

**UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y
ARTES DE CHIAPAS**

INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

T E S I S

**Potencial antifúngico de
extractos de Annonaceae Juss.
sobre el hongo de la roya del
café *Hemileia vastatrix* Berk &
Broome**

PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTA

Cristina Vázquez Ovando



Tuxtla Gutiérrez Chiapas

Marzo 2023

**UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y
ARTES DE CHIAPAS**

INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

T E S I S

**Potencial antifúngico de
extractos de Annonaceae Juss.
sobre el hongo de la roya del
café *Hemileia vastatrix* Berk &
Broome**

PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTA

Cristina Vázquez Ovando

Director

Dr. Iván de la Cruz Chacón
Laboratorio de Fisiología y Química Vegetal.
Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas

Asesores

Dra. Christian Anabí Riley Saldaña
Dra. Marisol Castro Moreno
Laboratorio de Fisiología y Química Vegetal.
Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas

Tuxtla Gutiérrez Chiapas

Marzo 2023





UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y ARTES DE CHIAPAS
SECRETARÍA GENERAL
DIRECCIÓN DE SERVICIOS ESCOLARES
DEPARTAMENTO DE CERTIFICACIÓN ESCOLAR
AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN

Lugar: Tuxtla Gutiérrez, Chiapas;
Fecha: 07 de marzo de 2023

C. Cristina Vázquez Ovando

Pasante del Programa Educativo de: Licenciatura en Biología

Realizado el análisis y revisión correspondiente a su trabajo recepcional denominado:

Potencial antifúngico de extractos de Annonaceae Juss. sobre el hongo de la roya del café

Hemileia vastatrix Berk & Broome

En la modalidad de: Tesis Profesional

Nos permitimos hacer de su conocimiento que esta Comisión Revisora considera que dicho documento reúne los requisitos y méritos necesarios para que proceda a la impresión correspondiente, y de esta manera se encuentre en condiciones de proceder con el trámite que le permita sustentar su Examen Profesional.

ATENTAMENTE

Revisores

Dra. Alma Rosa González Esquinca

M. en C. Ana Guadalupe Rocha Loredo

Dr. Iván de la Cruz Chacón

Firmas:

[Firma]
[Firma]
[Firma]

Ccp. Expediente

AGRADECIMIENTOS

Al **Doctor Iván de la Cruz Chacón**, mi director de tesis, quien me impartió clases en mi primer semestre y desde entonces supe que quería trabajar con usted, gracias por decirle si a este trabajo, por todo su apoyo, por compartirme sus conocimientos y tenerme paciencia, por las veces que se quedó a esperarme mientras contaba las uredosporas y me invito de su comida, gracias por ser un gran maestro y amigo.

A la **Doctora Christian Anabí Riley Saldaña** por todo su apoyo y sus correcciones en esta tesis, por estar pendiente de mis avances, por siempre buscar que todo sea más alegre en el laboratorio.

A la **Doctora Marisol Castro Moreno**, por su todo su apoyo y sus correcciones en la elaboración de esta tesis y compartirme de sus conocimientos.

A mis revisoras la **Maestra Ana Guadalupe Rocha Toledo**, y a la **doctora Alma Rosa González Esquinca** por el tiempo invertido al revisar esta tesis y compartir de sus conocimientos durante mi formación como bióloga.

A mis amigos y compañeros de generación, **Mónica Adriana Vazquez Gómez, Suleyma Guadalupe García Jiménez, Jhonatan Rogelio Chávez y Diego Alexis Morales**, por los amables intercambios de conocimientos, por los ánimos y los buenos momentos.

A **Carlos Adrián Ventura Lima**, por ayudarme a regar mis plantitas de café, por estar presente, escucharme y animarme cuando quería rendirme, gracias por todo tu apoyo y tus buenos consejos.

DEDICATORIAS

A **Dios** por mi vida y guiarme al lugar y a las personas indicadas, por mostrarme su amor a través de la biología.

A mis padres **José Vazquez Hernández** y **Elizabeth Ovando López**, por todo su apoyo sus consejos, su paciencia y todo su amor, gracias por guiar mis pasos, llevarme al campo y hacer de mi lo que soy, los amo.

A mis hermanos **Daniel Vazquez Ovando**, por apoyarme en todo momento, por siempre saber que decir, por llevarme al campo a distraerme cuando notabas que no podía continuar, no tengo palabras para agradecerte todo lo que has hecho por mí. A **Paulina, José** y **María Guadalupe** mis hermanos pequeños, por inspirarme siempre a ser una mejor persona, por todas sus ocurrencias que me hacen feliz, los guardo en mi corazón, me siento afortunada de tenerlos.

A **Bryan Gálvez Vazquez**, por llegar en el momento adecuado y enseñarme todas las formas de amar, por estar presente y apoyarme, por creer en mi incluso cuando yo no lo hago.

A mis hermosas princesas, **Emma Loisa** y **María José** por llenar mi corazón y hacerme muy feliz, y a su bella madre **Lulu López**. por permitirme ser parte de sus vidas.

A mí **Estrellita** por ser luz cuando todo estaba oscuro.

ÍNDICE

ÍNDICE DE CUADROS	III
ÍNDICE DE FIGURAS	III
RESUMEN	V
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	4
2.1. ASPECTOS GENERALES DEL CULTIVO DEL CAFETO.....	4
2.1.1. Características generales del género <i>Coffea</i> L.....	4
2.1. 2. Información Taxonómica.....	5
2.1.3. Importancia económica.....	5
2.1.4. Enfermedades del cafeto	6
2.2. ROYA DEL CAFÉ <i>Hemileia vastatrix</i> BERK & BROOME.....	8
2.2.1. Origen y distribución de la roya anaranjada.....	8
2.2.2. Generalidades de la roya.....	8
2.2.3. Información taxonómica	9
2.2.4. Biología de la roya.....	9
2.2.5. Ciclo de vida y proceso de infección.....	10
2.3. ANONÁCEAS DE ESTUDIO	12
2.3.1. Metabolitos secundarios de anonáceas	12
2.3.2. Alcaloides de anonáceas	14
2.3.3. <i>Annona macropropyylata</i> Donn. Sm	15
2.3.4. <i>Annona muricata</i> L.....	15
2.3.5. <i>Annona purpurea</i> Moc. & Sessé ex Dunal	16
2.3.6. <i>Annona reticulata</i> Linn.....	17
2.3.7. <i>Sapranthus microcarpus</i> (Donn. Sm.).....	17
2.3.8. <i>Sapranthus campechianus</i> (Kunth) Standl.....	18
III. ANTECEDENTES.....	21
3.1. EXTRACTOS DE LA FAMILIA ANNONACEAE CON ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA.....	21

3.2. EXTRACTOS VEGETALES CON ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA SOBRE <i>Hemileia vastatrix</i>	22
IV. OBJETIVOS	23
4.1 GENERAL.....	23
4.2 PARTICULARES	23
V. HIPÓTESIS.....	23
VI. MÉTODOS.....	24
6.1. RECOLECTA DE <i>Hemileia vastatrix</i>	24
6.2. ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE ANONÁCEAS.....	26
6.2.1 Extractos de anonáceas.....	26
6.2.2. Germinación de uredosporas. Ensayo modificado de Morales <i>et al.</i> , (2021) y García-Pérez <i>et al.</i> , (2021).....	26
6.2.3. Ensayo en plantas.....	27
6.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	28
VII. RESULTADOS	29
7.1. EFECTO DE LOS EXTRACTOS DE ANONÁCEAS SOBRE LA GERMINACIÓN DE UREDOSPORAS DE <i>Hemileia vastatrix</i>	29
7.2. Actividad de extractos de anonáceas en el control de <i>Hemileia vastatrix</i> en plántulas de <i>Coffea arabica</i>	33
7.2.1. Actividad de extractos de anonáceas sobre la germinación de uredosporas de <i>Hemileia vastatrix in vivo</i>	33
7.2.2. Actividad de extractos de anonáceas en el control de la roya (<i>Hemileia vastatrix</i>) en plántulas de <i>Coffea arabica</i>	36
VIII. DISCUSIÓN.....	42
IX. CONCLUSIONES.....	47
X. RECOMENDACIONES.....	48
XI. REFERENCIAS DOCUMENTALES.....	49

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Actividad antifúngica de las especies de anonáceas de estudio	18
Cuadro 2 Extractos tomados del acervo fitoquímico del Laboratorio de Fisiología y Química Vegetal.....	26
Cuadro 3. Análisis estadístico con la prueba de Mann-Whitn U.....	29

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Cultivo de café en ejido de Ocuilapa de Juárez municipio de Ocozocoautla. Fotografías: Vázquez-Ovando (2022).....	5
Figura 2. <i>Hemileia vastatrix</i> . uredosporas a 40X. Fotografías: Vázquez-Ovando (2022).	9
Figura 3. Hojas infectadas de <i>H. Vastratrix</i> . Fotografías: Vázquez-Ovando (2022).11	
Figura 4. Proceso de infección por <i>Hemileia vastatrix</i> (Thalinhos et al., 2007).	12
Figura 5. Alcaloides bencilisoquinólicos frecuentes en anonáceas (De-la-Cruz-Chacón et al., 2020b	15
Figura 6. Especies de estudio	20
Figura 7. Ocuilapa de Juárez municipio de Ocozocoautla de Espinoza Chiapas México (INEGI. 2021).....	24
Figura 8. Uredosporas germinadas y no germinadas con presencia de hifas del hongo <i>H. vastatrix</i> a 40X. Fotografías: Vázquez-Ovando (2022).	27
Figura 9. Pruebas <i>in vitro</i> , comparación de la germinación de uredosporas entre control y extracto.....	30
Figura 10. Comparación del potencial antifúngico de los extractos <i>Annona muricata</i> , <i>Sapranthus campechianus</i> , <i>Annona purpurea</i> , <i>Sapranthus microcarpus</i> y <i>Annona reticulata</i> contra <i>Hemileia vastatrix</i>	31
Figura 11. Pruebas control de la germinación de uredosporas a 40X A) germinación en agua B) germinación en metanol prueba. Fotografías: Vázquez-Ovando (2022).	31
Figura 12. Pruebas de germinación de uredosporas en los extractos a 40X. A) <i>Sapranthus campechianus</i> , B) <i>Annona muricata</i> , C) <i>Annona purpurea</i> , D) <i>Annona macrophyllata</i> , E) <i>Sapranthus microcarpus</i> , F) <i>Annona reticulata</i> . Fotografías: Vázquez-Ovando (2022).....	32
Figura 13 Germinación de uredosporas <i>in vivo</i> observado al microscopio a 10X, concentración 1mg.ml ¹ , A) control B) <i>Sapranthus microcarpus</i> C) <i>Annona reticulata</i> ,	

D) <i>Annona purpurea</i> . Concentración 3mg.ml ¹ E) <i>Annona reticulata</i> y F) <i>Sapranthus microcarpus</i> . Fotografías: Vázquez-Ovando (2022).	34
Figura 14. Germinación de uredosporas <i>in vivo</i> con extractos de anonáceas a 1mg.mL ⁻¹	35
Figura 15. Germinación de uredosporas <i>in vivo</i> con extractos de anonáceas a 3mg.mL ⁻¹	35
Figura 16 Porcentaje de área de las hojas contaminada con <i>Hemileia vastatrix</i> a los 30 días.	37
Figura 17. Porcentaje de área de las hojas contaminada de <i>Hemileia vastatrix</i> a los 40 días con aplicación de segunda dosis a los 30 días.	37
Figura 18. Hojas de <i>Coffea arabica</i> de pruebas <i>in vivo</i> a los 40 días de inoculación A) control con puntos cloróticos y B) <i>Annona purpurea</i> con punto cloróticos, C) <i>Annona reticulata</i> con puntos cloróticos y D) <i>Sapranthus microcarpus</i> con puntos cloróticos y con signos de esporulación. Fotografías: Vázquez-Ovando (2022). ...	38
Figura 19. Porcentaje de área de las hojas contaminada con <i>Hemileia vastatrix</i> entre primera y segunda dosis concentración de extracto de 1mg.ml ⁻¹	38
Figura 20. Porcentaje del área contaminada por <i>Hemileia vastatrix</i> a los 30 días.	39
Figura 21. Porcentaje de área contaminada por <i>Hemileia vastatrix</i> a los 40 días, con aplicación de segunda dosis.	40
Figura 22. Hojas de <i>Coffea arabica</i> de pruebas en vivo a los 40 días de inoculación A y B) control con lesiones esporulantes C) extracto alcaloidal de <i>Sapranthus microcarpus</i> con puntos cloróticos y con signos de esporulación y D) <i>Annona reticulata</i> con puntos cloróticos. Fotografías: Vázquez-Ovando (2022).	40
Figura 23. Porcentaje de área de las hojas contaminada con <i>Hemileia vastatrix</i> , entre la primera aplicación de extractos y segunda aplicación a los 30, concentración de extracto 3mg.ml ¹	41

RESUMEN

Las plantas producen metabolitos secundarios que suelen ser un medio de defensa al ataque de insectos y microorganismos. Estas moléculas representan una alternativa potencial para el manejo de enfermedades de cultivos. La familia Annonaceae biosintetiza metabolitos secundarios, entre ellos, alcaloides bencilisoquinolínicos con diversas y potentes actividades biológicas incluyendo propiedades antifúngicas. En el presente estudio se evaluó el potencial antifúngico *in vitro* e *in vivo* de los extractos alcaloidales de *Annona macrophyllata*, *A. muricata*, *A. purpurea*, *A. reticulata*, *Sapranthus microcarpus* y *S. campechianus* frente al hongo *Hemileia vastatrix* que provoca la enfermedad conocida como la roya del café (*Coffea arabica*). Esta es la primera vez que se estudia la actividad antifúngica de anonáceas sobre este fitopatógeno de relevancia agrícola.

De las seis anonáceas evaluadas, los extractos alcaloidales de *A. purpurea*, *S. microcarpus* y *A. reticulata* redujeron la germinación *in vitro* de las uredosporas de *H. vastatrix* a 3.7%, 7.9% y 9.8% respectivamente, seguidos de los extractos de *S. campechianus* y *A. muricata* que disminuyeron la germinación a 10.1% y 12.1% respectivamente sin diferencias significativas. En los ensayos *in vivo* (en plantas de café) los extractos a 1 mg.mL⁻¹ de *A. reticulata* y *S. microcarpus* provocaron una germinación de uredosporas de 3 a 3.9% casi tres o cuatro veces menos que el control, mientras que el extracto de *Annona purpurea* provocó casi el doble de la tasa de germinación que los otros (6.48% $p= 0.049$). El extracto de *A. reticulata* mostró mayor actividad inhibitoria en concentraciones más altas (3 mg.mL⁻¹) reduciendo la tasa de germinación a 0.39% ($p=0.02192$) mientras que *S. microcarpus* no mejoró su potencia, aunque si conservo su potencia inhibitoria (5.50%).

Los extractos alcaloidales de *A. purpurea*, *A. reticulata* y *S. microcarpus* mostraron capacidad para controlar parcialmente la manifestación de los síntomas de la enfermedad en las plantas de café, durante 40 días, las primeras manifestaciones de la enfermedad se observaron hasta los 25-30 días después de infestadas con el hongo. Las plantas que se les aplicó extracto a 1 mg.mL⁻¹ de *S.*

microcarpus y *A. purpurea* presentaron menor porcentaje de área afectada (0.22% y 0.24%), mientras que el extracto de *A. reticulata* presentó mayor área de lesiones foliares que los otros tratamientos ($p=0.0401$). Las plantas asperjadas con extractos a $3\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de *A. reticulata* y *S. microcarpus* después de 30 días de la aplicación no manifestaron lesiones de la enfermedad; solo después de 40 días se observaron lesiones de la enfermedad con porcentaje bajos de infección con extractos de *A. reticulata* (0.019%) y *S. microcarpus* (0.013%). No se encontraron diferencias entre el porcentaje de infección entre la primera y segunda aplicación.

