

# ***In vitro* and *in vivo* antifungal activity of *Azadirachta indica* and *Piper auritum* extracts against uredospore germination of *Hemileia vastatrix***

## **Actividad antifúngica *in vitro* e *in vivo* de extractos de *Azadirachta indica* y *Piper auritum* contra la germinación de uredosporas de *Hemileia vastatrix***

Ricardo Aguirre-Vega<sup>1</sup>, Gerardo Alvarado-Castillo<sup>2</sup>, María del Carmen Ramírez-Benítez<sup>1</sup>, José Antonio García-Pérez<sup>1</sup>, María de Jesús Hernández-Martínez<sup>2</sup>, Vianey del Rocio Torres-Pelayo<sup>1\*</sup>, <sup>1</sup>Facultad de Biología, <sup>2</sup>Facultad de Ciencias Agrícolas. Universidad Veracruzana, Circuito Gonzalo Aguirre Beltrán s/n, Zona Universitaria, C. P. 91090, Xalapa, Veracruz, México; Enrique Alarcón-Gutiérrez, Instituto de Biotecnología y Ecología Aplicada (INBIOTECA), Universidad Veracruzana. Av. de las Culturas Veracruzanas No. 101 Col. Emiliano Zapata C. P. 91090 Xalapa, Veracruz, México.

\* Corresponding author: vitorres@uv.mx

Received: May 04, 2022.

Accepted: August 09, 2022.

Aguirre-Vega R, Alvarado-Castillo G, Ramírez-Benítez M del C, García-Pérez JA, Hernández-Martínez M de J Torres-Pelayo V del R and Alarcón-Gutiérrez E. 2022. *In vitro* and *in vivo* antifungal activity of *Azadirachta indica* and *Piper auritum* extracts against uredospore germination of *Hemileia vastatrix*. Mexican Journal of Phytopathology 40(3).

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2205-1>

First DOI publication: August 29, 2022.

Primera publicación DOI: 29 de Agosto, 2022.

**Abstract.** Coffee (*Coffea arabica*) production is one of the most economically important industrial activities in México. However, coffee production faces phytosanitary problems in the form of coffee rust (*Hemileia vastatrix*). The main goal

**Resumen.** El café (*Coffea arabica*) es uno de los cultivos industriales y económicos importantes en México; sin embargo, se ha enfrentado a problemas fitosanitarios por *Hemileia vastatrix*. En la actualidad existen alternativas biotecnológicas como lo es el desarrollo de biofungicidas. El objetivo principal fue evaluar la actividad biofungicida de extractos foliares de *Piper auritum* y *Azadirachta indica* sobre *Hemileia vastatrix* a través de ensayos *in vitro* e *in vivo*. En el ensayo *in vitro*, se aplicaron extractos etanólicos y apolares de *A. indica* y *P. auritum* a concentraciones de 1000, 3000 y 5000 ppm sobre *H. vastatrix*; mientras que en el ensayo *in vivo*, se aplicaron los extractos etanólicos en las hojas de café *Typica* enfermas con *H. vastatrix*. En el ensayo *in vitro*, los extractos de *A. indica* y *P. auritum* inhibieron la germinación de *H. vastatrix* en un 99%. Asimismo, la aplicación del extracto

of the present study was to evaluate extracts from *Azadirachta indica* and *Piper auritum* as potential biofungicides. In *in vitro* assays, ethanolic and non-polar foliar extracts from *A. indica* and *P. auritum* were applied in three concentrations 1000, 3000, and 5000 ppm, against *H. vastatrix*. While in the *in vivo* assay, only ethanolic extracts were applied to coffee plants Typica diseased with *H. vastatrix*. Both extracts inhibited about 99% of the germination of *H. vastatrix* uredospores *in vitro*. On coffee plants of “Typica” variety infected with *H. vastatrix* that were treated with the ethanolic extracts from *P. auritum* and *A. indica*, no disease appeared during the 20 days of treatment. The inhibitory effect was not significantly similar in those treated with copper oxychloride on days 15 and 20 (Tukey  $P \leq 0.05$ ). We suggest that the evaluated plant extracts are used as a natural alternative for the preventive control of *H. vastatrix* in small greenhouses.

**Keywords:** vegetable extracts, Biofungicide, Coffee rust.

In Mexico, the cultivation of coffee (*Coffea arabica*) is an activity with great economic, social and environmental importance. The state of Veracruz is one of the main coffee producers in terms of surface (around 139 thousand hectares), commercialization volume (SAGARPA, 2015), and number of producers (Pérez and Pérez, 2012). The varieties cultivated include Typica, Garnica, Bourbon, Caturra, among others (López-García *et al.*, 2016). The cultivation of *Coffea arabica* and its varieties is vulnerable to phytosanitary problems that affect grain production and quality. Such is the case of the Typica variety, which is characterized by its tall size, thin trunk and branches widely separated, large leaves with bronze tips, red fruits, acidity, and high quality in the cup due to its

etanólico de *P. auritum* y *A. indica* en hojas de café enfermas, contuvo el incremento de la infección durante los 20 días. Este efecto no fue similar en aquellos tratados con oxiclóruo de cobre en el día 15 y 20 (Tukey  $P \leq 0.5$ ). Sugerimos que los extractos vegetales evaluados podrían ser una alternativa natural para el manejo preventivo de *H. vastatrix*.

**Palabras clave:** Extractos vegetales, Biofungicida, Roya del café.

En México el cultivo del café (*Coffea arabica*) es una de las actividades principales que conlleva una gran importancia económica, social y ambiental. Tal es el caso del estado de Veracruz, que se mantiene entre los primeros lugares de producción debido a la superficie destinada (alrededor de 139 mil hectáreas), volumen de comercialización (SAGARPA, 2015) y número de productores para su cultivo (Pérez y Pérez, 2012). Específicamente, se cultivan las variedades Typica, Garnica, Bourbon, Caturra, entre otros (López-García *et al.*, 2016). Sin embargo, el cultivo de *Coffea arabica* y sus variedades, son vulnerables a problemas fitosanitarios que afectan la producción de granos y su calidad; como es el caso de la variedad Typica que se caracteriza por un porte alto, tronco y ramas delgadas muy separadas, hojas grandes con puntas de color bronce, frutos de color rojo, acidez y alta calidad en taza, por sus notas a flores y frutas de sabores complejos (Hernández-Solabac *et al.*, 2011; López-García *et al.*, 2016). No obstante, esta variedad es susceptible a plagas y enfermedades, entre las que más predominan y afectan su producción, se encuentra la roya del café, producida por el hongo *Hemileia vastatrix* (Avelino *et al.*, 2015).

Ante este problema fitosanitario, el control químico, a pesar de ser efectivo cuando se usa adecuadamente, conlleva altos costos para los productores,

complex flavors with notes of flowers and fruits (Hernández-Solabac *et al.*, 2011; López-García *et al.*, 2016). This variety is susceptible to pests and diseases. One of the most predominant and harmful in terms of production is coffee rust, caused by the fungus *Hemileia vastatrix* (Avelino *et al.*, 2015).

Chemical control, despite being effective when used properly, entails high costs for producers, and sometimes the production organic coffee must meet official standards that prohibit the use of pesticides (Shigueoka *et al.*, 2014; Silva-Acuña *et al.*, 2002). The use of resistant hybrid varieties of arabica coffee is the most economical and environmentally friendly form of control (FAO, 2015). However, the disease resistance of coffee plants can be affected by the genetic variability of the pathogen, its high evolutionary potential, and the probability of mutation events (Várzea and Marques, 2005). Current initiatives and technological trends promote the development of bio-inputs such as bioinsecticides, bioherbicides, and biofungicides, among others (Ordanza-Beneitez, 2017). These include plant defense stimulants, biological control techniques, and derivatives of natural products obtained from plants and microorganisms (Ordanza-Beneitez, 2017; Mesa *et al.*, 2019). The United States Environmental Protection Agency (EPA) has stated that natural products play an important role in protecting crops under the principles of Integrated Pest and Disease Management (IMPE) (Cantrell *et al.*, 2012; Leahy *et al.*, 2014; Sparks *et al.*, 2017).

