

Extractos acuosos de plantas como inhibidores de la germinación de urediniosporas de *Hemileia vastatrix*; la roya anaranjada del café

José Antonio García-Pérez^{1*} **ID**, Enrique Alarcón-Gutiérrez² **ID**, Vianey del Rocio Torres Pelayo¹ **ID**.

¹ Facultad de Biología, Universidad Veracruzana, Xalapa, Veracruz, México. Circuito Gonzalo Aguirre Beltrán s/n, Zona Universitaria C.P. 91090, Xalapa, Veracruz, México.

² Instituto de Biotecnología y Ecología Aplicada (INBIOTECA), Universidad Veracruzana. Av. De las Culturas Veracruzanos No. 101 Col. Emiliano Zapata C. P. 91090 Xalapa, Veracruz, México.

*Email autor correspondiente: antoniogarcia01@uv.mx; garc95@hotmail.com

Phone: 01(228) 842-17-48, extensión: 11748, 11617, 11618, 11619. Fax: 01(228) 817-92-02

Recibido: 15 febrero 2021. **Aceptado:** 23 marzo 2021

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue probar el efecto inhibitorio de extractos acuosos de tres especies de plantas sobre la germinación de urediniosporas de la roya del café (*Hemileia vastatrix*). Se prepararon extractos acuosos de hojas de *Ardisia compressa* and *Eriobotrya japonica* comunes en cafetales del centro de Veracruz, México, y de hojas de *Ocimum basilicum*, común en los jardines caseros locales. Se realizaron tres ensayos experimentales, uno con el extracto de cada especie vegetal, bajo un diseño completamente al azar con cuatro tratamientos; el control negativo (extracto 0%), el control positivo (fungicida comercial), el extracto al 75% y el extracto al 100%. La variable de respuesta fue la proporción de urediniosporas germinadas y la variable explicativa fue la concentración de extracto. Para los resultados de cada ensayo, se ajustó un Modelo Lineal Generalizado (GLM), con errores binomiales, usando el lenguaje R. Los resultados indicaron que los extractos de las tres especies de plantas inhibieron totalmente la germinación de las urediniosporas a un nivel similar al del fungicida comercial. A pesar de la baja tasa de germinación de urediniosporas en los controles negativos, su tasa de germinación fue estadísticamente más alta ($P < 0.01$) que la de los otros tratamientos. Por lo tanto, se concluye que los extractos de las tres especies vegetales tienen un gran potencial para su uso en el control ecológico de la roya del café. Sin embargo, se necesita escalar los experimentos, tanto a nivel de invernadero como de campo, y probar con surfactantes, coadyuvantes y estabilizadores.

Palabras clave: Extractos acuosos, *Ardisia compressa*, *Eriobotrya japonica*, *Ocimum basilicum*, fitoquímica, roya del café.

ABSTRACT

The aim of this study was to test the inhibitory effect of plant aqueous extracts on the urediniospores germination of the coffee rust (*Hemileia vastatrix*). Aqueous extracts were prepared from leaves of *Ardisia compressa* and *Eriobotrya japonica* which are commons in coffee plantations in central Veracruz, Mexico, and from leaves of *Ocimum basilicum*, which is common in local home gardens. Three experimental trials were carried out, one with the extract of each plant species under a completely randomized design with four treatments; the negative control (extract 0%), the positive control (commercial fungicide), and extracts at 75% and 100%. The response variable was the proportion of germinated urediniospores and the explanatory variable was the extract concentration. A Generalized Linear Model (GLM) with binomial errors was fitted for data of each experiment using the R software. The results indicated that extracts of the three plants species, totally inhibited the germination of urediniospores at a similar level to that of the commercial fungicide. In spite of low germination rate of urediniospores in negative controls, it was statistically higher ($P < 0.01$) than that of the other treatments. Therefore, it is concluded that extracts of three plant species have a great potential to be used in the ecological control of coffee rust. However, experiments need to be scaled up at the greenhouse and field level and testing with surfactants, adjuvants, and stabilizers.

Keywords: Aqueous extracts, *Ardisia compressa*, *Eriobotrya japonica*, *Ocimum basilicum*, phytochemistry, coffee rust.

INTRODUCCIÓN

La roya del café (RC) es causada por el basidiomiceto del orden Pucciniales, *Hemileia vastatrix*, que es un hongo biotrófico obligado que se encuentra en casi todos los países productores de café y ha impactado negativamente la producción de este cultivo desde fines del siglo XIX [1]. La RC se considera la más destructiva de todas las enfermedades foliares de plantas de café en el

mundo [2, 3, 4, 5] y es uno de los principales factores limitantes para el cultivo de la especie de café arábigo (*Coffea arabica*) [6], la cual representa aproximadamente el 70 % de la producción mundial [7]. La RC ha producido pérdidas de entre uno y dos mil millones de dólares estadounidenses al año [1]. La roya se dispersa a través de urediniosporas que infectan a las hojas de la planta de café por aire y por gotas de lluvia; una vez en la hoja, las

urediniosporas germinan y entran por las estomas de las hojas mediante hifas germinativas, iniciando así el proceso de infección [10, 11, 12]. La enfermedad se manifiesta por la aparición de manchas amarillas o de color naranja [8] en las hojas (Fig. 1a) y, en ausencia de un manejo adecuado,

produce hasta un 50% o más de pérdida de hojas (Fig. 1b) lo que puede conducir a la muerte de las plantas de café [9]. El desarrollo de cultivares resistentes a la RC se considera actualmente la estrategia más eficaz para su control, sin embargo, el desarrollo de líneas resistentes requiere entre 25 y 30 años.