La capacidad antifúngica de las anonáceas sobre *H. vastatrix* señala la importancia de conservar los recursos botánicos del estado de Chiapas ya que son una fuente de moléculas con posibles aplicaciones agrícolas en la resolución de problemas de infecciones fúngicas de cultivos de relevancia económica. En este estudio se demuestra que las anonáceas pueden ser, aunque incipiente una quimiodiversidad alternativa para el control de la roya del café.

Palabras clave: *Hemileia vastatrix*, Uredosporas, anonáceas.

I. INTRODUCCIÓN

Las plantas producen compuestos bioactivos debido a su capacidad para biosintetizar metabolitos secundarios que juegan un papel importante como medio de defensa al ataque de insectos, microorganismos y de adaptación a ambientes adversos (temperatura, humedad, intensidad de luz, sequía, entre otros) (Akula y Ravishankar, 2011). Son compuestos de bajo peso molecular (González-Esquinca, 2005) que se agrupan por su estructura y origen biosintético de forma muy general en tres categorías: terpenos, compuestos fenólicos y compuestos nitrogenados (Pérez-Alonso y Jiménez, 2011).

Estos metabolitos secundarios, ya sea de forma individual o en extractos (mezcla) representan una alternativa potencial para el manejo de enfermedades en sistemas con producción orgánica; varias investigaciones revelan su capacidad para el control de hongos fitopatógenos. Estas moléculas con propiedades fungicidas están contenidas en hojas, frutos, semillas, tallos, raíces y que extraídos con el método correcto y aplicados en dosis y tiempos indicados muestran efectos que permiten incluirlos en un programa de manejo de fitopatógenos (López *et al.*, 2009).

La familia Annonaceae comprende plantas distribuidas en regiones tropicales y subtropicales (González-Esquinca, 2005). De la Cruz *et al.*, (2016) señalan que para 2016 en la base de datos The Plant list había 2 106 anonáceas reconocidas agrupadas en 128 géneros, de los cuales en México hay 60 especies agrupadas en 12 géneros. Los géneros más representativos en número de especies son *Annona* (18), *Guatteria* (8), *Cymbopetalum* (8), *Steannonna* (7), *Desmopsis* (6) y *Sapranthus* (4). El estado de Chiapas alberga 9 géneros y 37 especies, nueve endémicas. Las anonáceas en el ámbito del metabolismo secundario se caracterizan por la biosíntesis de acetogeninas exclusivas y de alcaloides de los tipos bencilisoquinolínicos y beta-carbolínicos (González-Esquinca, 2016). A estos metabolitos se les ha comprobado varias actividades biológicas entre ellas, propiedades antifúngicas (González-Esquinca, 2005; Torres *et al.*, 2007), tales antecedentes y su diversidad en México, permiten intuir que las

especies de anonáceas pudieran representar una alternativa en la búsqueda de moléculas que inhiban fitopatógenos responsables de enfermedades de cultivos relevantes en el sector agrícola.

El café es un cultivo importante en el comercio internacional, una reducción en su producción impacta en las economías dependientes de sus exportaciones (APS, 2021). Uno de sus problemas fitosanitarios es la enfermedad conocida como la roya del café, quizá la más destructiva, provocada por *Hemileia vastatrix* Berk & Broome, un hongo biotrófo que ocasiona la reducción de su capacidad fotosintética provocando la caída prematura de las hojas y en grado severo la muerte de ramas o de los árboles (Lam, 2019; APS, 2021).

Como parte de las acciones de manejo químico de la enfermedad, se aplican fungicidas inorgánicos o sintéticos ya sea de manera preventiva con el oxiclورو de cobre o como una acción curativa con ciproconazol, azoxistrobin y triadimefon (SENASICA, 2016). Sin embargo, con el tiempo, el hongo puede volverse resistente a las moléculas de los fungicidas. Además, algunos de esos fungicidas orgánicos incluyen cobre y azufre y su uso inadecuado puede dañar a la planta. Otros son nocivos para la flora, fauna y humanos que acompañan a este cultivo. La búsqueda de las formas para controlar, eliminar o combatir a la roya del café es continua, hasta el momento se ha logrado controlar con fungicidas o suplir con variedades de café resistentes a la roya.

Una alternativa a estos fungicidas tradicionales es la aplicación de metabolitos secundarios vegetales, entre ellos quizá los metabolitos de la familia Annonaceae. Las revisiones sobre las propiedades antifúngicas de la familia Annonaceae realizadas por De la Cruz-Chacón y González-Esquinca (2015) y Rodríguez-Chong (2020) señalan que varios metabolitos secundarios de forma individual o en forma de extractos han sido reportados con actividad inhibitoria en alrededor de 30 especies de fitopatógenos, entre ellos sobre *Puccinia recondita* considerada técnicamente una roya (roya del trigo) (Dang *et al.* 2011); es decir un parásito obligado de su planta hospedera (Arez, 2015).

De forma particular, en el Laboratorio de Fisiología y Química Vegetal del Instituto de Ciencias Biológicas de la UNICACH se ha detectado que varias especies del género *Annona* y *Sapranthus* de la familia Annonaceae que habitan en los ecosistemas del estado de Chiapas producen metabolitos antifúngicos, sin embargo, no se ha explorado su capacidad para inhibir al fitopatógeno *H. vastatrix*.

Ello permitió plantear las siguientes preguntas sobre los extractos de metabolitos secundarios, en particular de alcaloides de Annonaceae: ¿son capaces de controlar la germinación de esporas *in vitro* y el crecimiento del hongo *H. vastatrix* en plantas de cafeto? si ¿la potencia antifúngica es diferente entre las especies de Annonaceae? y de forma particular, ¿qué tan potente y duradera es esta actividad?

Por lo que en este estudio se determinó el potencial antifúngico de extractos de alcaloides de *Annona macrophyllata*, *A. muricata*, *A. purpurea*, *A. reticulata*, *Sapranthus microcarpus* y *S. campechianus* frente a *H vastatrix*, como inicio de una posible solución en esta problemática agrícola, lo cual aporta evidencia para la conservación de las especies nativas fuentes de moléculas fungicidas.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. ASPECTOS GENERALES DEL CULTIVO DEL CAFETO

2.1.1. Características generales del género *Coffea* L

El arbusto de café es originario de las selvas tropicales de la moderna Etiopía, antes Abisinia en África Oriental. Al principio fue cultivado por los árabes a partir del siglo X. Se introdujo a Europa entre los siglos XV y XVI a través del puerto de Moka, en Arabia (Canet *et al.*, 2016 y INIFAP, S. f.). En 1720 se trajo a América y las primeras plantaciones se establecieron en las Guayanas Francesa y Holandesa. A México llegó en el año de 1796, extendiéndose a 12 estados que actualmente cultivan café (INIFAP, S.f.) Se convirtió en un cultivo de importancia económica y su comercio y exportación han sido elemento fundamental de la historia de los países de América Latina. Hoy más de 80 países lo cultivan variando por sus diferentes tipos de calidad y poco más de 50 países lo exportan. Varios de los mejores cafés del mundo se cultivan en las altitudes medias (1 350 a 1 850 msnm) desde Perú a México (Canet *et al.*, 2016). La superficie nacional es de 750 000 has cuya producción varía de 4 a 5 millones de sacos de 60 kg dependiendo el ciclo (INIFAP, S.f.)

El café pertenece a la familia de las Rubiáceas (Rubiaceae), grupo que engloba unos 500 géneros y más de 6 000 especies, la mayoría árboles y arbustos tropicales. Dentro del género *Coffea* hay más de 100 especies. Esta planta puede medir entre 4 y 10 m de altura, sus hojas son elípticas, acabadas en punta y aparecen por pares. Presentan peciolos cortos y pequeñas estipulas, las hojas pueden ser también de distintos colores: verde lima, verde oscuro, bronce o con matices purpúreos. Las flores aparecen en inflorescencias, son blancas y fragantes y permanecen abiertas pocos días. Seis o siete meses después de que aparece la flor se desarrollan los frutos tipo drupa, con epicarpio carnoso y doble semilla, cambian de verde a rojo. Se propaga sexualmente mediante el empleo de semillas y asexualmente por estacas, injertos de yemas y mediante el empleo de tejidos en *in vitro* (Rojo-Jiménez y Pérez-Urria, 2015 y Calzada-Roviroso, 2017).

2.1. 2. Información Taxonómica

Reino Plantae

División Magnoliophyta

Subdivisión Angiospermae

Orden Gentianales Juss. ex Bercht. & J.Presl

Familia Rubiaceae Juss.

Género *Coffea* L.

Especies *Coffea arabica*, *C. conephora*, etc.

(WFO, 2022)



Figura 1 Cultivo de café en ejido de Ocuilapa de Juárez municipio de Ocozocoautla.
Fotografías: Vázquez-Ovando (2022).

2.1.3. Importancia económica.

Por el valor que representa, el café es uno de los principales productos agrícolas, con un peso importante en el comercio mundial, llegando a generar ingresos anuales superiores a los 15 mil millones de dólares para los países exportadores y dando ocupación directa e indirecta a poco más de 20 millones de personas dedicadas al cultivo, transformación, procesamiento y comercialización del producto en todo el mundo (CEFP, 2021).

En las últimas décadas se ha visto un crecimiento en el comercio internacional teniendo gran impacto en los países pobres, así como en las mayores economías del planeta (IDEAS, 2006). En México, el cultivo y consumo del café como bebida data de la última década del siglo XVIII; a más de 200 años de estar presente en la agricultura nacional, es considerado uno de los cultivos de mayor importancia económica, sociocultural y ambiental, la caficultura se considera una actividad estratégica fundamental, debido a que permite la integración de cadenas productivas, la generación de divisas y empleos (Palomares-Reyes *et al.*, 2012). La producción del café involucra a más de 282 mil productores entre los que se encuentran minifundistas e indígenas, agrupados en 16 organizaciones de carácter local y regional (CEFP, 2021).

México produce café de excelente calidad, debido a que su topografía, altura, climas y suelos permiten cultivar y producir variedades clasificadas dentro de las mejores del mundo. Como productor de café México ocupa el quinto lugar a nivel mundial, después de Brasil, Colombia, Indonesia y Vietnam. México es el primer productor mundial de café orgánico, y uno de los primeros en café "Gourmet". El café se produce sobre una superficie de 761 mil hectáreas en doce estados de la República Mexicana, situados en la parte centro-sur del país. Estos estados son: Chiapas, Colima, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Nayarit, Oaxaca, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Tabasco y Veracruz (CEFP, 2021).

2.1.4. Enfermedades del cafeto

Tres de las enfermedades más importantes son: 1) la traqueomicosis provocada por el hongo *Fusarium xylarioides* (Ascomycota, Nectriaceae), su gravedad radica en que taponan los haces vasculares del árbol, lo que provoca su muerte a los pocos meses. 2) La antracnosis, afecta a los frutos verdes y tiene por agente causal a hongos del género *Colletotrichum* (Ascomycota, Glomerellaceae), como *C. coffeanum*, *C. kahawae* y *C. gloeosporioides*. Este patógeno requiere un exigente control químico y aún no se conocen cultivares resistentes a todos los aislamientos del patógeno (Rojo-Jiménez y Pérez-Urria, 2015) y 3) la roya, cuyo agente causal es *Hemileia vastatrix*, provoca la caída prematura de hojas propiciando la reducción

de la capacidad fotosintética, así como el debilitamiento de árboles enfermos y en infecciones severas puede ocasionar la muerte del árbol (APS, 2021).

Otras de las enfermedades del café son el ojo de gallo también conocido como “gotera”, provocada por *Mycena citricolor* (Basidiomycota, Tricholomataceae) afecta las hojas y frutos, presentando manchas circulares de color pardo oscuro, que cambian a un color gris claro conforme el hongo se va desarrollando (Canet-Brenes *et al.*, 2016). La Mancha de hierro provocada por el hongo *Cercospora coffeicola* se manifiesta por la presencia de manchas circulares aproximadamente de un centímetro de diámetro, de un color pardo-claro o café oscuro, con un centro blanco ceniciento, exteriormente la lesión está circundada por un anillo de color amarillento; ataca al follaje y al fruto, la necrosis estimula la caída de hojas, resultando en una defoliación general de la planta (Canet-Brenes *et al.*, 2016).

Mal de hilachas causada por *Corticium koleroga* (Basidiomycota, Corticiaceae), causa en las hojas, ramas y frutos la formación de una película en forma de “telaraña” de color blanco grisáceo, reconocible en el envés de la hoja, este micelio del hongo cubre casi totalmente las hojas que una vez atacadas se secan desde la base y se caen de las ramas, colgando de los filamentos del hongo. Los granos de café se secan y caen y los tejidos de las ramas quedan expuestos y son infectados por otros parásitos (Canet-Brenes *et al.*, 2016)

Respecto a las plagas, se encuentran insectos del orden Coleoptera, Lepidoptera, Isoptera e Himenoptera, los que perforan la madera del cafeto, dañando ramas y tallos, son: *Leucoptera meyriki*, *L. coffeellum*, *Ascotis selenaria*, *Ancistrosoma rufipes*, *Platycoelia valida* y *Idiarthron subquadratum*. Los insectos que comúnmente atacan raíces suelen ser grillos, termitas, hemípteros y larvas de coleópteros, lepidópteros y dípteros como las especies de *Diaprepes famelicus*, *Neochavesia caldasiae* y *Pheidole megacephala*, y géneros como *Dismicoccus*, *Quesada*, *Carineta*, *Fidicinoides*, *Solenopsis*, *Acropyga* y *Gonocephalum*, la plaga más grave es la que afectan a los frutos, la broca del café, causada por *Hypothenemus hampei* (Rojo-Jiménez y Pérez-Urria, 2015)

2.2. ROYA DEL CAFÉ *Hemileia vastatrix* BERK & BROOME

2.2.1. Origen y distribución de la roya anaranjada

La "enfermedad de la hoja del café" fue reportada por primera vez en especies silvestres de *Coffea* por un explorador inglés, en la región del Lago Victoria de África Oriental en 1861. En 1869, el micólogo británico HJ Berkeley y su ayudante, el Sr. Broome, reportan en el "Gardener's Chronicle," al hongo *Hemileia vastatrix* que encontraron asociado con la enfermedad en unas hojas secas de café, enviadas desde Ceilán (hoy Sri Lanka) (Arneson y Ordóñez, 2011), lugar donde prácticamente devastó la producción de ese país. Desde entonces se ha ido dispersando a otras partes del mundo. En el continente americano, fue reportada en enero de 1970, cerca de Itabuna Brasil, toda la cafecultura continental entró en temor por los terribles efectos de esta enfermedad (Hernández-Martínez y Velázquez-Premio, 2016). La repentina aparición de la enfermedad y su rápida expansión en una región tan alejada de los centros de origen y de diversificación del cafeto, desató una gran polémica sobre su origen (Avelino y Galileo, 2014).

La roya de cafeto se encuentra distribuida de manera cosmopolita en todas las zonas donde se cultiva café. Se conoce como único hospedante al género *Coffea* principalmente a café arábica (*Coffea arabica*) y café robusto (*Coffea canephora*), y posiblemente a otras 25 especies más, aún no se conocen hospedantes alternos. En México es una plaga clasificada como de importancia económica (Barquero-Miranda, 2013).

2.2.2. Generalidades de la roya

Hemileia vastatrix es el nombre científico de la roya del Cafeto, la palabra *vastatrix*, deriva del latín *vastare* o *vastator* que significa devastador y *hemileia* (mitad lisa) por la pared de las esporas que tienen la mitad "lisa" (Hernández-Martínez y Velázquez-Premio, 2016). *H. vastatrix*, es un hongo que pertenece a la familia Puccineaceae, orden Uredinales, clase Basidiomycetes. Todos los hongos pertenecientes a este orden son parásitos obligados, desarrollados únicamente en tejido vivo de su planta hospedera, en este caso las hojas del cafeto (Barquero-Miranda, 2013).