This is why these types of alternatives have been used in the cultivation of various crops such as corn and beans, to mention a few. For example, essential oil of neem (*Azadirachta indica*) has been used to control phytopathogenic fungi such as *Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Lagenidium giganteum*, *Metarhizium anisopliae*, and *Fusarium graminearum* (Mohamed-Ali *et al.*,

y en ocasiones, el sistema de cultivo orgánico de café tiene estándares oficiales que prohíben el uso de pesticidas (Shigueoka *et al.*, 2014; Silva-Acuña *et al.*, 2002). Mientras que la introducción de híbridos resistentes de la especie arábica, es la forma de control más económica y amigable con el ambiente (FAO, 2015). Sin embargo, la resistencia de la planta puede reducirse debido a la variabilidad genética del patógeno, su alto potencial evolutivo y probabilidad de eventos de mutación (Várzea y Marques, 2005). Actualmente, las nuevas iniciativas y tendencias tecnológicas se están dirigiendo al desarrollo de bioinsumos como bioinsecticidas, bioherbicidas, biofungicidas, entre otros (Ordanza-Beneitez 2017); que incluyen estimulantes de defensas, técnicas de control biológico y derivados de productos naturales obtenidos a partir de plantas y microorganismos (Ordanza-Beneitez 2017; Mesa *et al.*, 2019). Por lo que, la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA, por sus siglas en inglés), ha descrito que los productos naturales juegan un papel importante para proteger cultivos bajo el concepto del Manejo Integrado de Plagas y Enfermedades (MIPE) (Cantrell *et al.*, 2012; Leahy *et al.*, 2014; Sparks *et al.*, 2017).

Es por ello, que, en varios sistemas de cultivo como el maíz y frijol, por mencionar algunos, han usado este tipo de alternativas, por ejemplo, el aceite esencial del neem (*Azadirachta indica*) se utilizó para combatir hongos fitopatógenos como *Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Lagenidium giganteum*, *Metarhizium anisopliae* y *Fusarium graminearum* (Mohamed-Ali *et al.*, 2017; Mohammad *et al.*, 2014; Mohanty *et al.*, 2008; Heidtmann-Bemvenuti *et al.*, 2016), así como en las urediniosporas de *Phakopsora pachyrhizi*, observándose una reducción del 35% de severidad de la roya asiática de la soya (*Glycine max*) cultivada en invernadero. Asimismo, el extracto de acuyo u hoja santa (*Piper auritum*), ha

2017; Mohammad *et al.*, 2014; Mohanty *et al.*, 2008; Heidtmann-Bemvenuti *et al.*, 2016). It has also been used on urediniospores of *Phakopsora pachyrhizi*, leading to a 35% reduction in the severity of Asian soybean rust (*Glycine max*) under greenhouse conditions. Similarly, the extract of “acuyo” or “hoja santa” (Mexican pepperleaf, *Piper auritum*) has been classified as a biofungicide agent against species of phytopathogenic fungi such as *Helminthosporium* and *Fusarium* spp. (Montes-Belmont, 2009), *Colletotrichum acutatum*, *C. gloeosporioides* and *Botryodiplodia theobromae* (Pineda *et al.*, 2012). The present study evaluated the bio-fungicidal activity of leaf extracts of *Piper auritum* and *A. indica* against *H. vastatrix* using *in vitro* and *in vivo* tests.

Fresh leaves (without mechanical damage and stains) of *A. indica* were collected in Boca del Río, in the state of Veracruz (19° 09' 00.3" N and 96° 07' 32.9" W, 16 masl). Fresh leaves of *P. auritum* were collected in Coatepec, Veracruz (19° 27' 33.3" N and 96° 57' 18.8" W, 1200 masl). All leaves were collected during the spring of 2020. The fresh leaves of both species were rinsed with running water to clean them. The leaves were then crushed, and 10 g of each species were weighed using an analytical balance. The crushed leaf was then placed in a clean container, 100 mL of absolute ethanol were added, and the material was left to stand for 72 h. The same operation was carried out in another container but with an apolar solution (a 1:1 mixture of hexane and chloroform). Afterward, the solutions were poured separately into a funnel with filter paper (Wattman # 2) to obtain ethanolic and apolar extracts. Finally, each extract was placed in a water bath at 45 °C to concentrate the extracts (1g to 900 mg of recovered extract) until the solvent evaporated (modified method of Alvarado-Castillo *et al.*, 2017). The extracts were then stored in a refrigerator at 4 °C for later use in *in vitro* and *in vivo* tests.

sido catalogado como agente biofungicida contra especies de hongos fitopatógenos tales como *Helminthosporium* y *Fusarium* spp. (Montes-Belmont, 2009), *Colletotrichum acutatum*, *C. gloeosporioides* y *Botryodiplodia theobromae* (Pineda *et al.*, 2012). Dado a esta particularidad, en este estudio se evaluó la actividad biofungicida de extractos foliares de *Piper auritum* y *A. indica* sobre *H. vastatrix* a través de ensayos *in vitro* e *in vivo*.

Se obtuvieron hojas frescas (que no tuvieran daño mecánico y sin manchas) de *A. indica* colectadas en Boca del Río, Veracruz (19° 09' 00.3" N y 96° 07' 32.9" W, 16 msnm) y *P. auritum* colectadas en Coatepec, Veracruz (19° 27' 33.3" N y 96° 57' 18.8" W, 1200 msnm) durante el periodo de primavera del año 2020. Las hojas frescas de ambas especies se enjuagaron con agua corriente para limpiarlas, posteriormente, se trituraron y pesaron 10 g por especie mediante una balanza analítica; estas se colocaron en un recipiente limpio y se agregaron 100 mL de etanol absoluto, se dejó reposar durante 72 h y, en otro recipiente se realizó la misma operación, pero en este caso, se le agregó una solución apolar (una mezcla 1:1 de hexano con cloroformo). Transcurrido este tiempo, las soluciones por separado, se vertieron en un embudo con papel filtro (Wattman # 2) para obtener el extracto etanólico y apolar. Finalmente, cada extracto, se colocó en baño maría a 45°C para concentrar los extractos vegetales (1g a 900 mg de extracto recuperado), hasta evaporar el solvente (método modificado de Alvarado-Castillo *et al.*, 2017). Posteriormente, se guardaron en un refrigerador a 4 °C para su posterior uso en los ensayos *in vitro* e *in vivo*.

Las uredosporas de *H. vastatrix* se colectaron de hojas de café arábica *Typica* infectadas de forma natural. La colecta se realizó en los meses de abril-julio del año 2020, en la localidad de Mahuixtlán, Coatepec, Ver., (19° 24' 31.7" N y 96° 55' 37.0" W, 980 msnm); en ese mismo día se llevaron al laboratorio de parasitología de la Facultad de Ciencias

Uredospores of *H. vastatrix* were collected from naturally infected *Typica arabica* coffee leaves. The collection of the leaves was carried out between April and July of 2020, in the town of Mahuixtlán, Coatepec, Veracruz, (19° 24' 31.7" N and 96° 55' 37.0" W, 980 masl). On the same day they were collected, the leaves were taken to the parasitology laboratory of the Faculty of Agricultural Sciences of the Universidad Veracruzana in Xalapa, Veracruz, to carry out the *in vitro* test. The effectiveness of the extracts was tested using the method of Alvarado-Castillo *et al.* (2017). For this test,  $100 \pm 10$  uredospores of *H. vastatrix* were placed in a humid chamber and were then treated with extracts of *P. auritum* and *A. indica* in three concentrations, 1000, 3000 and 5000 ppm (1mL of volume), a control of water:ethanol (1:1 v/v) and a blank of Copper Oxychloride (OXIMET®) and wettable powder (50%) (3.0 g/L of water), which was prepared following the instructions of the manufacturer for application to coffee plants. The humid chambers were placed in an incubator at a regulated temperature of 27 °C for five days. The experimental unit was a Petri dish for each treatment, set up in triplicate. The experiment was observed for 5 days because that is the time necessary for the uredospores to germinate and the germinated tubes to appear, which generally occurs after 6 to 12 hours, without the fungus penetrating and carrying out its biological cycle completely (Avelino and Rivas, 2013; Virginio-Filho and Astroga-Domian, 2015).