Figura 1. Observación de signos y efectos de la roya del café; a) lesiones de color amarillo que manifiestan las pústulas de urediniosporas de *H. vastatrix* en las hojas de las plantas; y b) la defoliación causada en los estados avanzados de la enfermedad. Las imágenes fueron tomadas en el ejido de San Marcos de León, Municipio de Xico, Veracruz, México.

Además, la calidad del café es inferior a los cultivares tradicionales [13]. Otra solución a corto plazo ha sido el uso de fungicidas sintéticos a base de cobre [14]; sin embargo, existe evidencia de que estos fungicidas han ido perdiendo efectividad debido a la adquisición de resistencia por parte del hongo, con el incremento en la frecuencia de las aplicaciones y el consecuente incremento en el riesgo de generar problemas de contaminación y para la salud humana [15, 16]. Una alternativa natural y más amigable ambientalmente para el control de la RC, es el uso de metabolitos secundarios (MS) que se encuentran en las plantas [17], los cuales han mostrado actividad plaguicida [18, 19]. Un grupo de MS importantes son las fitoalexinas que se sintetizan en respuesta a la presencia de un patógeno. Estos son compuestos fenólicos [20] que incluyen terpenos, polifenoles, glucósidos y alcaloides [21, 22], los cuales han mostrado propiedades antimicrobianas, antibacterianas, fungicidas o fungistáticas en una variedad de patógenos [23, 24]. Hay pocos estudios disponibles sobre la efectividad de extractos de plantas para la inhibición de la germinación de urediniosporas de *H. vastatrix* (roya), pero estudios con otras especies de roya indican el potencial que podrían tener en el caso de la roya del café. Por ejemplo, fue posible reducir la incidencia de la roya de la morera (*Cerotelium fici*), entre un 33

y un 73% utilizando extractos acuosos de neem (*Azadirachta indica*), papaya (*Carica papaya*), albahaca morada (*Oscimum sanctum*), chancapiedra (*Phyllanthus niruri*) y el árbol casto (*Vitax nigundo*) [25]. Los extractos acuosos de rizoma de jengibre (*Zingiber officinal*), bulbo de cebolla (*Allium cepa*) y bulbo de ajo (*Allium sativum*) redujeron la incidencia de roya del trigo (*Puccinia recondita f.sp. tritici*) entre un 55 y un 60%. Asimismo, fue posible inhibir en más del 93%, la germinación de las urediniosporas de la roya del trigo (*Puccinia triticina*) utilizando extractos acuosos de ajo, clavo, quinina de jardín, pimienta brasileña, anthi mandhaari, comino negro, cedro blanco y neem [26]. Similarmente, el licor de roble tuvo una eficiencia del 74,4% para abortar las pústulas de la roya de la Perilla (*Perilla frutescens*) [27]. En cuanto a los escasos estudios con la roya del café, Salustiano *et al.* [28] lograron la inhibición total de la germinación de urediniosporas de *Hemileia vastatrix* mediante el uso de extractos acuosos y metanólicos de hojas de lámpara (*Eremanthus erythropappus*). Subramani *et al.* [19] obtuvieron una inhibición de entre el 51 y el 74% de la roya del café utilizando extractos acuosos de hojas frescas de vasaka (*Adhatoda vasica*), neem, cinco negritos (*Lantana camara*) e higuierilla (*Ricinus communis*). Con estos mismos extractos, los autores también

alcanzaron a reducir en el campo, entre un 20 y un 35%, la incidencia de la roya del café. Finalmente, Mudyiwa *et al.* [29] mostraron que los extractos acuosos de moringa (*Moringa oleifera*) y zacate limón (*Cymbopogon citratus*) fueron efectivos en el control de la germinación de las urediniosporas de la roya del café. Esta investigación, tuvo como objetivo probar la capacidad de extractos acuosos de hojas de níspero (*Eriobotrya japonica*), capulín (*Ardisia compressa*) y albahaca (*Ocimum basilicum*), para inhibir la germinación de urediniosporas de la roya del café.

METODOLOGÍA

Colecta de material vegetal

El material vegetal para la elaboración de los extractos fue recolectado en cafetales de sombra del ejido de San Marcos de León, Veracruz, México (Longitud: -96.963611, Latitud: 19.422778). Las características de las plantas elegidas fueron: hojas cerosas gruesas, sin daño visible por hongos o herbívoros, bajo el supuesto de que sería indicativo de la presencia de sustancias antifúngicas o antibióticas. Se recolectaron cerca de 800 g de hojas de *Ardisia compressa*, *Eriobotrya japonica* y *Ocimum basilicum* y se trasladaron al laboratorio en bolsas de papel. El material vegetal de cada especie se limpió con una solución de hipoclorito de sodio (Cloralex™)

(10%), se enjuagó con agua destilada y se secó durante 24 h a 60 °C. Luego, el material seco se molió y se pasó a través de un tamiz de luz de malla 0.5 mm y se almacenó en frascos de color ámbar. Este material se mantuvo almacenado a temperatura ambiente en un lugar seco hasta su uso en los ensayos.