2.2.3. Información taxonómica

Nombre científico: *Hemileia vastatrix* Berk. y Broome, 1869 (Figura 2)

Sinónimos: *Wardia vastatrix* J.F. Hennen y MM Hennen

Nombres comunes: Roya del cafeto

Reino: Fungi

Phylum: Basidiomycota

Clase: Pucciniomycetes

Orden: Pucciniales

Familia: Mikronegeriaceae.

Género: *Hemileia*.

Especie: *Hemileia vastatrix*

Obtenido de Index Fungorum (2022)

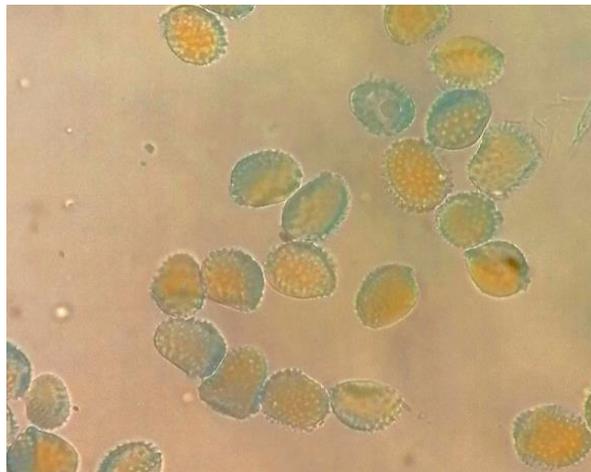


Figura 2. *Hemileia vastatrix*. uredosporas a 40X. Fotografías: Vázquez-Ovando (2022).

2.2.4. Biología de la roya

Hemileia vastatrix existe principalmente en estado dicariótico (con pares de núcleos haploides que se dividen en tándem), con micelio que absorbe nutrientes ramificándose intercelularmente dentro de las hojas de su hospedero. Los racimos de pedicelos cortos sobresalen a través de los estomas en el envés de las hojas portando urediniosporas dicarióticas. Ocasionalmente, hacia el final de la

temporada, bajo condiciones frescas y secas, se producen teliosporas que aparecen entre las urediniosporas en las hojas más viejas aún adheridas a la planta. Después de la cariogamia y meiosis, las teliosporas germinan para producir basidios, cada uno de los cuales forma cuatro basidiosporas haploides (Arneson y Ordóñez, 2011).

2.2.5. Ciclo de vida y proceso de infección

Su ciclo de vida inicia cuando una pequeña espora de la roya llega al envés de la hoja del cafeto (Figura 4) esta espora sólo germina cuando hay la humedad adecuada y la temperatura del aire está entre 15 y 28 grados centígrados. Entonces el hongo infecta a la planta y se establece dentro de ella para alimentarse (Martínez y Velázquez-Premio, 2016).

La adhesión al hospedero es un paso esencial en el establecimiento exitoso del fitoparásito, después de la formación del apresorio, el hongo penetra a través de los estomas, formando una hifa de penetración que crece en cámara la subestomática (Figura 4 ·A-C), estas hifas producen dos gruesas ramas laterales parecidas a un ancla, cada rama lateral del anclaje se diferencia en una célula madre haustorial (HMC) que da lugar a un haustorio, que infecta principalmente las células subsidiarias estomáticas (Figura 4D) el hongo continúa formando más hifas intercelulares, incluyendo HMCs, y por ello un gran número de haustorios en las células en la parénquima e incluso de la dermis superior (Figura 4-G). Las hifas invaden las cavidades subsomáticas y se entrelazan, los soros de las urediniosporas sobresalen a través de los estomas en forma de ramo (Thalinhas *et al.*, 2007).

En las hojas se observa la aparición de pequeñas lesiones o manchas redondas, color amarillo pálido, de 1 a 3 milímetros de diámetro en las superficies superiores de las hojas (Figura 3-A) (Martínez y Velázquez-Premio, 2016). alcanzando los 2 cm de diámetro, tomando un color naranja, la superficie se vuelve polvosa (Figura 3-B), el hongo esporula a través de los estomas en lugar de romper la epidermis (Arneson y Ordóñez, 2011). Si existen muchas lesiones, manchas, estas crecen hasta unirse unas con otras cubriendo toda la hoja y provocando su

caída (Barquero-Miranda, 2013). Posteriormente las esporas pueden ser dispersadas por el aire, agua, en la ropa de los productores y en ocasiones también por animales, para finalmente llegar a otra planta e infectarla y así se completa el ciclo (Hernández-Martínez y Velázquez-Premio, 2016). El polvillo en el envés de las hojas puede ser de color rojo-anaranjado a amarillo-naranja, y hay una variación considerable de una región a otra (Arneson y Ordóñez, 2011).

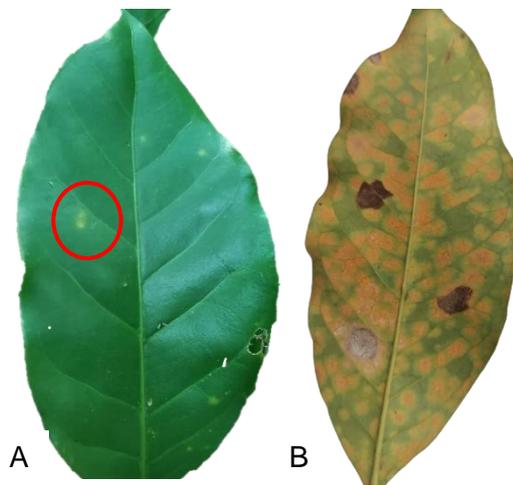


Figura 3. Hojas infectadas de *Hemileia vastratix* A) primeros síntomas observables, manchas amarillas y B) superficie de la hoja con presencia en polvosa de roya anaranjada. Fotografías: Vázquez-Ovando (2022).

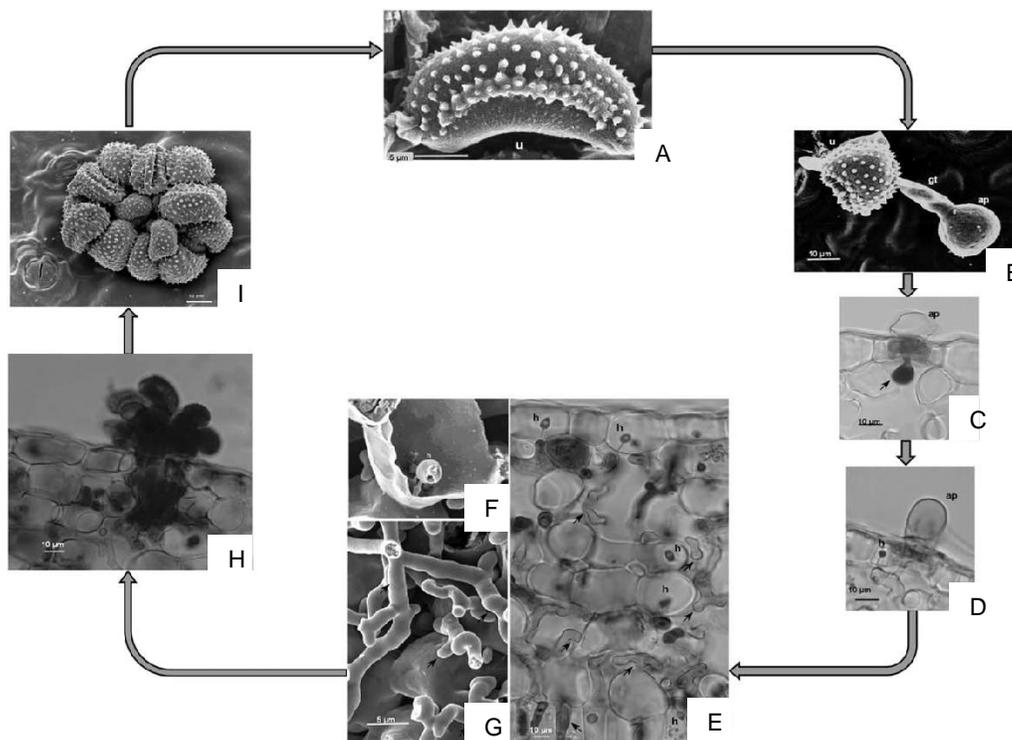


Figura 4. Proceso de infección por *Hemileia vastatrix*. (A) Urediniospora (B) Urediniospora germinada (u) con tubo germinativo (gt) y apresorio (ap) sobre estomas en la superficie inferior de la hoja de café (C) Apresorio (ap) sobre estomas e hifa de penetración (D) Apresorio (ap) sobre estomas e hifa intercelular con un haustorio (h) dentro de células epidérmicas y mesófilas, 20 días después de la inoculación, (F) Haustorium (h) dentro de una esponjosa célula de parénquima célula de parénquima, 20 dai, SEM. (G) Hifas intercelulares (flechas) en el parénquima esponjoso (H) Sorum Urediniospórico que sobresale a través de los estomas en forma de ramo, (I) Sorum Urediniospórico (Thalinhas *et al.*, 2007).

2.3. ANONÁCEAS DE ESTUDIO

2.3.1. Metabolitos secundarios de anonáceas

Annonaceae es una familia principalmente pantropical, son Angiospermas que tienen características arcaicas, tales como flores primitivas con número indefinido de partes florales libres, estambres dispuestos en espiral, carpelos libres, entre otros rasgos principales (León, 2007), es del Orden Magnoliales, contribuye significativamente a la diversidad de árboles en las selvas tropicales, siendo evolutiva, ecológica y económicamente muy importante (Vidal-Lezama *et al.*, 2018), la familia alberga cerca de 2,500 especies en 140 géneros (Chatrou, 1999) de los

cuales De-la-Cruz-Chacón *et al.*, (2016) menciona que solo son reconocidos 2,106 especies agrupadas en 128 géneros.

Las Anonáceas, como todos los vegetales, poseen rutas metabólicas que forman compuestos peculiares, por lo general de bajo peso molecular, llamados metabolitos secundarios (MS), desde el punto de vista biológico, se sabe que intervienen en los mecanismos de defensa de las plantas, que interrelacionan con el ambiente en fenómenos de alelopatía y que participan en la fijación del nitrógeno entre otros (González-Esquinca y De-la-Cruz-Chacón, 2019).

Las anonáceas se caracterizan por la diversidad de alcaloides y de acetogeninas y además de estos metabolitos producen aceites esenciales, galactomananos, flavonas, terpenos, flavinas, glucósidos cianogenéticos y heterociclos de nitrógeno no alcaloidales (González-Esquinca, 2005). Varios de estos compuestos son tóxicos contra bacterias, hongos y herbívoros y aunque sus funciones en la especie que los produce son desconocidas, en su mayoría se infiere que les permite defenderse de sus enemigos incluyendo a los hongos patógenos, ello es un indicativo de que las moléculas de anonáceas son prometedoras para su combate (Castro-Moreno *et al.*, 2020). En los últimos años ha destacado el potencial biotecnológico de los MS de las anonáceas, ya que poseen actividad antitumoral, antiparasitaria, antifúngica, antibacteriana y citotóxica (Vidal Hernández *et al.*, 2015).

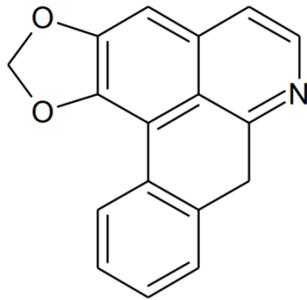
Algunas moléculas sobresalientes de esta familia de plantas, son los alcaloides bencilisoquinolínicos anonaina y liriodenina, quizá los alcaloides más abundantes y los de mayor presencia en la familia, aunque no se limitan a ellas. Otras de las moléculas promisorias son rolliniastatina-2 y la herradurina, pertenecen estructuralmente a un grupo de policétidos nombrados acetogeninas de anonáceas (De-la-Cruz-Chacón *et al.*, 2020).

2.3.2. Alcaloides de anonáceas

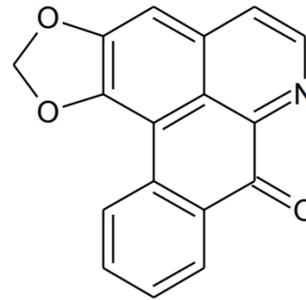
Los alcaloides constituyen el grupo de sustancias vegetales secundarias más representativo, numeroso y diverso (González-Esquinca, 2005).

Las anonáceas producen numerosos alcaloides cuya biosíntesis proviene de los aminoácidos tirosina y triptófano. Los más numerosos y diversos son los que provienen de la tirosina y que incluyen básicamente a los alcaloides bencilisoquinolínicos (ABI), biogenéticamente están emparentados con la morfina de las papaveráceas. La variedad de ABI comprende a las aporfinas, oxoaporfinas, proteberberinas, fenantrenos y bis-bencilisoquinolínico. Un tipo de alcaloides raro, limitado a la familia, son las azafluorenonas, que se supone podría originarse a partir de oxoaporfinas debido a la semejanza y a la concurrencia de ambos compuestos, también se ha dicho que podrían formarse en la ruta de los policétidos o de algún intermediario del ácido shiquímico enlazado al ácido glutámico (De-la-Cruz-Chacón y González-Esquinca, 2015). Se ha reportado la presencia de más de 934 alcaloides bencilisoquinolinicos estos metabolitos han sido aislados de diferentes órganos y tejidos de plantas adultas, y hasta donde se ha podido deducir, la ruta metabólica se expresa durante todas las etapas de la vida de la planta (Riley-Saldalña *et al.*, 2017).

De entre los alcaloides se encuentra la liriodenina, una oxoaporfina que inhibe a más de 20 fitopatógenos, principalmente hongos y bacterias, la actividad fungicida de este metabolito ha sido inclusive comprobada *in vivo* en enfermedades de leguminosas causadas por *Botrytis fabae*, *Helminthosporium teres* y *Pyricularia orizae* (De-la-Cruz *et al.*, 2020a).



Anonaína (aporfina)



Liriodenina (oxoaporfina)

Figura 5. Alcaloides bencilisoquinólicos frecuentes en anonáceas (De-la-Cruz-Chacón *et al.*, 2020b)

2.3.3. *Annona macropropyllum* Donn. Sm

Annona macropropyllum (*A. diversifolia*) (Figura 6-C) es conocida como papausa o ilama es una especie cuyo origen puede ser México o Centroamérica (Ballesteros *et al.*, 2010), produce frutos agradables al paladar humano y biosíntetiza MS con una riqueza estructural diversa (De-la-Cruz-Chacón y González-Esquinca, 2016).

Ha sido ampliamente estudiada por la presencia de sus moléculas biológicamente activas, como alcaloides, acetogeninas, aceites esenciales entre otros metabolitos secundarios (Orozco-Castillo *et al.*, 2016). Se ha comprobado su actividad para inhibir hongos fitopatógenos como *Aspergillus glaucus*, *Rhizopus stolonifer*, *Colletotrichum gloesporioides* y *Moniliophthora roreri* (Cuadro 1) (De-la-Cruz-Chacón *et al.*, 2020b).

2.3.4. *Annona muricata* L

El guanábano (*Annona muricata* L; Figura 6-A) se encuentra dispersa tanto en forma silvestre, como cultivada en las Antillas, el Sur de México, Brasil, y las Islas del Pacífico (Yamarte *et al.*, 2006), es un árbol pequeño muy extendido y tiene su origen en América Central, es una de las especies comestibles más importantes por su

sabor y aroma agradable, ya sea como fruta fresca o procesada (Ramírez-Méndez, *et al.*, 2012).