The *in vitro* germination was observed at 24, 72 and 120 hours using an optical microscope (VELAB™ model VE-B6). The number of germinated spores per treatment was quantified. The germination percentage of each treatment was calculated after five days. The percentage of inhibition was calculated using the following formula: %growth inhibition= [(control growth–

Agrícolas, Universidad Veracruzana, Xalapa, Ver. Las uredosporas, se colectaron con ayuda de un pincel de punta fina y se depositaron en tubos de 2 mL marca eppendorf, para posteriormente llevar a cabo el ensayo *in vitro*. Se usó el método de Alvarado-Castillo *et al.* (2017) para realizar el ensayo de efectividad de los extractos. Este ensayo consistió en colocar  $100 \pm 10$  uredosporas de *H. vastatrix* en una cámara húmeda, posteriormente se les aplicó el extracto de *P. auritum* y *A. indica* en tres concentraciones, 1000, 3000 y 5000 ppm (1mL de volumen), un testigo a base de agua:etanol (1:1 v/v) y un blanco que fue Oxiclورو de cobre (OXIMET®) 50% polvo humectable (3.0 g/L de agua); se preparó siguiendo las instrucciones del empaque comercial para la aplicación en cafeto. Las cámaras húmedas se colocaron en una incubadora a una temperatura regulada de 27 °C por cinco días, siendo la unidad experimental una caja Petri por cada tratamiento, y se realizó por triplicado. Se consideraron cinco días de observación debido que es el tiempo necesario para observar el inicio de germinación los tubos germinativos de las uredosporas, que generalmente ocurre a partir de las seis a 12 h, sin que esta penetre y lleve a cabo su ciclo biológico totalmente, como el fitoparásito obligado que lo caracteriza (Avelino y Rivas, 2013; Virginio-Filho y Astroga-Domian, 2015).

La observación de germinación *in vitro*, se realizó a las 24, 72 y 120 horas con el apoyo de un microscopio óptico (VELAB™ modelo VE-B6) y se cuantificó el número de esporas germinadas por tratamiento. Transcurridos los cinco días, se obtuvo el porcentaje de germinación por cada tratamiento. El porcentaje de inhibición se calculó con la siguiente fórmula: % inhibición de crecimiento = [(crecimiento del testigo – crecimiento del tratamiento) / crecimiento del testigo] \*100 (Tomado con modificaciones de Polanco-Flórian *et al.*, 2020).

treatment growth)/control growth] \*100 (Taken with modifications from Polanco-Florian *et al.*, 2020).

The *in vivo* analysis of the effectiveness of the *P. auritum* and *A. indica* extracts was conducted on Typica coffee plants with the presence of *H. vastatrix*. These were obtained from a commercial nursery located in San Marcos de León, Xico, Veracruz. (19° 25' 17.1" N 96° 57' 59.2" W, 1100 masl) during the spring of 2020. The plants were taken to the Faculty of Biology, Universidad Veracruzana, Xalapa, Veracruz for analysis. The inclusion criteria used to collect the plants were the following: similar size and number of leaves (approximately 11 to 15 leaves), same age (one year), variety, substrate and no previous treatment with fungicides. The coffee plants were grouped into experimental units of 10 individuals. Different treatment groups were formed: control (water), blank (copper oxychloride), ethanolic extracts of *P. auritum* and *A. indica* at three concentrations, 1000, 3000 and 5000ppm. Each treatment had three repetitions. The experimental design was completely randomized. The data were analyzed with an analysis of variance (ANOVA) and the means of each evaluation (24, 72 and 120 h) were compared with a Tukey test ( $P \leq 0.05$ ). The normality of the parameters was checked with the Shapiro-Wilks test. All statistical analyses were performed using the STATISTICA® program for Windows.

All coffee plants were kept under the same greenhouse conditions of temperature, humidity, light incidence, and watering. To induce infection with *H. vastatrix* (previously collected in the town of Mahuixtlán, municipality of Coatepec, Veracruz), around 100 uredospores per square centimeter (previously quantified with the help of a binocular stereoscope VELAB™ VE- S1) were inoculated on the underside of the leaves of

Para el análisis *in vivo* de la efectividad de los extractos de *P. auritum* y *A. indica*, se utilizaron plantas de café variedad Typica con presencia de *H. vastatrix* que se obtuvieron de un vivero comercial ubicado en San Marcos de León, Xico, Ver. (19° 25' 17.1" N 96° 57' 59.2" W, 1100 msnm) durante el periodo de primavera del año 2020. Posteriormente, se llevaron a la facultad de Biología, Universidad Veracruzana, Xalapa, Ver., para su posterior análisis. Los criterios de selección e inclusión de las plantas fueron el tamaño y número de hojas similares (11 a 15 hojas aproximadamente), misma edad (un año), variedad, sustrato y sin ningún tratamiento previo con fungicidas. Las plantas de café se agruparon por unidad experimental de 10 individuos y se formaron los diferentes grupos por tratamiento: testigo (agua), blanco (oxicloruro de cobre), extracto etanólico de *P. auritum* y *A. indica* a tres concentraciones, 1000, 3000 y 5000 ppm; cada tratamiento con tres repeticiones. Se utilizó un diseño experimental completamente al azar. El análisis de los datos se realizó por medio de un análisis de varianza (ANOVA) y la comparación de medias de cada evaluación, 24, 72 y 120 h, se realizó con la prueba de Tukey ( $P \leq 0.05$ ) y una previa comprobación de los paramétricos de Normalidad mediante prueba de Shapiro-Wilks, utilizando el programa STATISTICA® para Windows.

Todas las plantas de café se mantuvieron en las mismas condiciones de temperatura, humedad, incidencia de luz y aplicación de agua, en condiciones de vivero. Para inducir la infección de *H. vastatrix* (previamente colectadas en la localidad de Mahuixtlán, municipio de Coatepec, Ver), se inocularon alrededor de 100 uredosporas por centímetro cuadrado (previamente cuantificadas con la ayuda de un estereoscópico binocular básico (VELAB™ modelo VE-S1) en el envés de las hojas de las plantas de café Typica con la ayuda de un pincel de punta fina. Para observar la infección, se utilizó

Typica coffee plants with the help of a fine-tipped brush. The progress of the infection, including the incubation period (IP) and the latency period (LP), was observed for 20 days using the diagrammatic scale of severity for coffee rust infection (SINAVEF, 2013). It is important to highlight that the first sori were formed during this period, as well as the release of new spores, which confirmed the presence of coffee rust and the beginning of the infection process (Avelino and Rivas, 2013) in 2% of the affected area (Capucho *et al.*, 2011).

The treatments were applied on the underside of the leaves once the first signs of the pathogen were detected (100 mL volume of previously prepared solution) and the progress of the disease was recorded (0, 5, 10, 15 and 20 days after inoculation) (SINAVEF, 2013), that is, during the appearance of new yellow or orange spots on the underside of the leaves, which is one of the indicators of the growth of the disease. The progress of the disease in all the experimental groups was assessed using a diagrammatic scale, according to SINAVEF (2013). Photos of the upper and lower sides of the leaves were taken to classify them according to the diagrammatic scale of disease severity and to record the reactions of *H. vastatrix*, as reported by SINAVEF (2013) and SENASICA (2019). The SINAVEF scale (2013) was used to evaluate the severity of the disease in the leaves.

The data obtained with the diagrammatic scale were transformed into severity percentages using the Townsend and Heuberger formula (Guillén-Sánchez *et al.*, 2017):

$$P = \left( \frac{\sum n \cdot v}{CM \cdot N} \right) * 100 \quad (2)$$

Where,

P - weighted severity average

n - number of leaves for each class in the scale

el criterio de la escala diagramática de severidad de infección de roya del café (SINAVEF, 2013); así como el progreso de la enfermedad durante los 20 días, Período de incubación (PI) y Período de latencia (PL). Es importante resaltar que, durante este periodo, se observó la producción de los primeros soros, liberación de nuevas esporas que confirmaron la presencia de roya e inicio del proceso de infección (Avelino y Rivas, 2013) en un 2% del área afectada para iniciar con el experimento (Capucho *et al.*, 2011).

La aplicación de los tratamientos se realizó en el envés de las hojas, una vez que se detectaron los primeros signos del patógeno (100 mL de volumen de solución previamente preparada), y se registró el avance de la enfermedad (0, 5, 10, 15 y 20 días después de la inoculación) (SINAVEF, 2013), es decir, durante la aparición de nuevas manchas amarillas o anaranjadas en el envés de las hojas, que es uno de los indicativos del incremento de la enfermedad. Se cuantificó el avance de la enfermedad mediante una escala diagramática de acuerdo con SINAVEF (2013), en todos los grupos experimentales. Al mismo tiempo, se tomaron fotos del haz y envés de las hojas para clasificarlas de acuerdo con la escala diagramática de severidad y verificar las reacciones crecientes de *H. vastatrix* como ha sido reportado por SINAVEF (2013) y SENASICA (2019). Para evaluar la severidad en hoja se utilizó la escala de SINAVEF (2013).