Extractos acuosos

Los extractos acuosos de las tres especies se obtuvieron según Kobayashi y González de Mejía [30]. Doscientos mililitros de agua destilada se llevaron a punto de ebullición y se dejaron evaporar hasta reducir a 175 ml. Luego, se agregaron 12.5 g de material vegetal seco y la infusión se mantuvo en punto de ebullición durante 10 segundos y posteriormente se mantuvo en reposo durante 60 segundos. El líquido resultante se centrifugó a 5000 rpm durante 15 minutos para decantar los sólidos o residuos remanentes. La infusión se filtró dos veces utilizando papel filtro Whatman de 0.8 mm y 2 µm, respectivamente. El extracto así obtenido se almacenó en refrigeración (4 °C), se protegió de la luz hasta su uso y análisis, y se consideró la base de 100% en concentración para elaborar el tratamiento al 75% de concentración.

Caracterización fitoquímica cualitativa

La determinación de la presencia de alcaloides, flavonoides, terpenos y saponinas, se hizo por

triplicado mediante el uso de las técnicas colorimétricas propuestas por Domínguez [31]. Los alcaloides se determinaron mediante las técnicas de Mayer, Dragendorff y Wagner, los flavonoides con las pruebas de Shinoda, Cloruro Férrico (FeCl₃) y Ácido Sulfúrico (H₂SO₄), los terpenos se determinaron mediante la prueba de Liebermann-Burchard, mientras que las cumarinas se detectaron con las pruebas de KOH y rayos UV. Finalmente, la presencia de saponinas se determinó mediante la prueba de la espuma y con el reactivo de Rosenthaler.

Colecta de urediniosporas de *Hemileia vastatrix*

Las urediniosporas de roya para los ensayos, se recolectaron de plantas de *Coffea arabica* variedad típica. Las urediniosporas presentes en las manchas color naranja de las hojas de café se barrieron con un pincel y se depositaron en un microtubo. Los ensayos con cada extracto de planta no se llevaron a cabo simultáneamente, por lo que se utilizó un lote de urediniosporas recién recolectadas en cada ocasión para evitar problemas con el almacenamiento y la viabilidad de las mismas.

Ensayos de inhibición de germinación de urediniosporas

Se realizó un ensayo experimental de inhibición de germinación de urediniosporas con el extracto acuoso de cada especie vegetal. Se

probaron tres concentraciones de extracto de cada especie: 0.0%, 75% y 100%, más un control positivo que contenía fungicida comercial (oxicloruro de cobre 50% polvo mojable) con base en la dosis recomendada (3.7 g/L). Los extractos acuosos se diluyeron con agua destilada y esterilizada para la conformación del tratamiento al 75%. Aproximadamente 1.5 ml de agua destilada, extracto puro o extracto diluido, y agua destilada más fungicida comercial, se depositaron en microtubos (2 ml) a los cuales se les añadieron, aproximadamente, 0.04 g de urediniosporas recién colectadas de roya del café. La cantidad de urediniosporas en peso se determinó mediante pruebas repetidas, hasta que alícuotas tomadas de la dilución de urediniosporas en 1.5 ml resultaron en la cuantificación efectiva y en la visibilidad clara de los tubos de germinación en cámaras de Neubauer. Cada tratamiento consistió, para el caso del ensayo con *Ardisia compressa*, de ocho réplicas, y para *Eriobotrya japonica* y *Ocimum basilicum*, cuatro réplicas respectivamente. La diferencia en el número de réplicas se debió a la disponibilidad de las urediniosporas en ese momento. Los microtubos de cada ensayo se colocaron en gradillas y se incubaron durante 24 horas a 24 °C en condiciones de oscuridad total [32, 33].

Conteo de urediniosporas

Después de 24 h, las urediniosporas germinadas y no germinadas se contaron auxiliados de un hemocitómetro (cámara de Neubauer, Thermo Fisher). Para ello, se tomaron muestras y se procesaron tres alícuotas de cada réplica. Dentro del hemocitómetro, se contaron las urediniosporas germinadas y no germinadas que cayeron dentro del área de los cinco cuadrados. Las urediniosporas se consideraron como germinadas cuando se observó claramente, bajo el microscopio a 40X, el desarrollo de uno o más tubos de germinación (Fig. 2) y se consideraron como no germinadas cuando los tubos de germinación no fueron observados.

Análisis de datos

Los datos de cada ensayo se analizaron mediante un Modelo Lineal Generalizado (GLM) con errores binomiales [34] para determinar los efectos significativos de los tratamientos. Los análisis se realizaron con el software R [35]. La siguiente relación se utilizó para obtener la devianza explicada (D^2) por cada uno de los modelos ajustados.

$$D^2 = \frac{\text{Devianza nula} - \text{devianza residual}}{\text{Devianza nula}} * 100 \quad [36]$$



Figura 2. Aspectos del desarrollo de tubos germinativos en urediniosporas del hongo *H. vastatrix* a 40X.

RESULTADOS

Caracterización fitoquímica de los extractos acuosos

Para el extracto de hojas de *A. compressa* se detectó una presencia alta de alcaloides y flavonoides (Cuadro 1) por medio de las técnicas de Dragendorff y Cloruro Férrico (FeCl_3) respectivamente. Las cumarinas se registraron débilmente y no se detectaron saponinas ni terpenos. En cambio, para el extracto de *E. japonica*, se evidenció una presencia fuerte de alcaloides y cumarinas, mientras que la presencia de flavonoides fue

débil y no se detectaron terpenos ni saponinas. Finalmente, para el extracto de *O. basilicum* se detectó una presencia fuerte de alcaloides, flavonoides y terpenos, mientras que la presencia de cumarinas fue moderada y no se detectaron saponinas.