Se han identificado y aislado más de 200 compuestos químicos de esta planta, con diferentes actividades biológicas, estos metabolitos se encuentran presente en los frutos, cortezas y hojas, los más numerosos son los alcaloides, fenoles y acetogeninas (Coria-Téllez *et al.*, 2018., Arias-Navarro y Bueno-Durán, 2020). Diferentes extractos de las hojas de *A. muricata* han sido evaluados en estudios *in vitro* para identificar su potencial bioactivo, entre los fitopatógenos que son inhibidos por esta especie se encuentra, *Penicillium spp*, *Aspergillus niger*, *Colletotrichum gloeosporioides* (Arias-Navarro y Bueno-Durán, 2020) *Moniliophthora roreri* (De-la-Cruz-Chacón *et al.*, 2020b), *Aspergillus fumigatus*, *Alternaria solani* y *Colletotrichum capsici* (Cuadro 1) (De-la-Cruz-Chacón y González-Esquinca, 2015), por lo cual, *A. muricata* es considerada una fuente de metabolitos secundarios que pueden ser utilizados para el desarrollo de nuevos biofungicidas (Arias-Navarro y Bueno-Durán, 2020).

2.3.5. *Annona purpurea* Moc. & Sessé ex Dunal

Es una especie arbórea que habita en selvas bajas y medianas (Castro-Moreno *et al.*, 2020), nativa de Mesoamérica, es común en tierras bajas costeras del sur de México, Panamá, Colombia y Venezuela (Vidal-Lezama *et al.*, 2020) se encuentra en estado silvestre o cultivada en huertos familiares, sus frutos son comestibles y con propiedades medicinales. En Chiapas se conoce como chincuya y se vende en los mercados locales como fruta de temporada (Luna-Cazáres y González-Esquinca, 2015).

Annona purpurea (Figura 6-D) produce metabolitos secundarios con probada actividad biológica sobre hongos por lo que los estudios de sus compuestos tienen amplio potencial (Castro-Moreno *et al.*, 2020). De las hojas, tallos y semillas se han aislado hasta hoy 44 alcaloides de diversos tipos químicos. Algunos de ellos tienen importancia farmacológica, entre ellos efecto ansiolítico sobre el sistema nervioso central o antimicrobiano contra bacterias y hongos entre los que se reportan

Candida albicans (Luna-Cazáres y González-Esquinca, 2015), *Curvularia lunata* (Castro-Moreno *et al.*, 2020) y *Fusarium solani* (Santos y Ordas, 2017).

2.3.6. *Annona reticulata* Linn

Annona reticulata (*A. lutencens*) (Figura 6-E) es un árbol del bosque tropical, caducifolio es nativo de México a Panamá, Antillas y Suramérica (Barrance *et al.*, 2003) es relativamente abundante en México y sus frutos son comestible (Martínez-Velarde y Fonseca, 2017).

Se han identificado metabolitos en diferentes tejidos, la corteza del tallo contiene taninos, alcaloides y compuestos fenólicos. Las hojas contienen alcaloides, aminoácidos, esteroides, flavonoides, taninos, glucósidos y fenoles. La raíz tiene acetogeninas, alcaloides, flavonoides y taninos (Jamkhande y Wattamwar, 2015).

Entre los hongos que inhibe esta especie se encuentra *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Candida blanki* (Jamkhande *et al.*, 2016) y *Alternaria* (Cuadro 1) (De-la-Cruz-Chacón y González-Esquinca, 2015) proporcionando evidencia de que la planta está provista de numerosos constituyentes que podrían ser fuentes potenciales de agentes antifúngicos (Jamkhande *et al.*, 2016).

2.3.7. *Sapranthus microcarpus* (Donn. Sm.)

Sapranthus microcarpus (Figura 6-B) se distribuye en México, El Salvador, Guatemala, y Honduras (Schatz *et al.*, 2018), es una especie del bosque tropical caducifolio y bosque tropical subcaducifolio (Martínez-Velarde y Fonseca, 2017); de esta especie en particular, se conoce muy poco de la presencia de metabolitos secundarios, sin embargo, en los tejidos de su raíz se obtuvieron extractos de alcaloides con actividad antifúngica frente a los fitopatógenos *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici*, *Curvularia lunata* (De-la-Cruz-Chacon *et al.*, 2019), *Aspergillus glaucus*, *Rhizopus stolonifer* y *Moniliophthora roreri* (De-la-Cruz-Chacón *et al.*, 2015) (Cuadro 1).

2.3.8. *Sapranthus campechianus* (Kunth) Standl

Sapranthus campechianus (Figura 6-F) se distribuye en México, Belice, Guatemala y Honduras. Habita en bosques bajos, secos y semicaducifolios (Schatz *et al.*, 2018) se ha reportado que los alcaloides de raíces y tallos inhiben el crecimiento de *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium oxysporum* y *Moniliophthora roreri*, en un rango de 14 a 45%, y que la liriodenina inhibe también a los tres organismos mencionados, superando la actividad del fungicida comercial.

Cuadro 1. Actividad antifúngica de las especies de anonáceas de estudio

Especie	Tejido	Extracto	Fitopatógeno	% inhibición
<i>Annona muricata.</i>	Hoja	MeOH	<i>Penicillium spp</i> ¹	66.2
			<i>Aspergillus niger</i> ¹	14.03
			<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> ¹	27.6
			<i>Pestalotiopsis sp</i>	38
			<i>Aspergillus fumigatum</i> ⁵	75
			<i>Fusarium solani</i> ⁵	100
	Tallo	MeOH	<i>Moniliophthora roreri</i> ³	48
	Hoja	H2O	<i>Alternaria sp</i> ⁵	78
<i>Annona purpurea</i>	Raíz	Hex	<i>Curvularia lunata</i> ²	15-23
<i>Annona macrophyllata</i>	Tallo	Hex	<i>Aspergillus glaucus</i> ³	40
		MeOH	<i>Aspergillus glaucus</i> ³	80
	Hoja	MeOH	<i>Aspergillus glaucus</i> ³	50
	Tallo	Hex	<i>Rhizopus stolonifer</i> ³	35
		MeOH	<i>Rhizopus stolonifer</i> ³	80
	Hoja	MeOH	<i>Rhizopus stolonifer</i> ³	50
	Tallo	MeOH	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> ³	60
			<i>Moniliophthora roreri</i> ³	39
	Raíz	Alcaloides	<i>Aspergillus Glaucus</i> ³	89
			<i>Rhizopus stolonifer</i> ³	82

S. campechianus	Tallo	Hexanico	<i>Aspergillus glaucus</i> ⁶	50
			<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> ⁶	49
	Hoja	Hexanico	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> ⁶	30
	Tallo	MeOH	<i>Aspergillus glaucus</i> ⁶	60
	Hoja	MeOH	<i>Aspergillus glaucus</i> ⁶	60
	Hoja	MeOH	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> ⁶	40
	Tallo	MeOH	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> ⁶	45
	Tallo	MeOH	<i>Moniliophthora roreri</i> ⁶	38
S microcarpus	Raíz	MeOH	<i>Moniliophthora roreri</i> ⁵	62
			<i>Aspergillus glaucus</i> ⁵	38
			<i>Rhizopus stolonifer</i> ⁵	60
	Tallo	MeOH	<i>Aspergillus glaucus</i> ⁵	13
			<i>Rhizopus stolonifer</i> ⁵	24
			<i>Moniliophthora roreri</i> ⁵	23
	Hoja	MeOH	<i>Aspergillus glaucus</i> ⁵	18
			<i>Rhizopus stolonifer</i> ⁵	29
			<i>Moniliophthora roreri</i> ⁵	42
Anona reticulata	Hoja	H ₂ O	<i>Alternaria spp</i> ⁵	15

(¹Arias-Navarro y Bueno-Durán, 2020., ²Castro-Moreno et al., 2020., ³De-la-Cruz-Chacón et al., 2020b., ⁴De-la-Cruz-Chacon et al., 2019., ⁵De-la-Cruz-Chacón y González-Esquinca, 2015 y ⁶Schatz et al., 2018).

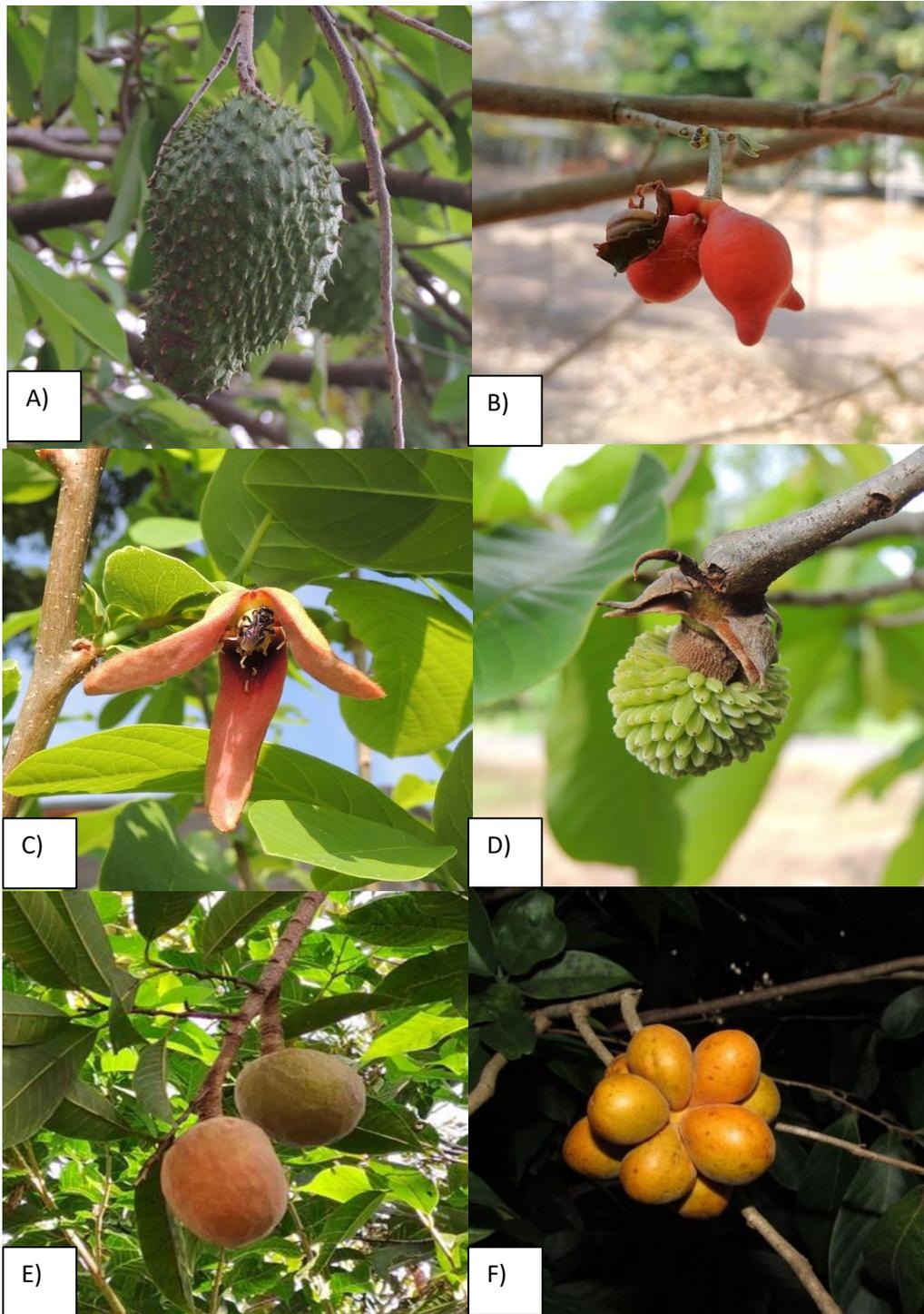


Figura 6. Especies de estudio, A) *Annona muricata* (Laboratorio de Fisiología y Química Vegetal), B) *Sapranthus microcarpus* (Vazquez-Ovando, 2022) C) *Annona Macrophyllata*, D) *Annona purpurea* (Laboratorio de Fisiología y Química Vegetal) E) *Annona reticulata* y F) *Sapranthus campechianus* (GBIF).

III. ANTECEDENTES

3.1. EXTRACTOS DE LA FAMILIA ANNONACEAE CON ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA

Las actividades inhibitorias de extractos y compuestos de la familia Annonaceae para el fitopatógeno del café *Hemileia vastatrix* son desconocidas. Sin embargo, en una revisión sobre la inhibición del crecimiento de hongos fitopatógenos, por metabolitos secundarios de anonáceas realizados por De-la-Cruz-Chacón y González-Esquinca (2015) y Rodríguez-Chong (2020), se reportan 23 especies de hongos que han sido inhibidos por extractos o compuestos, entre ellos se encuentran *Alternaria alternata*, *A. solani*, *Aspergillus flavipes*, *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. glaucus*, *A. niger*, *A. ochraceus*, *A. versicolor*, *Blumeria graminis*, *Botrytis cinerea*, *Cercospora henningsii*, *Cladosporium cladosporioides*, *Colletotrichum acutatum*, *C. asianum*, *C. capsici*, *C. coccodes*, *C. fruticola*, *C. gloeosporioides*, *C. siamense*, *Curvularia lunata*, *Drechslera specifera* y *Fusarium oxysporum*.

En particular sobre las plantas de estudio hay trabajos que señalan su potencial antifúngico, por ejemplo, para *Sapranthus campechianus* De-la-Cruz-Chacón y González-Esquinca, (2015) reportan que, inhibe el crecimiento de *Colletotrichum gloeosporioides* y para *Annona muricata* Vitola y Pérez, (2016) reportaron la actividad antifúngica *in vitro* de los extractos de hojas sobre *Phytophthora cinnamon*. Mientras que para *Annona reticulata* Jamkhande *et al.*, (2016) reporta que el extracto metanólico de las hojas mediante el método de difusión en pozos de agar y el método de dilución en caldo inhibieron a *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Candida blanki*.

Santos y Ordaz, (2017) reportaron que los extractos de *Annona purpurea* inhibieron el crecimiento micelial de *Fusarium solani*, mientras que Castro-Moreno *et al.*, (2020) señaló que extractos hexánicos de *A. purpurea* de raíz, tallos y hojas de diferentes estacionalidades tuvieron actividad antifúngica con potencia baja a moderada sobre *Curvularia lunata*. Por otro lado, De-la-Cruz-Chacón *et al.*, (2019) evaluaron extractos metanólicos, hexánicos y alcaloidales de hojas, corteza de

tallos y raíces de *Sapranthus microcarpus*, por el método de inhibición micelial contra seis fitopatógenos *Aspergillus glaucus*, *Colletotrichum gloeosporoides*, *Colletotrichum acutatum* var. *fioriniae*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersic*, *Curvularia lunata* y *Rhizopus stolonifer*. Todos los extractos, en alguna medida, inhibieron el crecimiento de los seis fitopatógenos, pero fueron los extractos alcaloidales los de mayor actividad. *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* y *Curvularia lunata* fueron los fitopatógenos más sensibles cuyo crecimiento micelial en agar fue completamente inhibido a 200 nmol mL⁻¹ (MIC: 125 nmol. mL⁻¹). Y finalmente para *Annona macrophyllata*, De-la-Cruz-Chacón *et al.*, (2020) encontraron que los extractos metanólicos de los tallos afectan el crecimiento de *Aspergillus glaucus*, *Rhizopus stolonifer* y *Colletotrichum gloeosporioides*.

3.2. EXTRACTOS VEGETALES CON ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA SOBRE *Hemileia vastatrix*

Son pocos los extractos de metabolitos de plantas reportados para inhibir el crecimiento de *H. vastatrix*, Silva *et al.*, (2014) reportaron que extractos de bulbos de *Allium sativum* y hojas de *Cymbopogon citratus*, *C. nardus* y *Vernonia polysphaera* inhiben la germinación de conidios de *H. vastatrix*. Para *Baccharis glutinosa* de la familia Asteraceae, planta del estado de Chiapas fue reportado que los extractos alcohólicos de raíces poseen compuestos con actividad antifúngica contra la roya del cafeto a nivel morfológico, molecular y genético (Lam, 2019).