Los datos obtenidos con la escala diagramática fueron transformados a porcentajes de severidad, utilizando la fórmula de Townsend y Heuberger (Guillén-Sánchez *et al.*, 2017):

$$P = \left( \frac{\sum n \cdot v}{CM \cdot N} \right) * 100 \quad (2)$$

Donde,

P - media ponderada de severidad

n - número de hojas por cada clase en la escala

v - numerical value of each class

N - total number of leaves in the sample

CM - major category

The experimental design was completely randomized, with a factorial arrangement of three repetitions. Factor A corresponded to the commercial fungicide and to the three concentrations of plant extracts, while factor B corresponded to the fungus. An analysis of variance (ANOVA) was used to determine the effect of the treatments. Tukey's comparison of means test was used to evaluate ( $P \leq 0.05$ ) differences, using the STATISTICA® program for Windows.

Figure 1 shows the inhibition effect of all treatments on the germination of *H. vastatrix* uredospores. The ethanolic and apolar extracts of *A. indica* and *P. auritum* inhibited 99% of the germination of *H. vastatrix*. The yellow coloration usually presented by untreated uredospores was not observed. However, the uredospores treated with copper oxychloride did show a yellow coloration, similar to those in the control group (Figure 1 A and C). A gradual increase in uredospore germination was observed in the latter group, from 18 to 99 % between 24, 72 and 120 hours (Figure 2).

The treatments with *A. indica* and *P. auritum*, in particular at concentrations of 3000 ppm and 5000 ppm, caused damage to the uredospores of *H. vastatrix*, as evidenced by the discoloration and deformation observed in the outer structure of the uredospores. The uredospores treated with copper oxychloride remained yellowish and did not germinate. Alvarado *et al.* (2017) mentioned that uredospores that showed discoloration and deformation after being treated with plant extracts could not germinate. Based on the definition of "antifungal" by Gregori-Valdés (2005), they confirmed that the leaf extracts of *A. indica* and *P. auritum* have biofungicidal activity against *H.*

v - valor numérico de cada clase

N - número total de hojas en la muestra

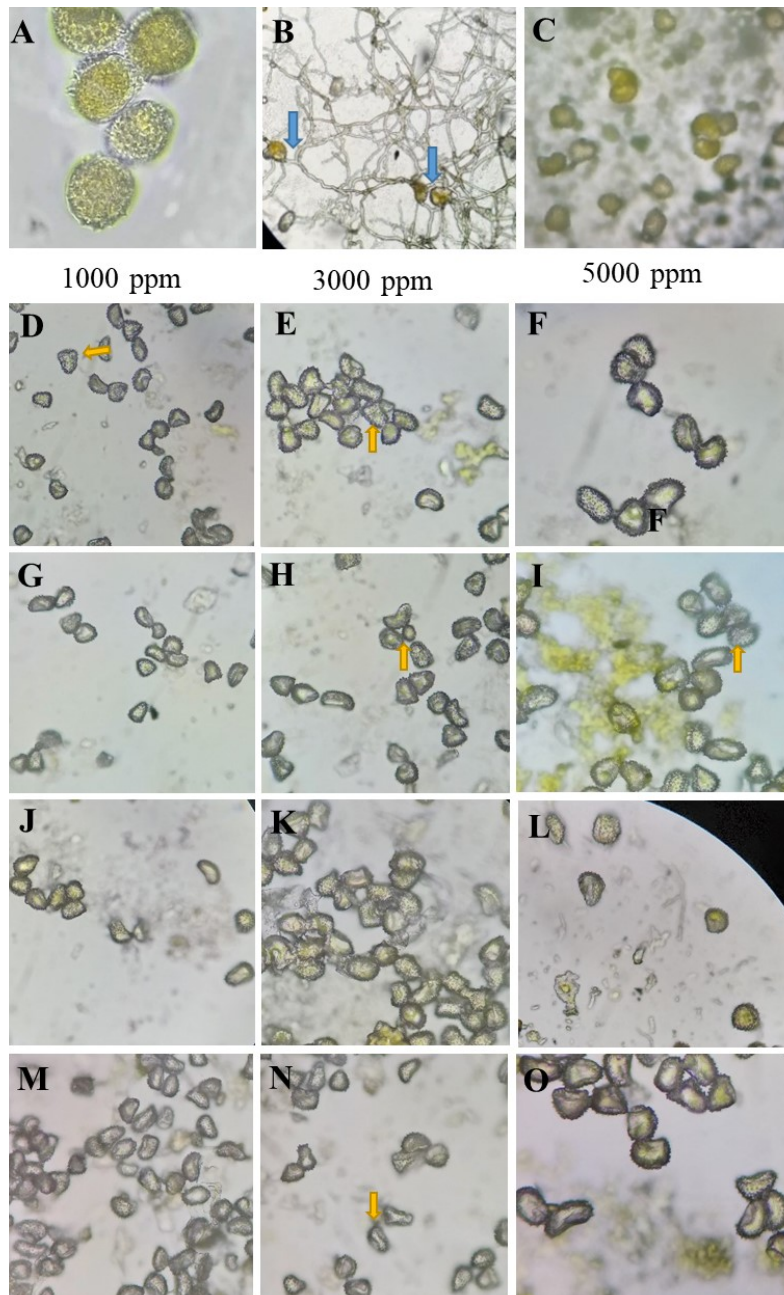
CM - categoría mayor

El diseño experimental que se utilizó fue completamente al azar, con arreglo factorial de tres repeticiones. El factor A correspondió al fungicida comercial y a las tres concentraciones de los extractos de plantas y, el factor B al hongo. Se utilizó el análisis de varianza (ANOVA) para determinar el efecto del tratamiento. En los casos donde se encontraron diferencias, se aplicó la prueba de comparación de medias de Tukey ( $P \leq 0.05$ ) utilizando el programa STATISTICA® para Windows.

En la Figura 1, se observa el efecto de inhibición de la germinación de las uredosporas de *H. vastatrix* en todos los tratamientos. Los extractos de *A. indica* y *P. auritum*, tanto etanólico como apolar, inhibieron el 99% de la germinación de *H. vastatrix* y no se observó la coloración amarilla que comúnmente presentan las uredosporas sin tratamiento. Mientras que, las uredosporas tratadas con oxiclورو de cobre continuaron con una coloración amarilla similar a las del grupo testigo (Figura 1 A y C). En el grupo testigo, se observó un incremento paulatino de germinación de las uredosporas, del 18% al 99% durante las 24, 72 y 120 horas (Figura 2).

El efecto de los tratamientos de *A. indica* y *P. auritum*, en particular la concentración de 3000 ppm y 5000 ppm, promovieron un daño sobre las uredosporas de *H. vastatrix*; debido que se observaron uredosporas decoloradas y deformadas en parte de la estructura exterior de la uredosporas, mientras que las uredosporas que recibieron oxiclورو de cobre permanecieron amarillentas y no germinaron. De acuerdo con Alvarado *et al.* (2017), mencionaron que las uredosporas dañadas en la parte exterior del hongo y despigmentadas, no tienen capacidad para germinar después del tratamiento con extractos vegetales, y considerando la definición del





**Figure 1.** Effect of plant extracts on *Hemileia vastatrix* uredospores. A) *H. vastatrix* uredospores without treatment; B) Control; the blue arrow shows the germ tubes of *H. vastatrix*. C) Blank (Copper oxychloride) inhibits the germination of *H. vastatrix*. D-F) Ethanol extract of *A. indica*; G-I) Apolar extract of *A. indica*; J-L) Ethanol extract of *P. auritum*; M-O) Apolar extract of *P. auritum* (40X); the yellow arrows indicate decoloration of *H. vastatrix* and absence of germination.

**Figura 1.** Efecto de extractos vegetales en uredosporas de *Hemileia vastatrix*. A) Uredosporas de *H. vastatrix* sin tratamiento; B) Testigo, la flecha de color azul muestra los tubos germinativos de *H. vastatrix*. C) Blanco (Oxicloruro de cobre) inhibe la germinación de *H. vastatrix*. D-F) Extracto *A. indica* etanólico; G-I) extracto *A. indica* apolar; J-L) Extracto *P. auritum* etanólico; M-O) extracto *P. auritum* apolar (40X), las flechas amarillas señalan despigmentación de *H. vastatrix* y sin germinación.