Germinación de urediniosporas

Todos los ensayos con extractos acuosos de hojas de las tres especies vegetales mostraron un efecto inhibitor sobre la germinación de urediniosporas de la roya del caféto *Hemileia vastatrix*. La proporción promedio de urediniosporas germinadas en el control negativo (agua destilada) fue baja para los ensayos de las tres especies; es decir, 27.8 ± 4.5 para *E. japonica* (Fig. 3a); 13.029 ± 3.59 para *A. compressa* (Fig. 3b); y 4.43 ± 0.35 para *O. basilicum* (Fig. 3c). Sin embargo, la proporción de urediniosporas germinadas en este tratamiento (i.e., control negativo), fue la más alta estadísticamente en todos los ensayos (Fig. 4). Los modelos ajustados predijeron una alta proporción de urediniosporas germinadas en cada ensayo; 96.75% para *E. japonica* (Fig. 4a), 83.11% para *A. compressa* (Fig. 4b) y 85.01% para *O. basilicum* (Fig. 4c). (Figs. 4a, 4b y 4c respectivamente).

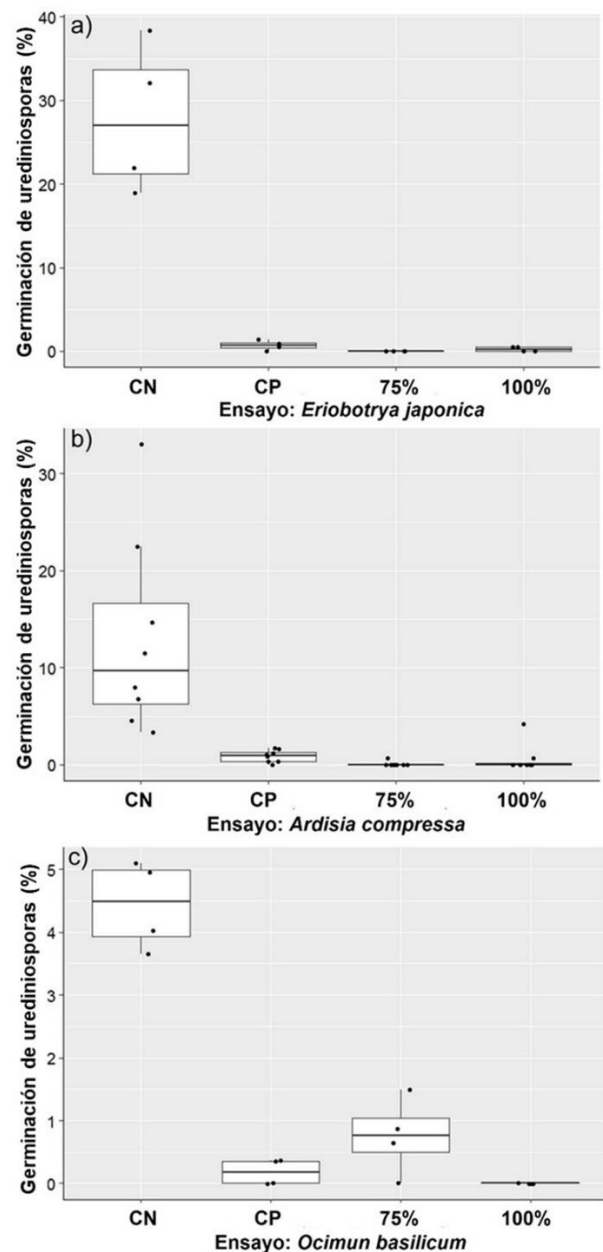


Figura 3. Efectos observados de extractos acuosos de hojas de: a) *E. japonica*, b) *A. compressa*, y c) *O. basilicum* sobre la germinación de urediniosporas de roya del caféto *H. vastatrix*. CN and CP representan el control negativo (agua), y el control positivo (fungicida comercial), respectivamente. Los datos son la mediana, el primer y tercer cuartil, más la dispersión.

Cuadro 1. Análisis fitoquímico cualitativo de extractos acuosos de hojas de *A. compressa*, *E. japonica* and *O. basilicum*.

Especie									
Componente	<i>A. compressa</i>			<i>E. japonica</i>			<i>O. basilicum</i>		
	Método			Método			Método		
	Mayer	Wagner	Dragendorff	Mayer	Wagner	Dragendorff	Mayer	Wagner	Dragendorff
Alcaloides	++	-	+++	+	+	+++	+	++	+++
	Método			Método			Método		
	Shinoda	FeCl ₃	H ₂ SO ₄	Shinoda	FeCl ₃	H ₂ SO ₄	Shinoda	FeCl ₃	H ₂ SO ₄
Flavonoides	+	+++	+	-	+	+	-	+++	++
Cumarinas		+			+++			++	
Terpenos		-			-			+++	
Saponinas		-			-			-	

(+) Presencia escasa, (++) Presencia relativamente abundante, (+++) Presencia abundante, (-) No detectado