Por otro lado, Cerna *et al.*, (2019) sustenta que los extractos de Canela (*Cinnamomum verum*), Naranja (*Citrus sinensis*), Gobernadora (*Larrea tridentata*), Eucalipto (*Eucalyptus globulus*), Mostaza negra (*Brassica nigra*) y Pimienta (*Piper nigrum*) tienen actividad antifúngica, por lo que realizaron pruebas en las variedades de café típica y caturra con dosis de 2.25 L ha⁻¹ con siete aplicaciones a intervalos de 21 días. En las cual observaron una reducción significativa de la enfermedad con todos los extractos evaluados, los menores registros en ambas variedades se obtuvieron en los tratamientos de *Cinnamomum verum* y *Citrus sinensis*, con 15.4 y 19.68% y 4.73 y 4.00% para Típica y Caturra respectivamente.

IV. OBJETIVOS

4.1 GENERAL.

Evaluar el potencial antifúngico de extractos de metabolitos secundarios de seis especies de Anonáceas para el control químico de *Hemileia vastatrix*.

4.2 PARTICULARES

- Determinar la potencia inhibitoria de extractos de anonáceas sobre la germinación de uredosporas de *H. vastatrix*.
- Determinar la capacidad de los extractos de anonáceas en el control de la colonización de *H. vastatrix* en plántulas de *Coffea arabica*.
- Conocer si el efecto inhibitorio de los extractos es permanente o temporal.

V. HIPÓTESIS

Se conoce que varias Anonáceas biosintetizan metabolitos secundarios antifúngicos, por ello es posible que algunos también ejerzan efecto inhibitorio en la germinación de uredósporas de *Hemileia vastatrix*.

VI. MÉTODOS

6.1. RECOLECTA DE *Hemileia vastatrix*

Para realizar los ensayos de germinación de esporas se recolectaron hojas de cafeto con síntomas de la enfermedad de la roya (*Hemileia vastatrix*) de una zona cafetalera del ejido de Ocuilapa de Juárez, Municipio de Ocozocoautla, Chiapas, México, (Figura 7). La localidad forma parte de la zona de influencia de la Reserva de la Biosfera Selva El Ocote y colinda con el Parque Educativo Laguna Bélgica.

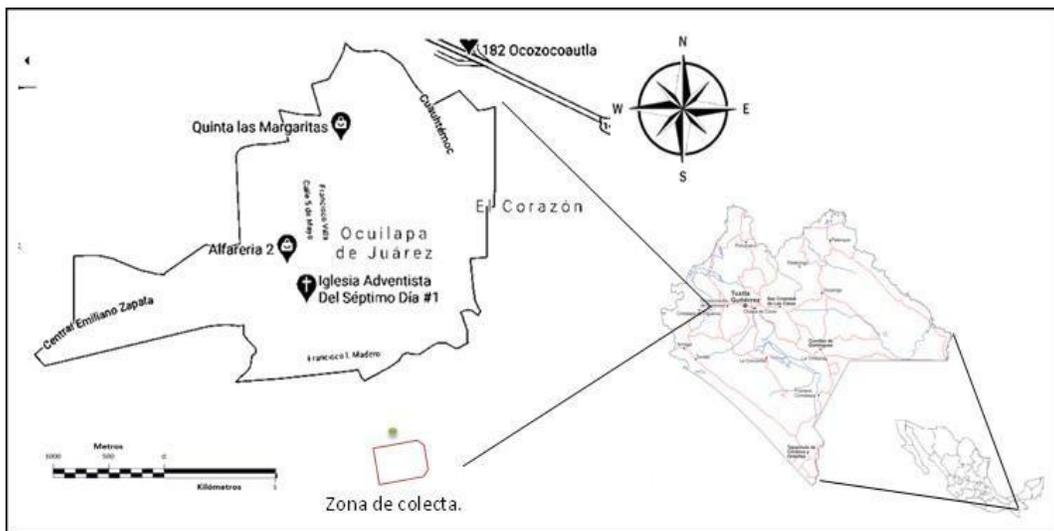
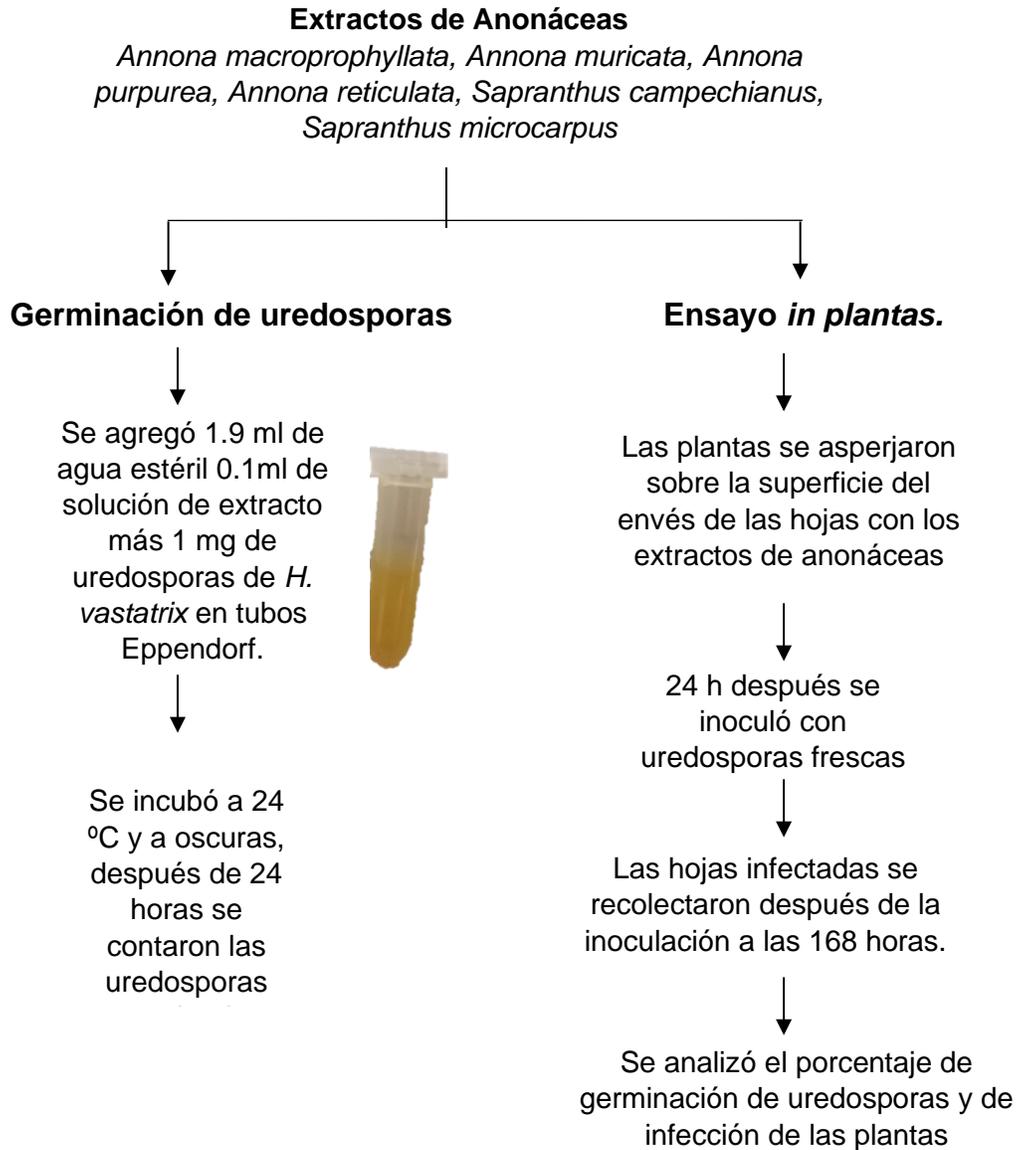


Figura 7. Ocuilapa de Juárez municipio de Ocozocoautla de Espinoza Chiapas México (INEGI. 2021)

Se recolectaron hojas infectadas de plantas de café de una parcela de cultivo de Ocuilapa de Juárez del municipio de Ocozocoautla, Chiapas que se transportaron en cámara húmeda hasta las instalaciones del Laboratorio de Fisiología y Química Vegetal de la UNICACH, en el cual se realizó la recolección de uredosporas. Eliminando las uredosporas de las hojas con un cepillo de cerdas suaves, guardándolas en tubos Eppendorf (modificado de Lam, 2019). La corroboración del hongo se realizó mediante la identificación de los síntomas de la

enfermedad de la roya del café y las características morfológicas de las esporas de acuerdo a Virginio-Filho y Astorga (2015). De igual forma para almacenar el hongo se realizaron prensas botánicas de las hojas infectadas.



6.2. ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE ANONÁCEAS

6.2.1 Extractos de anonáceas

Los extractos fueron tomados del acervo fitoquímico del Laboratorio de Fisiología y Química Vegetal del Instituto de Ciencias Biológicas de la UNICACH provenientes de estudios anteriores y con antecedentes antifúngicos para cada especie (Cuadro 2).

Cuadro 2 Extractos del acervo fitoquímico del Laboratorio de Fisiología y Química Vegetal

Especie	Extracto	Procedencia
<i>Annona macrophyllata</i>	Alcaloidal de raíces	De la Cruz <i>et al.</i> , 2012
<i>Annona purpurea</i>	Alcaloidal de raíces	De la Cruz <i>et al.</i> , 2019a
<i>Annona reticulata</i>	Alcaloidal de raíces	Castro Moreno <i>et al.</i> , 2013
<i>Annona muricata</i>	Alcaloidal de raíces	Riley-Saldaña, 2016
<i>Sapranthus campechianus</i>	Alcaloidal de raíces	De la Cruz <i>et al.</i> , 2019b
<i>Sapranthus microcarpus</i>	Alcaloidal de raíces	Vázquez-Ovando, 2022

6.2.2. Germinación de uredosporas. Ensayo modificado de Morales *et al.*, (2021) y García-Pérez *et al.*, (2021)

Los ensayos de germinación de uredosporas se realizaron por quintuplicado con cada extracto, comparando la actividad con el testigo. Para ello, en tubos Eppendorf se colocó 1.9 mL de agua destilada estéril y 1mg de uredosporas de *H. vastatrix*, a esta mezcla se le agregó 0.1mL a 1 mg.mL⁻¹ de extracto alcaloidal y se prosiguió a incubar a 24°C y a oscuras. Posteriormente se realizó el conteo de las uredosporas en una cámara de Neubauer. Para ello, se procesaron dos alícuotas de cada

muestra. Dentro del hemocitómetro, se contaron las uredosporas germinadas y no germinadas que cayeron dentro del área de los cuatro cuadrantes, las uredosporas se consideraron germinadas cuando presentaban hifas germinativas (Figura 8).

El porcentaje inhibición se calculó con la fórmula:

$$\% = \frac{\text{N. de uredosporas germinadas}}{\text{N. total uredosporas}} \times 100$$

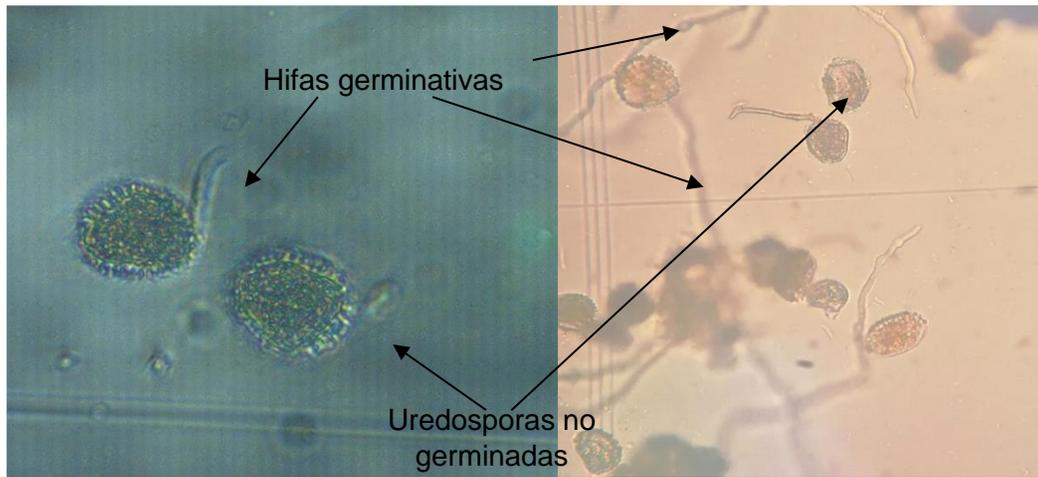


Figura 8. Uredosporas germinadas y no germinadas con presencia de hifas del hongo *H. vastatrix* a 40X. Fotografías: Vázquez-Ovando (2022).

6.2.3. Ensayo en plantas

Para el ensayo en plantas se realizaron tres tratamientos y el testigo con 10 repeticiones, con los extractos más potentes en condiciones *in vitro* a concentraciones de 1 y 3 mg.mL⁻¹. Se utilizaron plantas de ocho meses de *Coffea arabica* var. Costa Rica que se aclimataron durante una semana en las cámaras húmedas a 22° C a humedad de 60% y fotoperiodos de 12/12, posteriormente fueron asperjadas con los extractos de anonáceas a una distancia de 15 cm, 24 horas después fueron inoculadas con *H. vastatrix*, la aplicación de las uredosporas se realizó con pincel. Las hojas infectadas fueron recolectadas después de la

inoculación a las 168 h. Posteriormente se analizó el porcentaje de germinación mediante el ensayo modificado de Lam (2019).

El conteo de esporas germinadas se realizó por el método de fijación de hojas modificado de Lam (2019) para lo cual se tomaron segmentos de 1cm² aproximadamente de la parte central de cada hoja, se le añadió 5 mL de disolución Carnoy y se incubó a 60°C por 4 h. Cumpliendo las 4 h, se escurrió la disolución Carnoy, y se agregó 5 mL de disolución de lactofenol y nuevamente se incubó a 60°C por 5 h, posteriormente se eliminó el exceso de lactofenol. Los fragmentos se tiñeron con azul de tripán y se dejaron a temperatura ambiente durante 1 h 30 min. Por cada montaje se colocaron dos gotas de polivinil alcohol, se colocó el fragmento limpio y se cubrió con un cubreobjeto y se dejó secar a temperatura ambiente. Con la ayuda de un microscopio con lente objetivo de 10X se contabilizó el número de esporas germinadas.

Las plantas se mantuvieron en observación durante 40 días, durante este periodo se mantuvo la temperatura y la humedad ya mencionadas, y a los 30 días se fotografiaron las hojas infectadas, para posteriormente calcular el área infectada con la aplicación del programa computarizado de uso libre ImageJ, ese mismo día se aplicó una segunda dosis, y a los 40 días se volvieron a fotografiar para obtener el área de infección.

6.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Debido a la naturaleza de los datos (uredosporas germinadas o no germinadas), para analizar el efecto de la concentración se obtuvo la diferencia en cada tratamiento con respecto al testigo y para determinar los extractos más potentes entre las especies, se realizó un análisis de los porcentajes de inhibición y la posterior comparación entre grupos, mediante las pruebas no paramétricas (Kruskal Wallis y Prueba de Mann-Whitney al 95% de probabilidad), empleando el programa de uso libre Past.

VII. RESULTADOS

7.1. EFECTO DE LOS EXTRACTOS DE ANONÁCEAS SOBRE LA GERMINACIÓN DE UREDOSPORAS DE *Hemilea vastatrix*

Los extractos de cinco de las seis especies evaluadas inhibieron la tasa de germinación de uredosporas de *H. vastatrix* con respecto al control ($p < 0.01$) y sin diferencias estadísticas significativas entre ellos ($p = 0.09113$). Los extractos que más inhibieron la germinación de las uredosporas fueron *Annona purpurea*, *Sapranthus microcarpus* y *Annona reticulata* reduciéndolas a 3.7%, 7.9% y 9.8% respectivamente, seguidas de *Sapranthus campechianus* a 10.1% y *Annona muricata* a 12.1% (Figura 10).