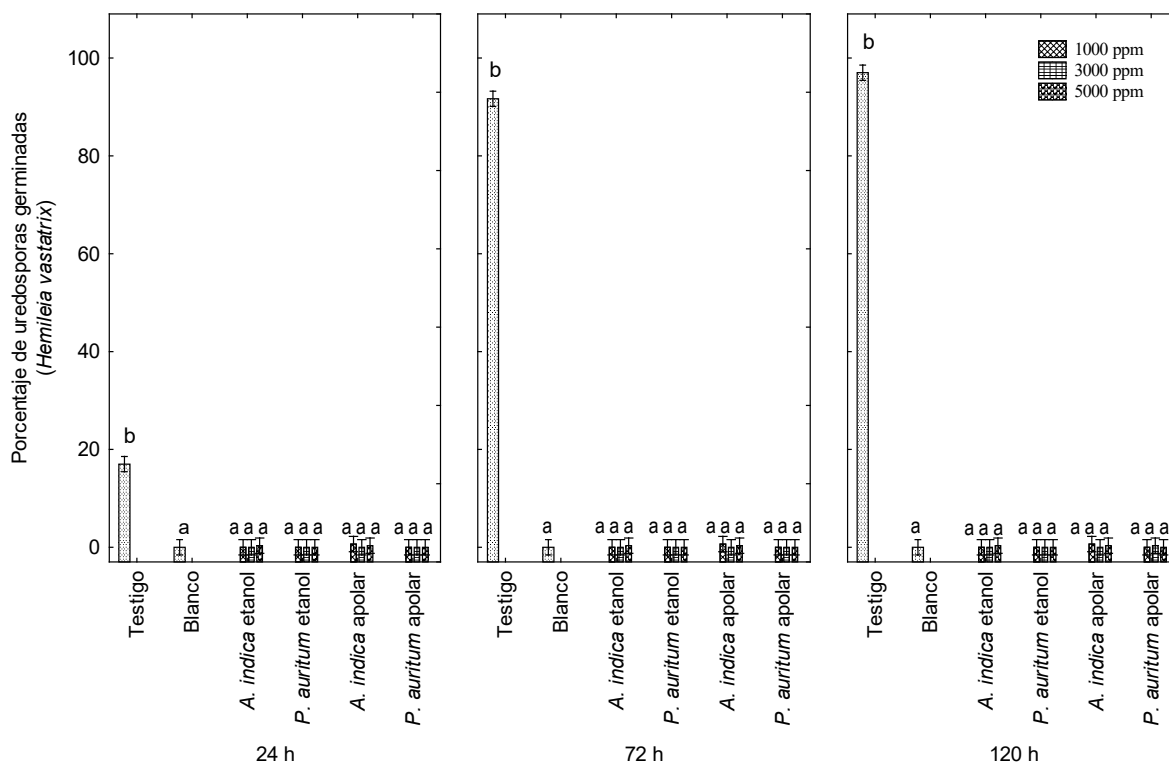


Figure 2. Germination percentage of *Hemileia vastatrix* uredospores under the action of ethanolic and apolar extracts of *Piper auritum* and *Azadirachta indica*, and copper oxychloride (Blank) at 24 h, 72 h and 120 h of exposure. Letters indicate significant differences between means (Tukey,  $P \leq 0.05$ ).

Figura 2. Porcentaje de germinación de uredosporas de *Hemileia vastatrix* ante la acción de extractos etanólicos y apolares de *Piper auritum* y *Azadirachta indica*, y oxiclورو de cobre (Blanco) durante las 24 h, 72 h y 120 h de exposición. Las letras indican diferencias significativas entre las medias (Tukey,  $P \leq 0.05$ ).

*vastatrix* uredospores. Both extracts evaluated in the present study might have partially altered the external structures of *H. vastatrix* uredospores, or simply altered their viability or survival capacity, either directly or indirectly, as described by Gregorí-Valdés (2005).

The harmful effects of the coffee plant extracts on uredospores could be due to the presence of secondary metabolites with biofungicidal activity in *P. auritum*, such as monoterpenoids, sesquiterpenoids, and phenylpropanoids; or to the presence of phenolic metabolites such as alkaloids and glycosides in *A. indica* (Mohammad *et al.*,

concepto “antifúngico de Gregorí-Valdés (2005)”, comprueba que los extractos foliares de *A. indica* y *P. auritum* tienen actividad biofungicida contra las uredosporas de *H. vastatrix*. Ambos extractos implementados en este estudio, podrían estar alterando parcialmente las estructuras externas, o simplemente, alterando su viabilidad o capacidad de supervivencia, bien sea directa o indirectamente como los describe Gregorí-Valdés (2005).

El efecto dañino de los extractos sobre las uredosporas podría deberse a la presencia de los metabolitos secundarios con actividad biofungicida, tales como los monoterpenoides, sesquiterpenoides

2014; Pineda *et al.*, 2012; Nagano and Batalini, 2021). It is also possible that the presence of several secondary metabolites could have a synergic effect that inhibits the germination of *H. vastatrix* (Babatunde *et al.*, 2019; Mgbeahuruike *et al.*, 2017; Durant-Archibold *et al.*, 2018, Salehi *et al.*, 2019; Mesa *et al.*, 2019). This fungicide activity might work by interacting with the cell wall or membrane of the fungus. However, further studies should be carried out to identify the possible mechanisms of action and the type of secondary metabolites with biofungicide activity.

The apolar extract was omitted in the *in vivo* tests due to its degree of environmental toxicity. Treatment with the ethanolic extracts of *P. auritum* and *A. indica* caused no increase in yellow spots or uredospore sporulation in Typica coffee plants at the three different concentrations evaluated, 1000, 3000 and 5000 ppm (Figure 3). The germination percentage remained constant at around 26.6% during the 20 days of experimentation (SENASICA 2019); that is, no new spore colonies were found on the underside of the leaves and foliar injury was minimal, according to the diagrammatic scale for evaluating the severity of coffee rust in leaves and plants, as reported by SAGARPA (2015) and SENASICA (2019). Therefore, the severity of the disease remained constant from the beginning to the end of the experiment. Only the yellowish spots caused by the uredospores of *H. vastatrix* were observed (Figure 4 C and D).

In the control treatment, the infection increased progressively until the end of the experiment, up to severity class IV or 69.3% severity (Figure 4 and 5 A). Significant differences were found between treatments when comparing their effect over time (Tukey,  $P \leq 0.05$ ). In the coffee plants treated with copper oxychloride, the infection was observed up to 15 days after the application of the treatment. The infection increases from class two to three,

y fenilpropanoides en *P. auritum*; o bien, la presencia de los metabolitos fenólicos, alcaloides y glicósidos en *A. indica* (Mohammad *et al.*, 2014; Pineda *et al.*, 2012; Nagano y Batalini, 2021). Asimismo, se puede considerar que la presencia de varios metabolitos secundarios podría tener una sinergia para inhibir la germinación de *H. vastatrix*, es decir, una acción conjunta para incrementar su acción biofungicida (Babatunde, *et al.*, 2019; Mgbeahuruike *et al.*, 2017; Durant-Archibold *et al.*, 2018, Salehi *et al.*, 2019; Mesa *et al.*, 2019). Esta posible acción, podría estar interactuando en la pared o membrana celular del hongo, sin embargo, es importante realizar otros estudios que permitan identificar los posibles mecanismos de acción y que tipo de metabolitos secundarios están actuando como biofungicida.

En los ensayos *in vivo*, se omitió el extracto apolar debido a su grado de toxicidad para el ambiente. Mientras que al utilizar los extractos etanólicos de *P. auritum* y *A. indica* no se observó ningún incremento de manchas amarillas o esporulación de las uredosporas en las plantas de café Typica, a las tres diferentes concentraciones 1000, 3000 y 5000 ppm (Figura 3); manteniéndose un porcentaje constante de alrededor del 26.6% durante los 20 días de experimentación (SENASICA 2019); es decir, no se encontraron nuevas colonias de esporas en el envés de las hojas y se minimizó el margen de lesión foliar de acuerdo a la escala diagramática de evaluación de severidad de la roya del café en hojas y plantas, como ha sido reportado por SAGARPA (2015) y SENASICA (2019). Por lo que, la severidad se mantuvo constante desde el inicio hasta al final del ensayo, observándose solo las manchas amarillentas ocasionadas por las uredosporas de *H. vastatrix* (Figura 4 C y D).