DISCUSIÓN

El presente estudio tuvo como objetivo principal evaluar la efectividad de tres extractos acuosos de hojas de *Eriobotrya japonica*, *Ardisia compressa*, y *Ocimum basilicum*, plantas provenientes de cafetales del centro de Veracruz, para la inhibición de la germinación de urediniosporas de la roya del café *Hemileia vastatrix*. Los resultados más importantes indicaron que los extractos acuosos de *Eriobotrya japonica*, *Ardisia compressa* y *Ocimum basilicum* redujeron la germinación de urediniosporas de *Hemileia vastatrix* a sólo 0.12, 0.34 y 0.38 % respectivamente, en promedio. Todos estos efectos fueron estadísticamente significativos ($P < 0.001$) con respecto al tratamiento control de cada especie. Hay pocos estudios disponibles para la

comparación de los resultados sobre la inhibición de urediniosporas de *H. vastatrix* utilizando extractos acuosos de plantas. Sin embargo, Salustiano *et al.* [28], obtuvieron un 100% de inhibición en la germinación de urediniosporas de varias especies de roya (incluyendo urediniosporas de *Hemileia vastatrix*), utilizando extractos acuosos y metanólicos de hojas de *Eremanthus erythropappus*. Del mismo modo, Mudyiwa *et al.* [29], lograron reducir entre 84 y 100 % la germinación de urediniosporas de *H. vastatrix* utilizando extractos acuosos de hojas del “limoncillo”, *Cymbopogon citratus*, (a concentraciones de 25%, 50%) y de hojas de *Moringa oleifera* (a 50 y 100% de concentración).

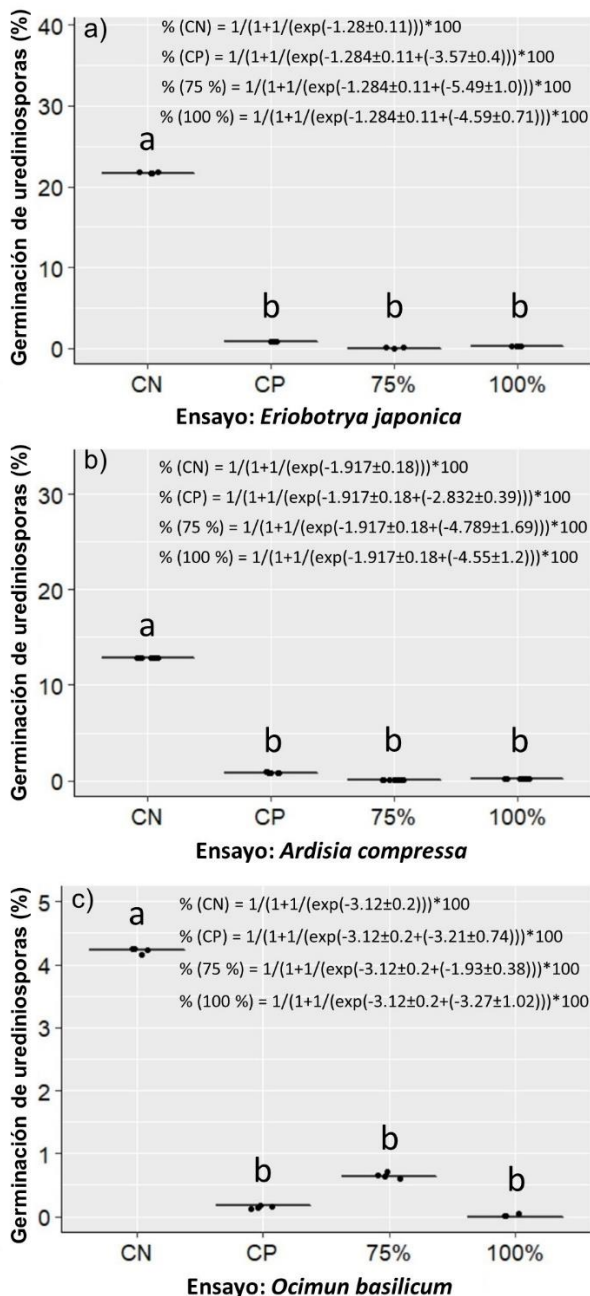


Figura 4. Modelos y predicciones del efecto de los tratamientos de extractos acuosos de hojas de: a) *E. japonica*, b) *A. compressa*, y c) *O. basilicum* sobre la germinación promedio de urediniosporas de roya del café *H. vastatrix*. CN and CP representan el control negativo (agua), y el control positivo (fungicida comercial), respectivamente. Letras diferentes indican diferencias significativas a $P < 0.001$.

La germinación de urediniosporas de otras especies de roya también ha sido inhibida con éxito por extractos acuosos de plantas, tal es el caso de las urediniosporas de la roya del trigo, *Puccinia triticina*, que fueron inhibidas por extractos acuosos de *Jacaranda mimosifolia* (Bignoniaceae), *Thevetia peruviana* (Apocynaceae) y *Calotropis procera* (Apocynaceae) en una proporción del 97%, 78% y 53% respectivamente [37]. En otro estudio, una concentración de 50 µg/ml de licor de roble piroligno, cuyo principal componente es un antimicrobiano (o-metoxifenol o guayacol), fue suficiente para lograr un 74% de aborto de las pústulas de la roya de la Perilla (*Perilla frutescens*, Lamiaceae) [27]. En otros estudios utilizando extractos vegetales contra otro tipo de hongos distintos de las royas, (*Mycosphaerella fijensis* Morelet) se ha logrado una actividad inhibidora en la reproducción del hongo, y esto se ha atribuido a la presencia de alcaloides, esteroides, fenoles, flavonoides y de saponinas [38]. En nuestro estudio, el análisis fitoquímico cualitativo indicó la presencia de alcaloides, flavonoides y cumarinas en las tres especies, mientras que sólo se registraron terpenos en *Ocimum basilicum*. Las saponinas no se registraron en ninguna especie. En otros estudios fitoquímicos más precisos que el nuestro, se han reportado una variedad de sustancias en las tres especies estudiadas. Por