El único extracto de los seis evaluados sin actividad sobre la germinación de esporas fue el extracto alcaloidal de *Annona macrophyllata* ($p = 0.83$), (Figura 9-D). Sin embargo, afectó el crecimiento de las hifas (Figura 13-D), ya que en los tratamientos control, las esporas germinadas presentaron hifas más largas (Figura 11), este efecto se observó en todas las uredosporas que germinaron de las repeticiones realizadas (Figura 12).

Cuadro 3. Análisis estadístico con la prueba de Mann-Whitn U

Especies de estudio	Z	P
<i>Sapranthus campechianus</i>	2.5067	0.012186
<i>Annona muricata</i>	2.5067	0.012186
<i>Annona purpurea</i>	2.5067	0.012186
<i>Annona macrophyllata</i>	0.20889	0.83453
<i>Sapranthus microcarpus</i>	2.5067	0.012186
<i>Annona reticulata</i>	2.5067	0.012186

Se evaluó el efecto de los extractos de anonáceas sobre la germinación *in vitro* de uredosporas de *Hemilea vastatrix*. El porcentaje de germinación fue comparado con el control negativo.

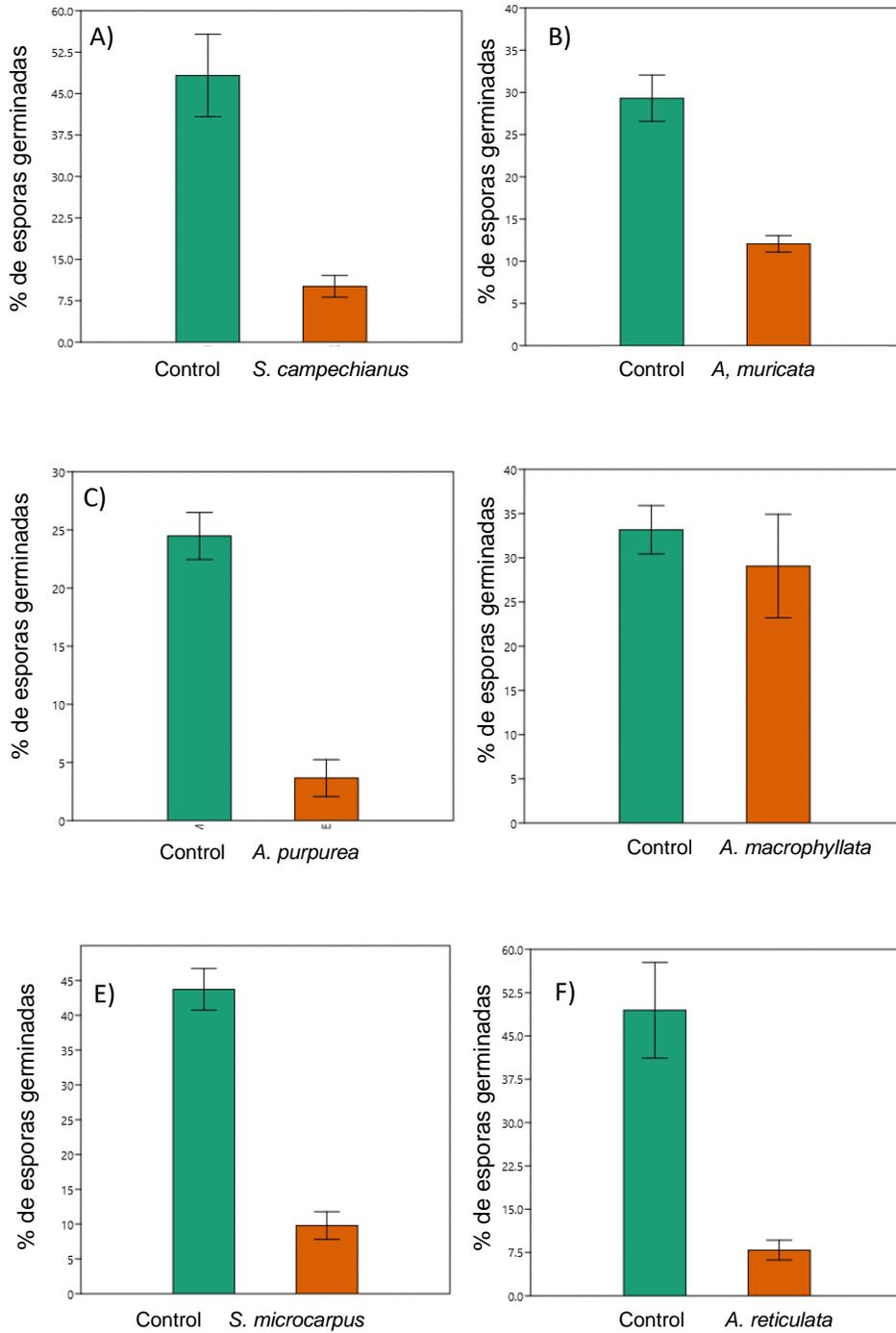


Figura 9. Pruebas *in vitro*, comparación de la germinación de uredosporas entre controles y extractos.

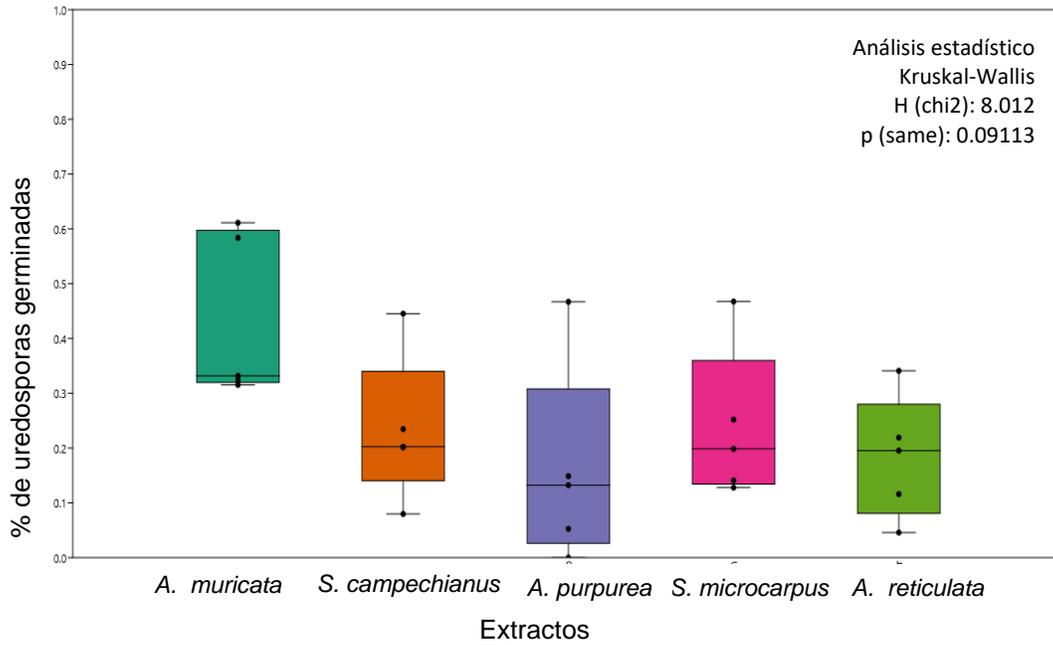


Figura 10. Comparación del potencial antifúngico de los extractos *Annona muricata*, *Sapranthus campechianus*, *Annona purpurea*, *Sapranthus microcarpus* y *Annona reticulata* contra *Hemileia vastatrix*.

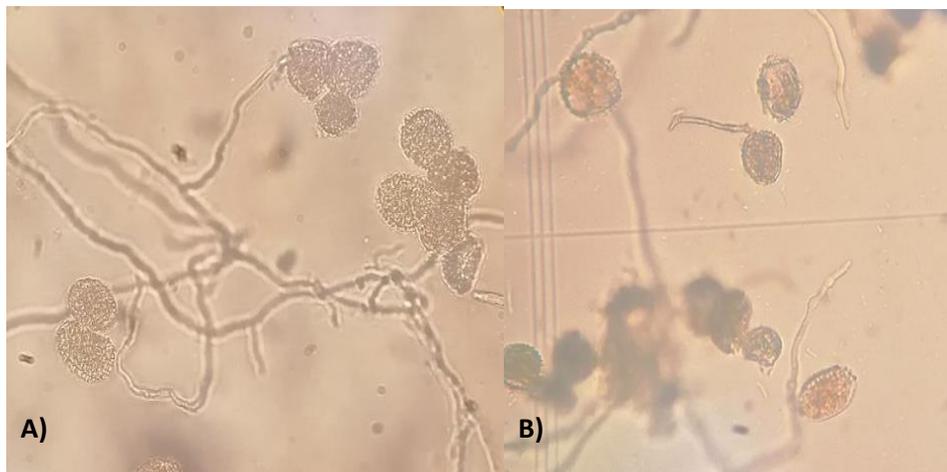


Figura 11. Pruebas control de la germinación de uredosporas a 40X A) germinación en agua B) germinación en metanol prueba. Fotografías: Vázquez-Ovando (2022).

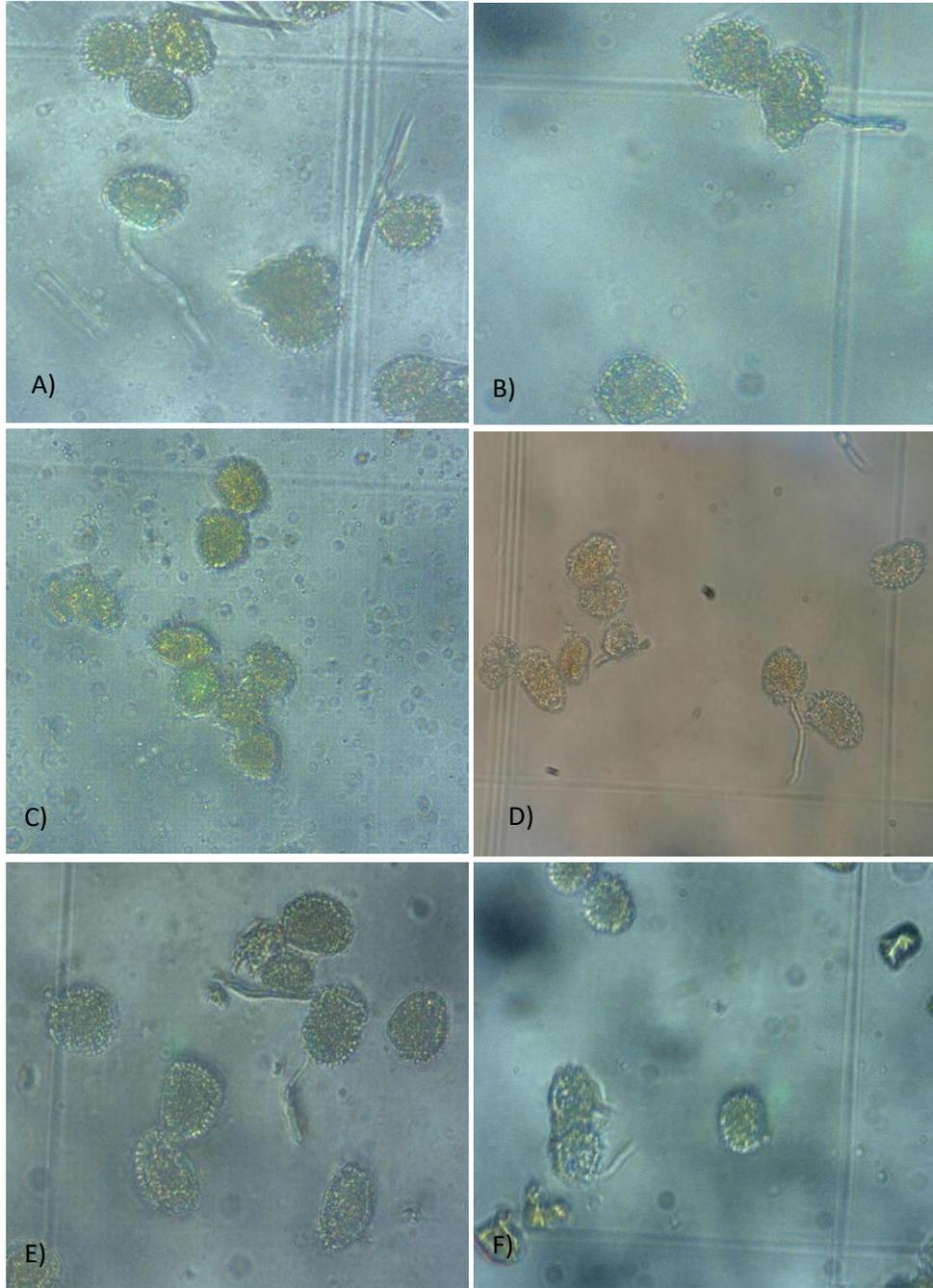


Figura 12. Pruebas de germinación de uredosporas en los extractos a 40X. A) *Sapranthus campechianus*, B) *Annona muricata*, C) *Annona purpurea*, D) *Annona macrophyllata*, E) *Sapranthus microcarpus*, F) *Annona reticulata*. Fotografías: Vázquez-Ovando (2022)

7.2. Actividad de extractos de anonáceas en el control de *Hemileia vastatrix* en plántulas de *Coffea arabica*.

En esta sección se describe la actividad de los extractos de *Annona purpurea*, *A. reticulata* y *Sapranthus microcarpus* sobre la capacidad para controlar la enfermedad de la roya en plántulas de *Coffea arabica*, ya sea para inhibir la germinación de las uredosporas del hongo o el avance de la enfermedad foliar. Para ello se evaluaron los extractos más sobresalientes del ensayo anterior a dos concentraciones 1.5 y 3 mg.mL⁻¹ con dos dosificaciones, antes de asperjar las esporas en las hojas de plántulas de café y 40 días después de la aspersion.

7.2.1. Actividad de extractos de anonáceas sobre la germinación de uredosporas de *Hemileia vastatrix* *in vivo*

Debe señalarse que esta actividad sobre la germinación de esporas es *in vivo* en las hojas de *C. arabica* y no *in vitro* como anteriormente se relató. Para ello las hojas de las plántulas fueron previamente asperjadas con los extractos antes de ser inoculadas con las esporas del hongo y posteriormente se tomaron muestras de esporas de las hojas y fueron puestas a germinar.

Los extractos, a una semana de la inoculación, mostraron actividad inhibitoria con diferencias significativas con respecto al control ($p= 0.0497$) (Figura 14). Los extractos de *A. reticulata* y *S. microcarpus* provocaron una baja tasa de germinación de las uredosporas (3.9% y 3% respectivamente) casi tres o cuatro veces menos que el control, mientras que el extracto de *A. purpurea* tuvo menos efecto provocando casi el doble de la tasa de germinación que los otros (6.48%), pero dos veces más baja que la provocada por el control, en el que hubo una mayor cantidad de hifas germinativas (13.5%) (Figura 13 A).