Mientras que, en el testigo, la infección aumentó progresivamente hasta finalizar el ensayo, quedando en la clase cuatro de severidad, representada en un 69.3 % del porcentaje de severidad de la enfermedad

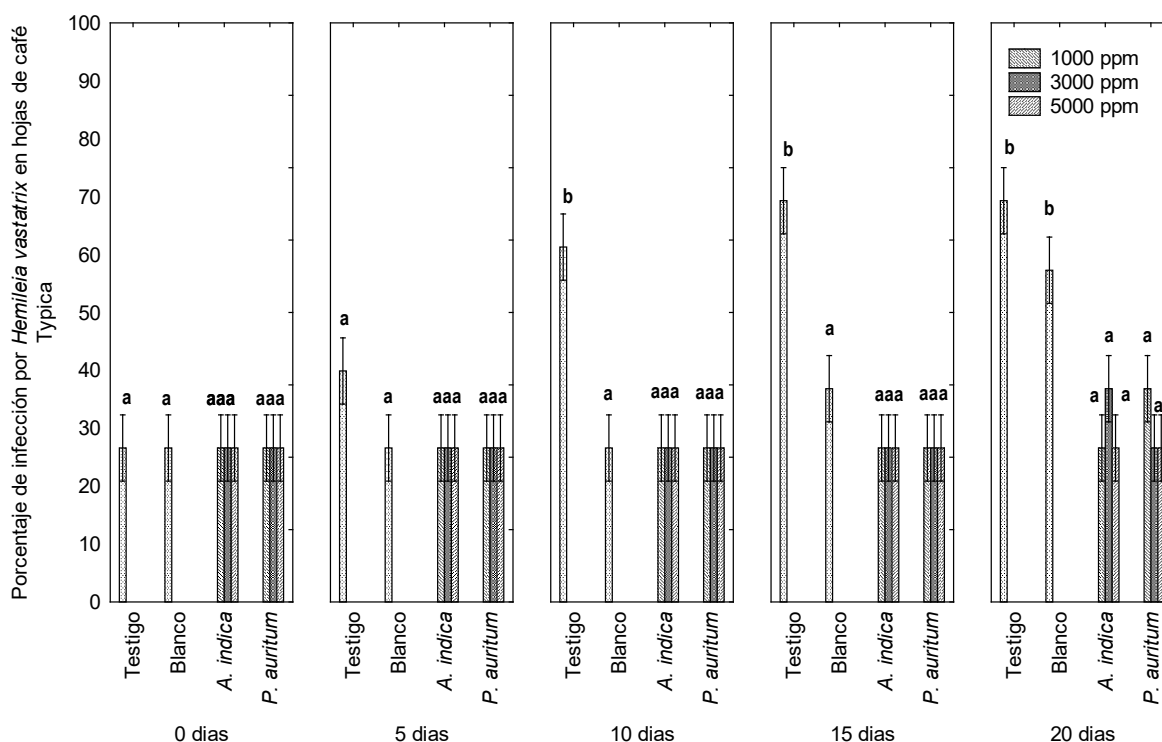


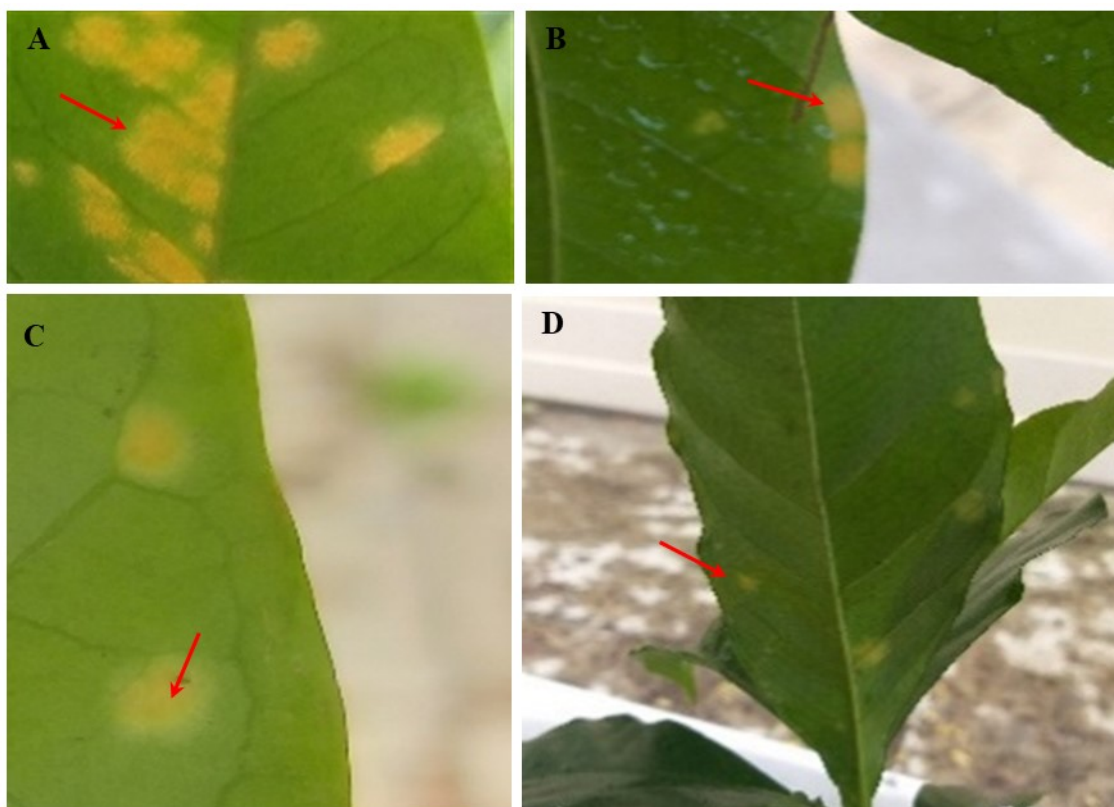
Figure 3. Severity percentage of *H. vastatrix* in Typica coffee leaves treated with foliar ethanolic extracts of *A. indica* and *P. auritum* during 20 days of treatment. On the Y-axis title: Severity of *Hemileia vastatrix* (%). Letters indicate significant differences between means (Tukey,  $P \leq 0.05$ ).

Figura 3. Porcentaje de severidad de *H. vastatrix* en hojas de café Typica tratadas con extractos etanólicos foliares de *A. indica* y *P. auritum* durante 20 días de tratamiento. En el título del eje Y: Severidad de *Hemileia vastatrix* (%). Las letras indican diferencias significativas entre las medias (Tukey,  $P \leq 0.05$ ).

that is, from 32 to 52% severity (Figure 4), when some yellowish spots with small fungal pustules appeared on the underside of the leaf of Typica coffee plants. These signs indicate the beginning of the production of uredospores.

Therefore, the use of ethanolic extracts of *A. indica* and *P. auritum*, until now, is one of most the promising extracts as inhibiting agents of coffee rust caused by *H. vastatrix* in Typica coffee plants under greenhouse conditions. Sánchez-Fernández *et al.* (2013) indicated the importance of carrying out tests on plants under greenhouse or nursery conditions to assess the pre- and post-emergent activity of different natural compounds. Previous

(Figura 4 y 5 A). Al comparar los tratamientos a través del tiempo, se encontraron diferencias significativas entre ellos (Tukey,  $P \leq 0.05$ ). En el caso de las plantas de café tratadas con oxícloruro de cobre, la infección no se incrementó, sino que, esta se observó hasta 15 días después de la aplicación del tratamiento; la infección subió de la clase dos a la tres, representando de un 32 a 52 % de severidad (Figura 4); es decir, hubo aparición de algunas manchas amarillentas con pequeñas pústulas del hongo en el envés de la hoja de las plantas de café Typica, que indica el inicio de la producción de uredosporas. Por lo tanto, el empleo de los extractos etanólicos de *A. indica* y *P. auritum*, ha sido hasta ahora, uno



**Figure 4.** Effect of the application of copper oxychloride and extracts of *Azadirachta indica* and *Piper auritum* on Typica coffee leaves. A) Control; red arrows indicate *H. vastatrix* infection; B) Copper oxychloride; yellowish stains; C and D) Coffee leaves treated for 15 days with extracts of *A. indica* and *P. auritum* (red arrows indicate the damage caused by the initial infection, as well as the absence of uredospores due to the application of plant extracts).