ejemplo, para *A. compressa*, se ha reportado la presencia de polifenoles, ácido gálico, péptidos, saponinas, isocumarinas, quinonas, alquifenoles, bergenina, ardisina y derivados de bencenina, embelina, quercetina, ardisenona, ardisiaquinona, ardisianona y norbergenina ([30, 39], y se ha señalado que aunque algunos de estos componentes se encuentran en otras plantas, la combinación única de varios compuestos en esta especie, es lo que produce una fuente tan novedosa de agentes fitoquímicos [30] en otras especies del género *Ardisia* (e.g., *A. crispa*, Thunb) [40]. Asimismo, se ha determinado que las hojas de *Eriobotrya japonica* Lindl., son una fuente de activos fenólicos, siendo las hojas jóvenes las que contienen mayor cantidad de fenoles totales [41]. Otros compuestos fitoquímicos que se han encontrado en las hojas de esta especie son terpenos, triterpenos, sesquiterpenos, flavonoides, taninos y glucósidos [42, 43, 44, 45, 46] y se ha determinado una actividad antimicrobiana y antifúngica para algunos de ellos [43]. Finalmente, para *Ocimum basilicum*, L., Lamiaceae, especie de gran uso tradicional, se han encontrado más de 200 compuestos químicos. En esta especie se han encontrado compuestos tales como polifenoles, alcaloides, taninos, hidrocarburos monoterpénicos, mono terpenos oxigenados, hidrocarburos sesquiterpénicos, sesqui terpenos oxigenados,

tri terpenos, flavonoides, cumarinas, glucósidos de saponina, esteroides, compuestos aromáticos y ácido ascórbico; y para algunos de ellos se les han determinado propiedades antibacterianas, anti fúngicas, antivirales, antisépticas e insecticidas [47, 48, 49].

CONCLUSIÓN

Los extractos acuosos de hojas de las tres especies redujeron la germinación de urediniosporas de *Hemileia vastatrix* a valores que variaron de 0.12 a 0.38 %, lo cual indica prácticamente una inhibición total. Por tanto, los extractos acuosos de estas especies representarían una alternativa para el control de la roya, sin embargo, son necesarios más estudios para el escalamiento en experimentos de invernadero y de campo. Además, para el escalamiento será importante la experimentación con surfactantes y coadyuvantes agregados a los extractos para su mejor dispersión, mojamiento, humectación, penetrabilidad, adherencia y estabilidad del extracto.

CONFLICTO DE INTERÉS

Los autores declaran que no tienen intereses económicos en competencia, o relaciones personales, que pudieran haber influido en el trabajo informado en este documento.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos el apoyo técnico de la bióloga Patricia del Carmen Gómez en la preparación de los materiales y extractos para los ensayos experimentales y en la revisión de los mismos. Asimismo, se agradece la participación del biólogo Luis Salvador Aragón Hernández García en la colecta, secado, molido y tamizado del material biológico, en los análisis fitoquímicos y en la revisión de los ensayos experimentales. Finalmente, también agradecemos a la bióloga Vanessa Alarcón Córdova por su apoyo en los análisis fitoquímicos.

REFERENCIAS

- [1]. McCook S. Global rust belt: *Hemileia vastatrix* and the ecological integration of world coffee production since 1850. *J. Global Hist.* 2006; 1: 177–195.
- [2]. Schieber E. Economic impact of coffee rust in Latin America. *Annual Review of Phytopathology* 1972; 10: 491-510. doi.org/10.1146/annurev.py.10.090172.00242.
- [3]. Luaces O., Rodrigues LHA, Alves Meira CA, Quevedo JR., Bahamonde A. Viability of an alarm predictor for coffee rust disease using interval regression. En: García-Pedrajas N., Herrera F., Fyfe C., Benítez JM, Ali M. (eds) *Trends in Applied Intelligent Systems*. IEA / AIE 2010. Lecture Notes in Computer Science, vol 6097. Springer, Berlín, Heidelberg 2010. https://doi.org/10.1007/978-3-642-13025-0_36.
- [4]. Ghini R., Bettiol W. & Hamada E. Diseases in tropical and plantation crops as affected by climate change: Current knowledge and perspectives. *Plant Pathology* 2011; 60: 122–132.
- [5]. Cressey D. Coffee rust regains foothold. *Nature* 2013; 493: 587.
- [6]. Suresh N., Santa, R. A., & Shivanna, M. B. Coffee leaf rust (CLR) and disease triangle: A case study. *International Journal of Food, Agriculture and Veterinary Sciences* 2012; 2(2): 50–55.
- [7]. Ganesh D., Petitot, A.-S., Silva, M.C., Alary, R., Lecouls, A.-C., Fernandez, D. Monitoring of the early molecular resistance responses of coffee (*Coffea arabica* L.) to the rust fungus (*Hemileia vastatrix*) using real-time quantitative RT-PCR, *Plant Science* 2006; 170(6): 1045-1051.
- [8]. Brown J.K.M., & Hovmøller M.S. Aerial dispersal of pathogens on the global and continental scales and its impact on plant disease. *Science* 2002; 297: 537–541.
- [9]. Avelino, J., Willocquet, L., & Savary, S. Effects of crop management patterns on coffee rust epidemics. *Plant Pathology* 2004; 53(5):

541–547.

