., Lugo-García, G., Villaseñor-Mir, H., Partida-Ruvalvaba, L., Reyes-Olivas, A. 2015. Un método preciso para medir severidad de roya de la hoja (*Puccinia triticina* Eriksson) en trigo. Rev. Fitotec. Mex. 38(4):427-434.

Sherwood, R., Berg, C., Hoover, M., Zeiders, K. 1983. Illusions in Visual assessment of *Stagonospora* leaf spot of orchardgrass. Phytopathology. 73:173-177.

Silva-Acuña, R., Maffia, L., Zambolim, L., Berger, R. 1999. Incidence-severity relationships in the *Coffea arabica-Hemileia vastatrix*. Plant Disease 83:186-188.

Subero, L. 2005. La roya del café. Disponible en línea: http://www.infocafes.com/descargas/biblioteca/136.pdf. (Acceso 04.10.2021).

Tapia, A., Granado, E., Avelino, J. 2014. Cuantificación de la severidad en hojas afectadas por la roya del de café (*Hemileia vastatrix*) utilizando el software image tool 3.0. Disponible en: https://agritrop.cirad.fr/573986/1/document_573986.pdf. (04.10.2021).

Velázquez, L., Sasaki, Y., Nakano, K., Mejía, J., Romanchik, M. 2011. Detección de cenicilla en rosa usando procesamiento de imágenes por computadora. Revista Chapingo Serie Horticultura. 17:151-160.

Waller, J., Bigger, M., Hillocks, R. 2007. Coffee Pests, Diseases and their Management. CAB International, Wallingford, UK. 434p.

Zambolim, L. 2009. Tecnologias para a produção do Café Conilon. Departamento de Fitopatologia, Viçosa, Brasil, 360 p.