**Figura 4.** Efecto de la aplicación de oxiclóruo de cobre y extractos de *Azadirachta indica* y *Piper auritum* en hojas de café Typica. A) Testigo, flechas rojas indican la infección de *H. vastatrix*; B) Oxiclóruo de cobre, manchas amarillentas; C y D) Hojas de café tratadas durante 15 días con extracto de *A. indica* y *P. auritum* (las flechas rojas señalan el daño ocasionado por la infección inicial, así como la ausencia de uredosporas debido a la aplicación de los extractos vegetales).

studies have reported that the extracts of *P. auritum* and *A. indica* are effective for the management of phytopathogenic fungi in mango, avocado, apple, peach, tomato, potato and rice plantations infected with fungi of the genera *Colletotrichum*, *Botryodiplodia*, *Alternaria*, *Curvularia*, *Sarocladium*, *Bipolaris*, *Fusarium* (Pineda *et al.*, 2012), *Rhizoctonia*, *Sclerotium* (Mohamed-Ali *et al.*, 2017), *Sclerotinia* (Mohammad *et al.*, 2014), *Lagenidium*, and *Metarhizium* (Mohanty *et al.*,

de los extractos prometedores para ser aplicados en plantas de café Typica en condiciones de vivero, y como preventivo a una creciente infección de roya del café *H. vastatrix*. Sánchez-Fernández *et al.* (2013), reportaron la importancia de realizar pruebas en invernadero o viveros sobre especies vegetales cultivables o sobre malezas para determinar la actividad de tipo pre y post-emergente; así como la identificación de los compuestos naturales y activos potenciales.

2008). These studies support the use of extracts of *P. auritum* and *A. indica* as biofungicides in Typica coffee plants before planting and the effective concentration of the extracts ranges between 1000 and 5000 ppm. The use of these extracts within the framework of sustainable agriculture is a promising alternative due to their effectiveness, low cost and easy degradation due to their natural origin (Rodríguez *et al.*, 2000; Villavicencio-Nieto and Pérez-Escandón, 2010). A classification consensus of these extracts should be established according to their effect: active, moderately active, slightly active and innocuous. This would allow to select the plant extracts with the most promising antifungal activity (Mesa *et al.*, 2019). The results of the present study support the use of extracts from *A. indica* and *P. auritum* as biofungicides against *H. vastatrix*.

The foliar extracts of *A. indica* and *P. auritum*, in concentrations of 1000, 3000 and 5000 ppm, inhibited the germination of *H. vastatrix* during the 120 hours of treatment, causing discoloration and deformation in the external structure of *H. vastatrix* uredospores. Both extracts showed biofungicidal activity against *H. vastatrix* uredospores when applied to Typica variety coffee plants, reducing the spread of the disease during 20 days after the application of the extracts. In conclusion, extracts of *A. indica* and *P. auritum* in concentrations of 1,000 to 5,000 ppm are an effective alternative for the preventive management of coffee rust, mainly in nursery plants.

## CITED LITERATURE

Alvarado-Castillo G, Benítez-Badillo G, Lozada-García JA, Ortiz-Ceballos G and Torres-Pelayo VR. 2017. Uredospores mycelium germination inhibition of coffee rust (*Hemileia vastatrix*) through three alternative compounds: First study. *Wulfenia* 24: 65-78. <http://www.multidisciplinarywulfenia.org/auto/index.php/archive/part/24/2/1/?currentVol=24&currentissue=2>

Asimismo, previos estudios han reportado que los extractos de *P. auritum* y *A. indica* son efectivos para el manejo de hongos fitopatógenos de plantaciones de mango, aguacate, manzana, durazno, tomate, papa y arroz infectados con hongos de los géneros *Colletotrichum*, *Botryodiplodia*, *Alternaria*, *Curvularia*, *Sarocladium*, *Bipolaris*, *Fusarium* (Pineda *et al.*, 2012); *Rhizoctonia* y *Sclerotium* (Mohamed-Ali *et al.*, 2017), *Sclerotinia* (Mohammad *et al.*, 2014), *Lagenidium* y *Metarhizium* (Mohanty *et al.*, 2008). Estas investigaciones, refuerzan la idea de que los extractos de *P. auritum* y *A. indica* podrían ser utilizados como biofungicidas potenciales en plantas de café Typica previo a ser sembradas en parcelas y, la concentración a elegir podría ser entre un rango de 1000 a 5000 ppm. Así, el empleo de estos extractos en el marco de una agricultura sostenible, es una alternativa promisorio por su efectividad, bajo costo y de fácil degradación debido a su origen natural (Rodríguez *et al.*, 2000; Villavicencio-Nieto y Pérez-Escandón, 2010). Aunado a lo anterior, se recomienda establecer un consenso de clasificación según el efecto del extracto como: activo, moderadamente activo y ligeramente activo e inocuo; que permita clasificar al extracto vegetal como antifúngico promisorio (Mesa *et al.*, 2019). Finalmente, sugerimos que el empleo de *A. indica* y *P. auritum* constituye una alternativa novedosa como biofungicida contra *H. vastatrix*.

Se concluye que los extractos foliares de *A. indica* y *P. auritum* a concentraciones de 1000, 3000 y 5000 ppm inhibieron la germinación de *H. vastatrix* durante las 120 horas de tratamiento, causando uredosporas *H. vastatrix* decoloradas y deformadas en la estructura exterior. Asimismo, ambos extractos aplicados en plantas de café variedad Typica, presentaron actividad biofungicida contra las uredosporas de *H. vastatrix* y redujeron la propagación de la enfermedad durante los 20 días de aplicación de los extractos. Por lo tanto, los extractos de *A. in-*