[10]. De Bary H.A. Recherches sur le development de quelques champignons parasites. Ann Sci Nat. Part. Bot 1863; 20:5–148.

[11]. Unger F. Die Exantheme der Pflanzen und einige mit diesen verwandten Krankheiten dieser Gewächse, pathogenetisch und nosographisch dargestellt. Viena: C. Gerold 1833.

[12]. Voegelé R.T., Hahn M., Mendgen K. The uredinales: cytology, biochemistry, and molecular biology. In: Deising H.B. (eds) Plant relationships. The mycota (A Comprehensive treatise on fungi as experimental systems for basic and applied research), vol 5. Springer; 2009; 69-98. https://doi.org/10.1007/978-3-540-87407-2_4.

[13]. Anacafé. Guía de variedades de café de Guatemala. 2nda ed. Anacafé: Guatemala 2019.

[14]. Talhinhos P., Batista D., Diniz I., Vieira A., Silva D.N., Loureiro A., Silva M. do C. The coffee leaf rust pathogen *Hemileia vastatrix*: one and a half centuries around the tropics: Coffee leaf rust caused by *Hemileia vastatrix*. Molecular Plant Pathology 2017; 18(8): 1039-1051. <https://doi.org/10.1111/mpp.12512>.

[15]. Barquero M, M. Recomendaciones para el combate de la roya del cafeto (*Hemileia vastatrix* Brk et Br.). ICAFE: San José Costa

Rica 2013.

[16]. Moo-Koh F., Alejo J., Reyes A., Tun J., Sandoval R. y Ramírez A. Actividad *in vitro* del extracto acuoso del *Bonellia flammaea* contra hongos fitopatógenos. Agrociencia 2014; 48: 833-845. Recuperado de: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-31952014000800006.

[17]. Thakur M., Bhattacharya S., Khosla P. K., Puri S. Improving production of plant secondary metabolites through biotic and abiotic elicitation. Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants 2019; 12: 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2018.11.004>.

[18]. Pérez, M. (2016). Roya causa a cafecultores pérdidas por más de 200 millones de dólares. La Jornada. Recuperado de: <http://www.jornada.unam.mx/2016/06/24/sociedad/039n1soc>. Accessed on: February 11, 2021.

[19]. Subramani D., Rajanaika, Chinnaswamy K.K.K., Singh. S., Kumar, P.K.V., Bhat S.S., y Jayarama. Comparative efficacy of plant products on the spore germination and disease incidence of coffee leaf rust pathogen. Acta Biológica Indica 2012; 1(1): 69-75.

[20]. Moreno-Limón S., González-Solís L.N., Salcedo-Martínez S.M., Cárdenas-Avila M.L. y Perales-Ramírez A. Efecto antifúngico de

extractos de gobernadora (*Larrea tridentata* L.) sobre la inhibición *in vitro* de *Aspergillus flavus* y *Penicillium* sp. Polibotánica 2011; 32: 193-205.

[21]. Azcon J y Talon M. Fundamentos de fisiología vegetal. McGraw-Hills/Interamericano: Madrid, España 2000.

[22]. Halama P. & Haluwin V.Ch. Antifungal activity of lichen extracts and lichenic acids. BioControl 2004; 49: 95-107. <https://doi.org/10.1023/B:BICO.0000009378.31023.ba>.

[23]. Ćirić A., Karioti A., Glamočlija J., Soković M. and Skaltsa H. Antimicrobial activity of secondary metabolites isolated from *Centaurea spruneri* Boiss. & Heldr. J. Serb. Chem. Soc 2011; 76 (1): 27–34.

[24]. Guerriero G., Berni R., Muñoz-Sanchez J. A., Apone F., Abdel-Salam E. M., Qahtan A.A., Alatar A.A., Cantini C., Cai G., Hausman J.F., Siddiqui K.S., Hernández-Sotomayor S.M.T. and Faisal M. Production of Plant Secondary Metabolites: Examples, Tips and Suggestions for Biotechnologists. Genes 2018; 9(6): 309; <https://doi.org/10.3390/genes9060309>.

[25]. Chandrashekara K. T., Prakash B. M., Mahesha K. S., & Rajashekar N. Antifungal activity of plant extracts against leaf rust disease of mulberry, Journal of Sericulture & Technology 2012; 3(1): 60-63.

[26]. Shabana Y. M., Abdalla M. E., Shahin A. A., El-Sawy M. M., Draz I. S., & Youssif A. W. Efficacy of plant extracts in controlling wheat leaf rust disease caused by *Puccinia triticina*. Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences 2017; 4(1): 67-73. <https://doi.org/10.1016/j.ejbas.2016.09.002>.

[27]. Chauhan K.A., Kang C.S. In vivo control of perilla rust disease by oak pyroligneous liquor. Journal of Agricultural Chemistry and Environment 2013; 2(4): 86-89. <http://dx.doi.org/10.4236/jacen.2013.24013>.

[28]. Salustiano M. E., Ferraz F.A., Ampélio P.E., Antônio de Castro H. Extratos de candeia (*Eremanthus erythropappus* (dc.) macleish) na inibição *in vitro* de *Cylindrocladium scoparium* e de quatro espécies de ferrugens. CERNE 2006; 12(2): 189-193.

[29]. Mudyiwa R., Mwatsiya N., Manenji B., Chidoko P., & Mahoya C. Evaluation of Different Botanicals for the Control of Coffee Leaf Rust (*Hemileia vastatrix* Berkeley and Broome). International Journal of Plant & Soil Science 2017; 14(6): 1-8. <https://doi.org/10.9734/IJPSS/2017/28252>.