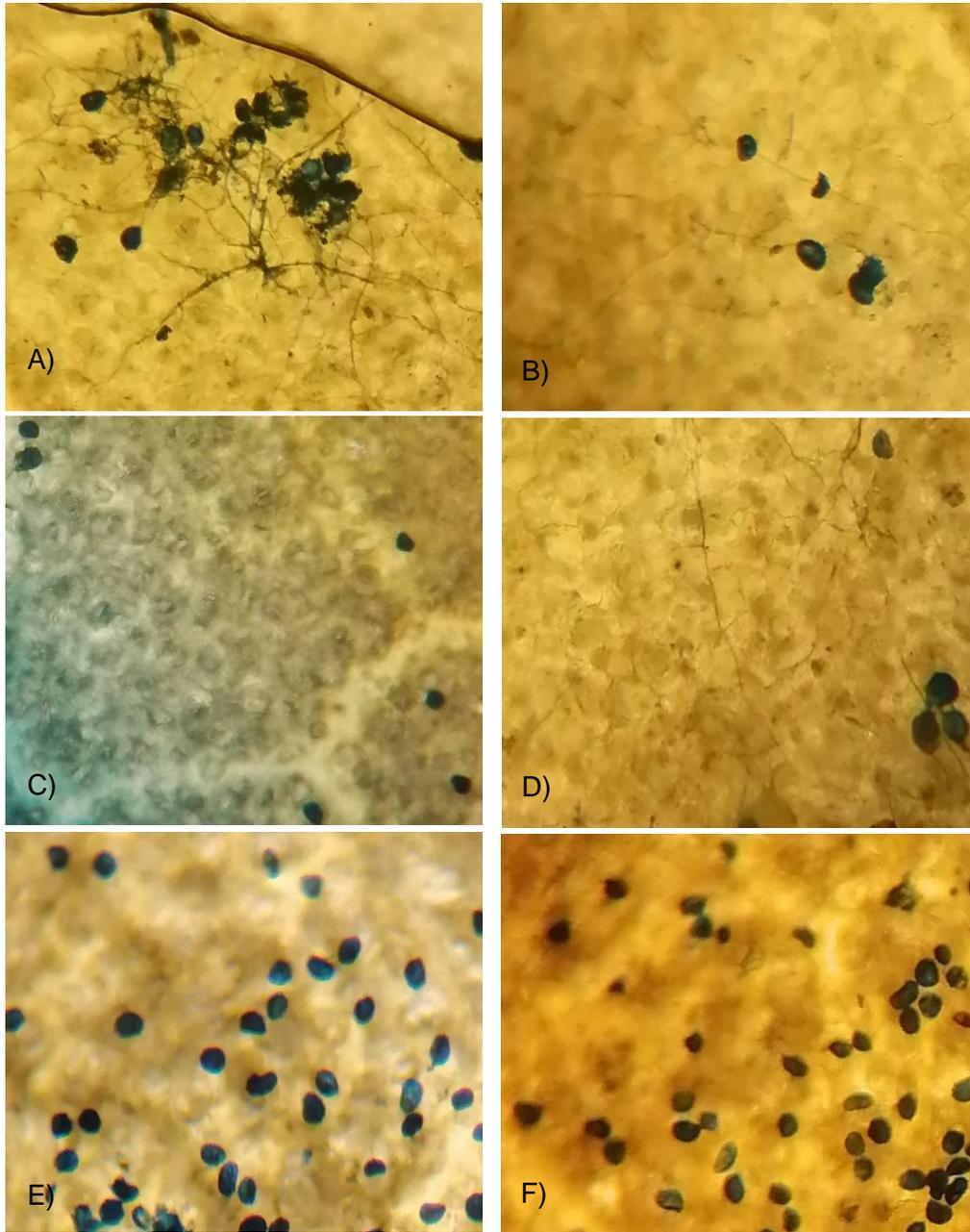


Figura 13 Germinación de uredosporas *in vivo* observado al microscopio a 10X, concentración 1mg.ml⁻¹: A) control B) *Saprothius microcarpus* C) *Annona reticulata*, D) *Annona purpurea*. Concentración 3mg.mL⁻¹: E) *Annona reticulata* y F) *Saprothius microcarpus*. Fotografías: Vázquez-Ovando (2022).

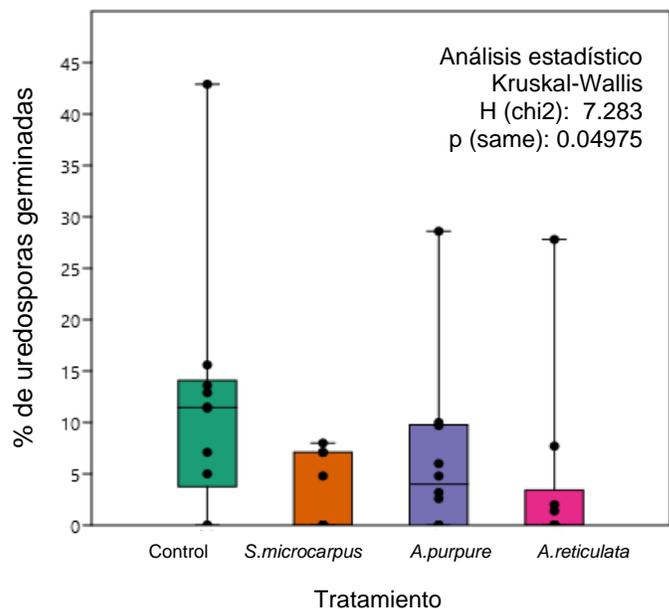


Figura 14. Germinación de uredosporas *in vivo* con extractos de anonáceas 1mg.ml⁻¹.

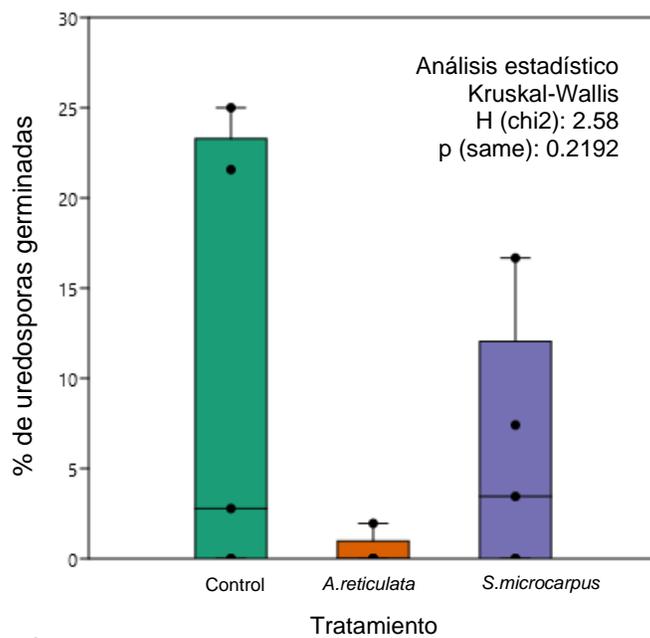


Figura 15. Germinación de uredosporas *in vivo* con extractos de anonáceas a 3mg.mL⁻¹.

Estos resultados permitieron seleccionar a los extractos de *A. reticulata* y *S. microcarpus* para un segundo ensayo donde se evaluó una concentración más alta de extracto (3 mg.mL^{-1}) (Figura 15), particularmente el extracto alcaloidal de *A. reticulata* mostró mayor actividad inhibitoria reduciendo la tasa de germinación a 0.39% ($p=0.02192$), es decir la potencia aumentó diez veces duplicando la concentración, en tanto que *S. microcarpus* no mejoró su potencia, aunque si se mantuvo la inhibición (5.50%).

7.2.2. Actividad de extractos de anonáceas en el control de la roya (*Hemileia vastatrix*) en plántulas de *Coffea arabica*

La roya es una enfermedad que se caracteriza por manifestarse en lesiones foliares, visiblemente se ha reportado que inicia como pequeñas manchas redondas de 2 a 4 mm de diámetro, de color amarillo clorótico en el envés de las hojas, lesiones que coalescen y ocupan áreas irregulares de más de 5 cm de diámetro, donde aparecen luego los signos del patógeno como uredosporas en pústulas en el envés de la hoja (López *et al.*, 2018).

Durante las primeras dos semanas no se observaron lesiones foliares en las hojas de las plántulas a las que se les aplicaron extractos a una concentración de 1 mg.mL^{-1} . Las primeras manifestaciones de la enfermedad se observaron a los 25-30 días, estas lesiones fueron percibidas como puntos de color verde claro (puntos cloróticos) en las plántulas de todas las repeticiones, con menor porcentaje de área contaminada en las plántulas a las que se les aplicó extracto de *S. microcarpus* 0.22% y el de *A. purpurea* 0.24% (Figura 16), las plantas a las que se les aplicó extracto de *A. reticulata* tuvieron mayor área de lesiones foliares que las de los otros tratamientos ($p=0.04$).

Después de las primeras lesiones cloróticas de las plantas de café a los 30 días, se aplicó una segunda dosis con la misma concentración. A los 40 días de iniciado el tratamiento (DDT) se observaron puntos cloróticos y las primeras áreas lesionadas con signos de esporulación de *H. vastatrix* (Figura 18). Las plántulas con extracto de *S. microcarpus* y *A. purpurea* continuaron siendo las menos afectadas por *H. vastatrix* con el mismo porcentaje de infección (Figura 17), por lo tanto, entre

los 30 y 40 días, el análisis estadístico mostró que no hay diferencias significativas entre ellos (Figura 19), indicando que las lesiones en las hojas se mantuvieron similares entre la primera y la segunda aplicación de extracto.

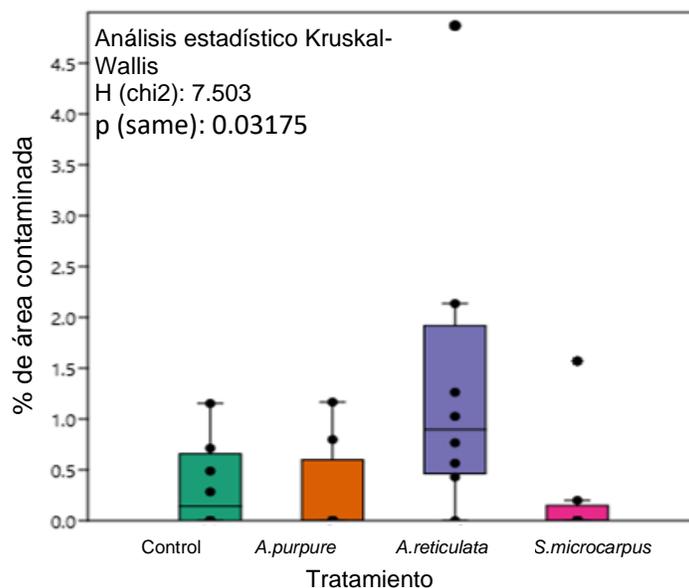


Figura 16 Porcentaje de área de las hojas contaminada con *Hemileia vastatrix* a los 30 días.

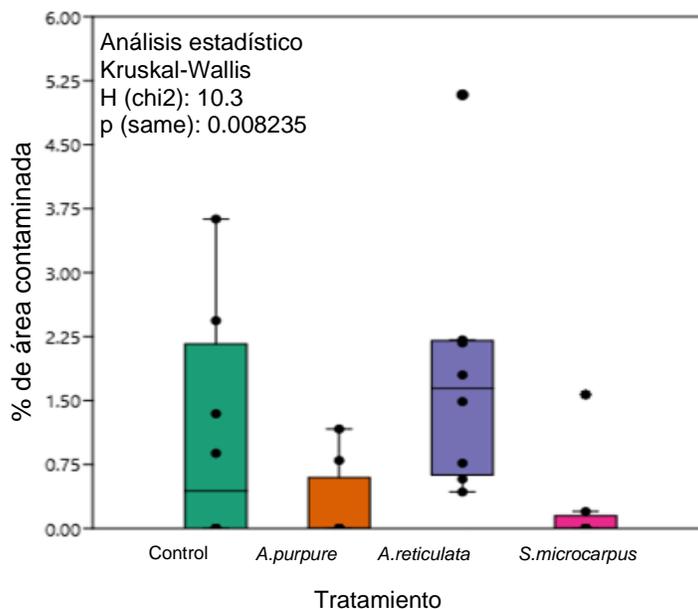


Figura 17. Porcentaje de área de las hojas contaminada de *Hemileia vastatrix* a los 40 días con aplicación de segunda dosis a los 30 días.

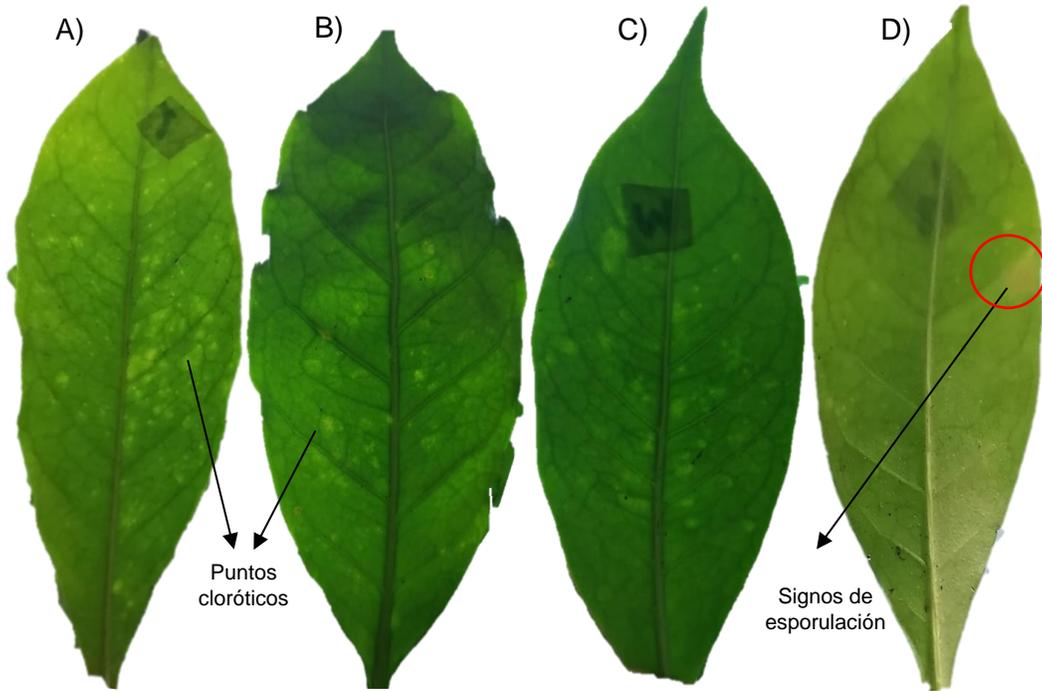


Figura 18. Hojas de *Coffea arabica* de pruebas *in vivo* a los 40 días de inoculación A) control con puntos cloróticos y B) *Annona purpurea* con punto cloróticos, C) *Annona reticulata* con puntos cloróticos y D) *Sapranthus microcarpus* con puntos cloróticos y con signos de esporulación. Fotografías: Vázquez-Ovando (2022).

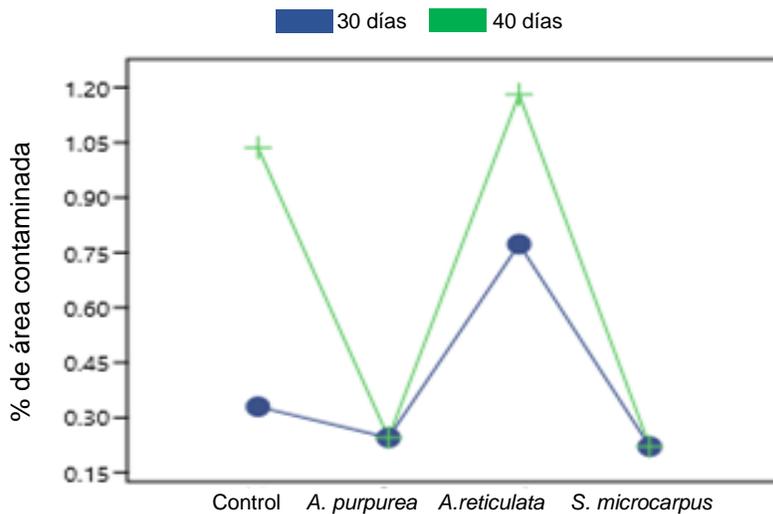


Figura 19. Porcentaje de área de las hojas contaminada con *Hemileia vastatrix* entre primera y segunda dosis concentración de extracto de 1mgml⁻¹.