- Avelino J, Cristancho M, Georgiou S, Imbach P, Aguilar L, Bornemann G, Läderach P, Anzueto F, Hruska AJ and Morales C. 2015. The coffee rust crises in Colombia and Central America (2008-2013): impacts, plausible causes and proposed solutions. *Food Security* 7: 303-321. <https://doi.org/10.1007/s12571-015-0446-9>
- Avelino J and Rivas G. 2013. La roya anaranjada del café. 1-47pp. <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-01071036>
- Babatunde DE, Otusemade GO, Efeovbokhan VE, Ojewumi ME, Bolade OP and Owoeye TF. 2019. Chemical composition of steam and solvent crude oil extracts from *Azadirachta indica* leaves. *Chemical Data Collections* 20: 100208. <https://doi.org/10.1016/j.cdc.2019.100208>
- Cantrell CL, Dayan FE and Duke SO. 2012. Natural products as sources for new Pesticides. *Journal of Natural Products* 75(6): 1231-1242. <https://doi.org/10.1021/np300024u>
- Capucho AS, Zambolim L, Duarte HSS and Vaz GRO. 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: 1144-50. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2011.02472.x>
- Durant-Archibold AA, Santana AI and Gupta MP. 2018. Ethnomedical uses and pharmacological activities of most prevalent species of genus *Piper* in Panama: A review. *Journal of Ethnopharmacology* 217: 63-82. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.02.008>
- FAO. 2015. Manejo agroecológico de la roya del café. Organización de las naciones unidas para la alimentación y la agricultura ciudad de panamá. 96 p. <https://www.fao.org/documents/card/fr/c/a55342d5-58e1-4c57-b1bd-7f65cc80e547/>
- Guillén-Sánchez D, Pérez R, Andrade-Rodríguez M, López-Martínez V, Alía-Tejagal I and Juárez-López P. 2017. Eficacia de seis fungicidas en el control de *Mycosphaerella citri* Whiteside en naranja, Var., 'Valencia' en Tlayecac, Morelos, México. *Centro Agrícola* 44(3): 71-79. [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0253-57852017000300010&lng=es&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253-57852017000300010&lng=es&tlng=es)
- Gregori-Valdés BS. 2005. Estructura y actividad de los antifúngicos. *Revista Cubana de Farmacia*, 39 (2): 1-15. [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-75152005000200012&lng=es&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75152005000200012&lng=es&tlng=es)
- Heidtmann-Bemvenuti R, Tralamazza SM, Jorge Ferreira CF, Corrêa B and Badiale-Furlong E. 2016. Effect of natural compounds on *Fusarium graminearum* complex. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 96(12): 3998-4008. <https://doi:10.1002/jsfa.7591>
- Hernández-Solabac JAM, Nava-Tablada ME, Díaz-Cárdenas S, Pérez-Portilla E and Escamilla-Prado E. 2011. Migración internacional y manejo del café en dos comunidades del Centro de Veracruz. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 14:807-818. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1870-04622011000300013](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-04622011000300013)
- Leahy J, Mendelsohn M, Kough J, Jones R and Berckes N. 2014. Biopesticide oversight and registration at the US Environmental Protection Agency. *Biopesticides: state of the art and future opportunities*. American Chemical Society. 3-18 p. <https://doi:10.1021/bk-2014-1172.ch001>
- dica* y *P. auritum* a concentraciones de 1000 a 5000 ppm, son una alternativa en el manejo preventivo de la roya del café, principalmente en plantas de vivero. Esto podría ser una alternativa en el manejo preventivo en cultivos de café *Typica* en viveros.
- ~~~~~ Fin de la versión en Español ~~~~~
- López-García FJ, Escamilla-Prado E, Zamarripa-Colmenero A and Cruz-Castillo JG. 2016. Producción y calidad en variedades de café (*Coffea arabica*) en Veracruz, México. *Revista Fitotecnia Mexicana* 39(3): 297-304. <http://www.scielo.org.mx/pdf/rfm/v39n3/0187-7380-rfm-39-03-00297.pdf>
- Mesa VAM, Marín PA, Ocampo O, Calle J and Monsalve Z. 2019. Fungicidas a partir de extractos vegetales: una alternativa en el manejo integrado de hongos fitopatógenos. *Revista de Investigaciones Agropecuarias* 45(1): 23-30. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=86458941001>
- Mgbeahuruike EE, Yrjönen T, Vuorela H and Holm Y. 2017. Bioactive compound from medicinal plants: Focus on the *Piper* species. *South African Journal of Botany* 112: 54-69. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2017.05.007>
- Mohammad RO, Ling Wang, Zhou qi Cui, Chunlan Yang, Tao Zhongyun and Guan-Lin Xie. 2014. Antifungal and SAR potential of crude extracts derived from neem and ginger against storage carrot rot caused by *Sclerotinia Sclerotium*. *Industrial Crops & Products* 55:130-139. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.02.012>
- Mohamed-Ali EO, Akhtar Shakil N, Singh Rana V, Sarkar DJ, Majumder S, Kaushik P, Bhushan Singh B and Kumar J. 2017. Antifungal activity of nano emulsions of neem and citronella oil against phytopathogenic fungi, *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii*. *Industrial Crops & Products* 108: 379-387. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.06.061>
- Mohanty SSG, Raghavendra K and Prasad Dash A. 2008. Influence of growth medium on antifungal activity of neem oil (*Azadirachta indica*) against *Lagenidium giganteum* and *Metarhizium anisopliae*. *Mycoscience* 49: 318-320. <https://doi.org/10.1007/S10267-008-0425-5>
- Montes-Belmont R. 2009. Diversidad de compuestos químicos producidos por las plantas contra hongos fitopatógenos. *Revista mexicana de micología* 29: 73-82. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0187-31802009000100010&lng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-31802009000100010&lng=es)
- Nagano MS and Batalini C. 2021. Phytochemical screening, antioxidant activity and potential toxicity of *Azadirachta indica* A. Juss (neem) leaves. *Revista Colombiana de Ciencias Químico - Farmacéuticas* 50(1): 29-47. <https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v50n1.95447>
- Ordanza-Beneitez MA. 2017. Biopesticidas: Tipos y aplicaciones en el control de plagas agrícolas. *Agroproductividad* 10 (3): 31-367. <https://revista-agroproductividad.org/index.php/agroproductividad/article/view/966>

- Pérez AP and Pérez TM. 2012. Las denominaciones de origen del café mexicano y sus cuestionamientos como modelo de desarrollo regional. *Revista Perspectivas Rurales Nueva Época* 10(3): 43-56. <https://www.revistas.una.ac.cr/index.php/perspectivasrurales/article/view/3381>
- Pineda RM, Samuel Vizcaíno P, García MPP, Gil GGH and Durango DLR. 2012. Chemical composition and antifungal activity of *Piper auritum* and *Piper holtonii* Against phytopathogenic fungi. *Chilean Journal of Agricultural Research* 72(4): 507-515. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-58392012000400008>
- Polanco-Florián LG, Alvarado-Gómez OG, Olivares-Sáenz E, González-Garza R and Pérez-González O. 2020. Control biológico de *Lasiodiplodia theobromae* y *Fomitopsis meliae* causantes de la muerte regresiva de los cítricos. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 11 (5): 1069-1081. <https://doi.org/10.29312/remexca.v11i5.2272>
- Rodríguez AT, Morales D and Ramírez MA. 2000. Efecto de extractos vegetales sobre el crecimiento in vitro de hongos fitopatógenos. *Cultivos Tropicales* 21(2): 79-82. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=193215024014>
- Salehi B, Zakaria ZA, Gyawali R, Ibrahim SA, Rajkovic J, Shinwari ZK, Khan T, Sharifi-Rad J, Ozleyen A, Turkdonmez E, Valussi M, Tumer TB, Monzote Fidalgo L, Martorell M and Setzer WN. 2019. *Piper* species: A comprehensive review of their phytochemistry, biological activity and applications. *Molecules* 24(7): 1364. <https://doi:10.3390/molecules24071364>
- Sánchez-Fernández ER, Sánchez-Ortiz BL, Sandoval-Espinosa YKM, Ulloa-Benítez A, Armendáriz-Guillén B, García-Méndez MC and Macías-Rubalcava ML. 2013. Hongos endófitos: fuente potencial de metabolitos secundarios bioactivos con utilidad en agricultura y medicina. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas* 16 (2): 132-146. [https://doi.org/10.1016/S1405-888X\(13\)72084-9](https://doi.org/10.1016/S1405-888X(13)72084-9)
- SAGARPA. 2015. Estudio de necesidades de innovación productiva para los cafeticultores del estado de Tabasco. 1-122 p. [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/346977/Cafeticultores\\_Ejecutivo.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/346977/Cafeticultores_Ejecutivo.pdf)
- SENASICA. 2019. Roya del caféto (*Hemileia vastatrix*). Dirección General de Sanidad Vegetal-Programa de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria. Ciudad de México. Última actualización: mayo de 2019. Ficha Técnica No. 40. 1-16 p.
- SINAVEF. 2013. Manual técnico para el manejo preventivo de la roya del caféto. México. 26 p. <http://www.royacafe.lanref.org.mx/Documentos/Manualtecnicoroya.pdf>
- Silva-Acuña R, Zambolim L and Alvarez-Venegas VH. 2002. Estrategias de control de la roya del caféto con la aplicación de fungicida protector y sistémico en viçosa, minas gerais, Brasil. *Bioagro* 14(2): 85-97. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=85714205>
- Shigueoka LH, Hiroshi-Sera G, Sera T, de Batista Fonseca IC, Junior VM, Andrazi E, Gimenez-Carvalho F, Gonçalves-Gardiano C and Carducci FC. 2014. Selection of Arabic coffee progenies with rust resistance. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 14(2): 88-93. <https://doi.org/10.1590/1984-70332014v14n2a16>
- Sparks TC, Hahn DR and Garizi NV. 2017. Natural products, their derivatives, mimics and synthetic equivalents: role in agrochemical discovery. *Pest management science* 73(4):700-715. <https://doi.org/10.1002/ps.4458>
- Várzea VM and Marques DV. 2005. Population variability of *Hemileia vastatrix* vs coffee durable resistance. In: Zambolin L, Zambolim, EM, Várzea VM. (Eds.) Durable Resistance of Coffee Leaf Rust. Editora Universidade Federal de Viçosa Brasil. 53-74 p.
- Villavicencio-Nieto MA and Pérez-Escandón BE. (2010). Plantas tradicionalmente usadas como plaguicidas en el Estado de Hidalgo, México. 30: 193-238. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1405-27682010000200012&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-27682010000200012&lng=es&tlng=es)
- Virginio-Filho EM and Astroga-Domian C. 2015. Prevención y control de la roya del café: manual de buenas prácticas para técnicos y facilitadores. 1°ed., Turrialba, C.R: CATIE. No. 131. 1-96p. [http://repositorio.bibliotecaorton.catie.ac.cr/bitstream/handle/11554/8186/Prevencion\\_y\\_control\\_de\\_la\\_roya\\_del\\_cafe.pdf](http://repositorio.bibliotecaorton.catie.ac.cr/bitstream/handle/11554/8186/Prevencion_y_control_de_la_roya_del_cafe.pdf)