[30] Kobayashi H., y de Mejía E. The genus *Ardisia*: a novel source of health-promoting compounds and phytopharmaceuticals. Journal of Ethnopharmacology 2005; 96(3): 347-354. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.09.037>.

- [31]. Domínguez X. A. Métodos de investigación fotoquímica. Limusa: México 1973.
- [32]. Rayner R.W. Germination and penetration studies on coffee rust (*Hemileia vastatrix* B. & Br.). *Annals of Applied Biology* 2008; 49(3): 497-505.
- [33]. Talhinhos, P., Batista D., Diniz I., Vieira A., Silva, D.N., Loureiro A., Tavares S., Pereira A.P., Azinheira H.G., Guerra-Guimaraes R., Várzea V., and Silva D.C. The coffee leaf rust pathogen *Hemileia vastatrix*: one and a half centuries around the tropics. *Molecular Plant Pathology* 2016; 18(8): 1-13.
- [34]. Crawley J.M. *The R Book*, chapter 13: Generalized linear models (p. 511). Jhon Wiley & Sons Ltd: England 2007.
- [35]. R Core Team. *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria 2018. URL <https://www.R-project.org/>.
- [36] Zuur A.F., Ieno E.N., Walker N.J., Saveliev A.A. and Smith G.M. *Mixed Effects Models and Extensions in Ecology with R*. 1st ed. Springer: New York 2009.
- [37]. Naz R., Bano A., Wilson N.L., Guest D., and Roberts T. H. Pathogenesis-related protein expression in the apoplast of wheat leaves protected against leaf rust following application of plant extracts. *Phytopathology* 2014; 104: 933-944.
- [38]. Ospina J. Determinación de la actividad antifúngica in vitro de extractos vegetales sobre el hongo *Mycosphaerella fijensis* Morelet. Tesis de Licenciatura, Universidad Tecnológica de Pereira, Pereira-Risaralda, 2007.
- [39]. Newell A.M.B., Yousef G.G., Lila M. A., Ramírez-Mares M. V., y González de Mejía E. Comparative *in vitro* bioactivities of tea extracts from six species of *Ardisia* and their effect on growth inhibition of HepG2 cells. *Journal of Ethnopharmacology* 2010; 130(3): 536-544. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.05.051>.
- [40]. Somchit M.N., Adam Y., Yee H.C., Zuraini A., Arifah A.K. & Zakaria Z.A. Anti-fungal activity of *Ardisia crispa* (Thunb.) A. DC. against several fungi responsible for athlete's foot. *African Journal of Microbiology Research* 2011; 5(15): 2008-2010. <https://doi.org/10.5897/AJMR10.454>.
- [41]. Ahumada J., Fuentealba C., Olaeta J.A., Undurraga P., Pedreschi R., Shetty, K., Chirinos R., Campos D., Ranilla L.G. Bioactive compounds of loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.) cv. Golden Nugget and analysis of the *in vitro* functionality for hyperglycemia management. *Ciencia e Investigación Agraria* 2017); 44(3): 271-283. <https://doi.org/10.7764/rcia.v44i3.1816>.

- [42]. Chen, J., & Li, W. Progress in Studies on Phytochemistry and Biological Activity of *Folium Eriobotryae*. Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology 2008; 2(1): 18-23.
- [43]. Rashed K.N., Butnariu M., 2014. Isolation and Antimicrobial and Antioxidant Evaluation of Bio-Active Compounds from *Eriobotrya Japonica* Stems. Advanced Pharmaceutical Bulletin 2014; 4(1): 75-81. doi: <http://dx.doi.org/10.5681/apb.2014.012>.
- [44]. Ramírez-Gómez X. S., Monroy-Torres R. and Linares-Segovia B. Anti-inflammatory and Antitumor Properties of *Eriobotrya Japonica* Lindl: Mini-Review. Immun., Endoc. & Metab. Agents in Med. Chem. 2014; 14: 15-20.
- [45]. Liu Y., Zhang W., Xu C., & Li X. Biological Activities of Extracts from Loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.): A Review. International Journal of Molecular Sciences 2016; 17: 1-15. <https://doi.org/10.3390/ijms17121983>.
- [46]. Uto T., Hu Tung N., Nakajima, K., Ohta T., Oiso S., Kariyazono H., & Shoyama Y. Bioactivities of *Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl. Leaf and Its Triterpenes. J Pharmacogn Nat Prod 2017; 3: 134. doi:10.4172/2472-0992.1000134.
- [47]. Marwat S.K., Rehman F.U., Shoaib K.M., Ghulam S., Anwar N., Mustafa G. and Usman K. Phytochemical constituents and pharmacological activities of sweet basil *Ocimum basilicum* L. (Lamiaceae). Asian Journal of Chemistry 2011; 23(9): 3773-3782.
- [48]. Bariyah K.-ul., Ahmed D., and Ikram M. *Ocimum basilicum*: A Review on Phytochemical and Pharmacological Studies. Pak. J. Chem 2012; 2(2):78-85.
- [49]. Rojas M.M., Sánchez Y., Abreu Y., Espinosa I., Correa T. M., & Pino O. Caracterización química y actividad antibacteriana de aceites esenciales de *Ocimum basilicum* L. y *Ocimum basilicum* var. *genovese* L. Protección Veg. 2012; 27(2): 130-134.