En el segundo ensayo con extractos a $3\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de *A. reticulata* y *S. microcarpus* después de 30 días no se observaron lesiones de ninguna clase, revelando tal vez una actividad antifúngica dosis dependiente (a mayor concentración mayor actividad), con diferencias significativas frente al control $p=0.03178$ (Figura 20).

A los 40 días y después de una segunda aplicación de extractos, se observaron lesiones de roya en algunas de las plantas tratadas (Figura 22), con porcentaje bajos de infección con *A. reticulata* (0.019%) y *S. microcarpus* (0.013%), con diferencias significativas frente al control (Figura 21). No se encontró diferencias entre el porcentaje de infección entre la primera y segunda aplicación de los extractos (Figura 24).

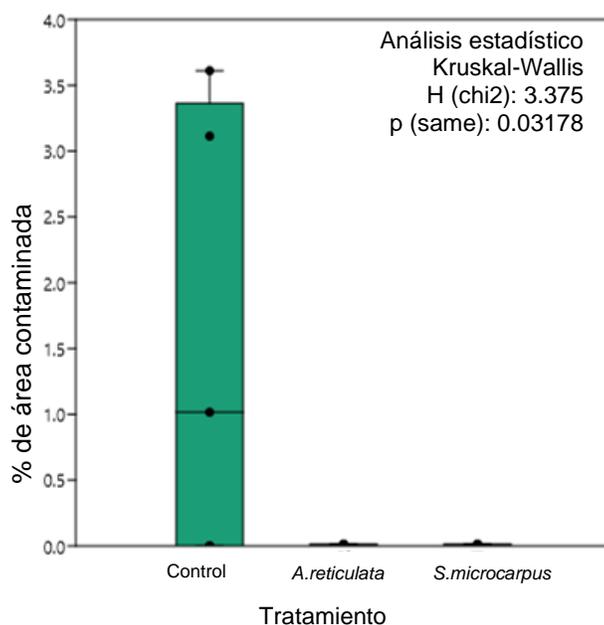


Figura 20. Porcentaje del área contaminada por *Hemileia vastatrix* a los 30 días.

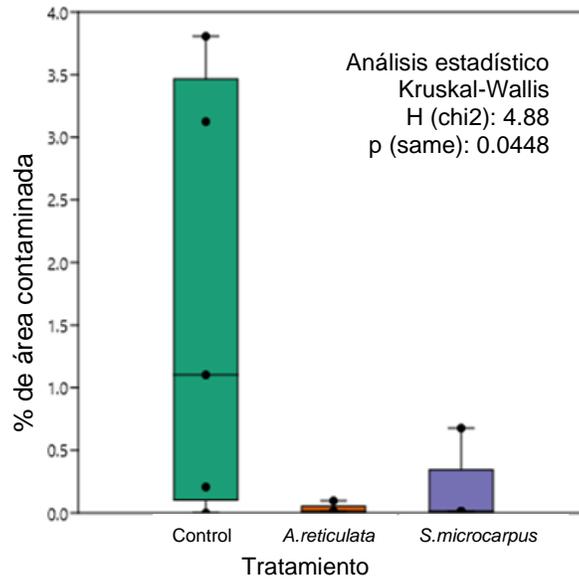


Figura 21. Porcentaje de área contaminada por *Hemileia vastatrix* a los 40 días, con aplicación de segunda dosis.

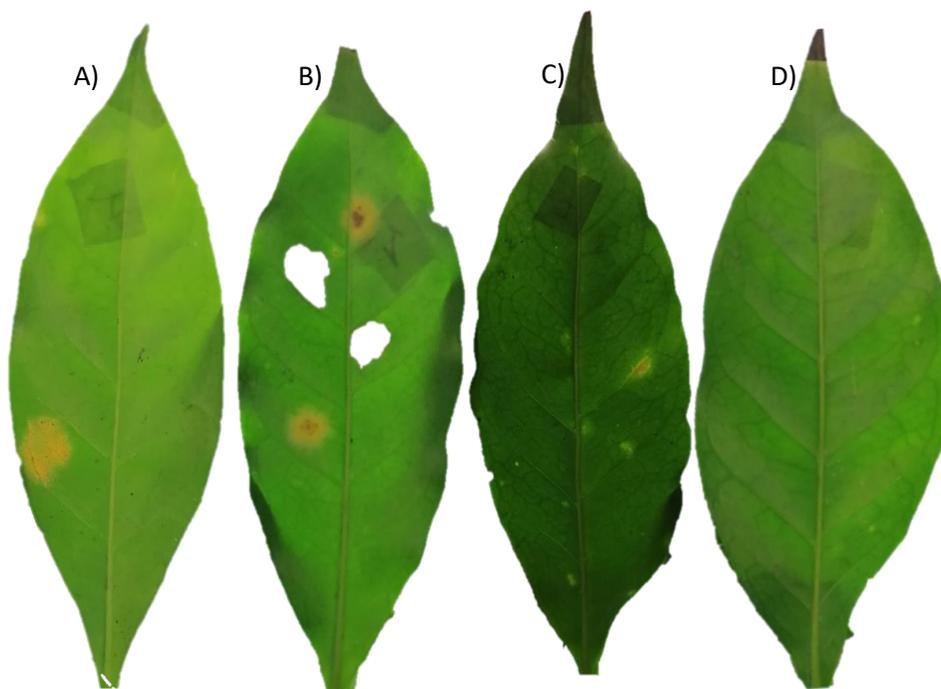


Figura 22. Hojas de *Coffea arabica* de pruebas *en vivo* a los 40 días de inoculación A y B) control con lesiones esporulantes C) extracto alcaloidal de *Sapranthus microcarpus* con puntos cloróticos y con signos de esporulación y D) *Annona reticulata* con puntos cloróticos. Fotografías: Vázquez-Ovando (2022).

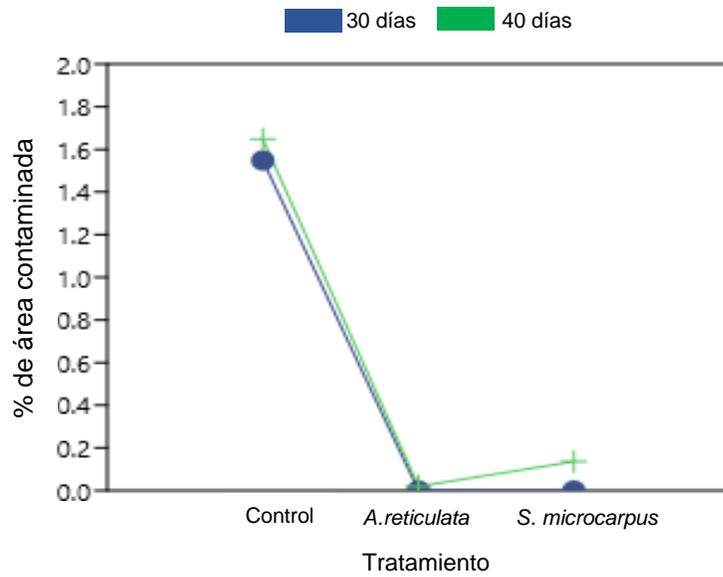


Figura 23. Porcentaje de área de las hojas contaminada con *Hemileia vastatrix*, entre la primera aplicación de extractos y segunda aplicación a los 30, concentración de extracto 3mg.ml¹.

VIII. DISCUSIÓN

La potencia inhibitoria de los extractos de *Annona purpurea*, *A. reticulata* y *Sapranthus microcarpus* sobre la germinación de uredosporas de *Hemileia vastatrix* evidencia la capacidad de las moléculas producidas por esta familia tropical de plantas. Aunque ha sido constantemente reportada la actividad antifúngica de extractos y moléculas de anonáceas (González-Esquinca *et al.*, 2014) particularmente sobre fitopatógenos (De-la-Cruz-Chacón y González-Esquinca *et al.*, 2015; De-la-Cruz-Chacón *et al.*, 2019; Chong, 2020), esta es la primera vez que se documenta el potencial inhibitorio de anonáceas sobre el fitopatógeno más relevante del cultivo del café. Incluso, los estudios para inhibir la germinación de las uredosporas con otros extractos vegetales no son tan numerosos, entre ellos está el de Morales-Antonio (2021) quien evaluó 30 extractos vegetales, cinco de ellos presentaron actividad antifúngica contra *H. vastatrix* con 100% de inhibición es decir un poco más alta que las anonáceas (88-97% de inhibición o 12-3% de germinación como se expresó en este estudio), estas especies fueron *Tribulus terrestris*, *Datura ferox*, *Mansoa alliacea*, *Ricinus communis* y *Acacia farnesiana*, y las pruebas fueron realizadas en ausencia y presencia de luz a 24 °C, y con un tiempo de incubación de 24 h, a concentraciones de 0.5, 1.0 y 2.0% m/v, similares a las evaluadas en este estudio, los extractos de *Thymus vulgaris* fue el que menos inhibición presentó (88%).

La potencia de las anonáceas estudiadas es mayor o comparable a las de otras especies vegetales, por ejemplo García-Pérez *et al.*, (2021) reportaron que extractos de *Eriobotrya japonica*, *Ardisia compressa* y *Ocimum basilicum* a concentraciones de 75 y 100% m/v redujeron la germinación de uredinosporas de *H. vastatrix* a sólo 0.12, 0.34 y 0.38 % frente a su control negativo (agua destilada), aunque pareciera que estos efectos son 10 veces más fuerte que la anonáceas que redujeron la germinación a 3-12%, las concentraciones evaluadas en este estudio son hasta 100 veces más bajas ($1-3\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1} = 1-3\%$). Por lo que si se relativiza el porcentaje de inhibición con la concentración (%actividad/concentración) se deduce que los extractos alcaloidales de las anonáceas podrían ser más eficaz.

Lam (2021) reporta que a $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de extracto de raíces *Baccharis glutinosa*, el extracto no inhibe la germinación de las uredosporas, sin embargo, a concentraciones de 100 a $200 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ permitieron obtener entre 98-100% de inhibición, casi la misma potencia que las anonáceas de estudio, pero con concentraciones 100-200 veces más alta que las utilizadas en esta investigación.

Los resultados en plántulas, confirman la actividad antifúngica de los extractos de *A. reticulata*, *A. purpurea* y *S. microcarpus*, contra *H. vastatrix*, aunque sus porcentajes de inhibición son diferentes, los tres tienen actividad antifúngica contra el hongo. Lam (2019) documentó que las uredosporas de *H. vastatrix*, son susceptibles al extracto alcohólico de *Baccharis glutinosa in vivo* a $5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, con un porcentaje de inhibición en la germinación de 45%, mientras que el porcentaje de inhibición uredosporas germinadas con los extractos *A. reticulata* y *S. microcarpus* fueron más altas, incluso el de *A. purpurea* con 6.48% es decir más del 93% de inhibición a $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, mientras que a $3 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ el extracto de *A. reticulata* logró reducir la germinación a 0.39%, eliminando casi por completo la germinación de las esporas.

En cuanto a la tasa de infección de la enfermedad de la roya se encontró que *S. microcarpus* y *A. purpurea* fueron los que menor área de infección presentaron a $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ pero también fueron los extractos en los que se encontró mayor porcentaje de uredosporas germinadas *in vivo*, una posible explicación a ello es que el proceso de infección puede haberse interrumpido, ya que la infección y el desarrollo de la enfermedad incluye la germinación de las uredosporas y la formación del apresorio que permite que el hongo penetre en el huésped a través de los estomas formando una estructura de penetración (Thalinhas *et al.*, 2007), por lo tanto si las uredosporas germinan esto no garantiza que la infección se presente, ya que sin la formación de apresorio no hay infección. Esto nos permite hipotetizar que los metabolitos de los extractos pudieran estar provocando la inhibición de la formación del apresorio.

En trabajos similares se ha reportado la eficacia de extractos vegetales, para el control de los síntomas de la enfermedad de la roya, por ejemplo, Pereira *et al.*,

(2012) quienes realizaron estudios de aceites esenciales de canela (*Cinnamomum zeylanicum* Blume) citronela (*Cymbopogon nardus* L.), clavo (*Syzygium aromaticum* L) tomillo (*Thymus vulgaris* L.), neem (*Azadirachta indica* A. Juss.) eucalipto (*Corymbia citriodora*), limoncillo (*Cymbopogon citratus*) y árbol de te (*Melaleuca alternifolia*) a 1000 $\mu\text{L L}^{-1}$, demuestran que, todos los aceites promovieron el control parcial de la enfermedad en plantas. Sin embargo, los aceites de tomillo, clavo y citronela, fueron más efectivos en el control de la enfermedad en los cultivares Catucaí 2SL, Catucaí IAC 62 y Mundo Novo 379/19, aunque no mencionan los porcentajes de inhibición. Rodríguez-Peña (2021) utilizó aceites esenciales al 1% de plantas de la familia Myrtaceae: *Myrcianthes montana*, *Pimenta haitiensis*, *Pimenta ozua*, *Myrcianthes fragans*, *Pimenta racemosavar* y *Eugenia lindahlii*, encontrando que *Myrcianthes fragans* fue la más promisoría en el control de la roya, presentado 2.5% de severidad de la enfermedad. En este estudio los extractos de *S. microcarpus*, *A. purpurea* y *A. reticulata* presentaron porcentajes de infección de 0.22% 0.24% y 1.18% respectivamente a 1 y a 3 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ *A. reticulata* 0.019 y 0.13% con *S. microcarpus* es decir con una eficiencia entre 10 y 100 veces mayor que los datos relatados.

Lam (2019) realizó inspecciones visuales diariamente de las plantas a las que le aplicó extracto de *Baccharis glutinosa* a 5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, pudo comparar el avance de la infección, basado en la clasificación de estadios de infección de la roya, señaló que desde el día 11 se observaron puntos cloróticos y al día 39 las hojas ya presentaban pústulas uredospóricas en el control, mientras que las hojas tratadas con extracto no presentaron señal macroscópica que indicará infección, en este trabajo las hojas con los extractos presentaron señales macroscópicas solo después de 30 días de la infección, indicando que los extractos parecen retardar el proceso infeccioso a concentraciones menores.

La aparición de algunos de los síntomas de la enfermedad en las plantas del café después de 30 días, permite decir que la actividad inhibitoria de los extractos de anonáceas *in vivo* es temporal, ya que aun con dos aplicaciones de extracto lograron observarse síntomas de la roya después de 40 días de aplicado los

extractos. Virginio-Filho y Astorga (2015) señalan que la eficacia en el control químico de la roya del café depende de la frecuencia de aplicaciones y de las condiciones del ambiente e incidencia de la enfermedad, y que por lo general se realizan varias aplicaciones del producto para mantener un control más eficiente de la enfermedad, sin embargo, también se ha documentado que algunos de los productos químicos son usados como preventivos ya que una vez infectada la hoja, no pueden detenerse la infección, o que los productos de acción sistémica, es decir aquellos que actúan dentro del sistema de las plantas funcionan en etapas tempranas de la infección, ya que aplicarlas en etapas avanzadas sólo sirve para esparcir las esporas del hongo (Hernández-Martínez y Velázquez-Premio, 2016), por lo que los extractos de anonáceas, además de que son una opción de menor toxicidad para el ambiente también parece actuar incluso después de haberse presentado la infección.

La potencia de los extractos de anonáceas señala el potencial antifúngico de los alcaloides de las anonáceas, aunque no se trabajó con alcaloides individuales, se sabe que *Sapranthus campechianus* produce alcaloides del tipo bencilisoquinolínico, entre ellos la liriodenina (Schatz *et al.*, 2018) y reticulina, alcaloides mayoritarios de sus raíces (Chong-Rodríguez, 2020). Para *Annona muricata* se han identificado y aislado más de 200 compuestos químicos, los más numerosos son los alcaloides y acetogeninas (Coria-Téllez *et al.*, 2018., Arias-Navarro y Bueno-Durán, 2020), entre sus alcaloides se encuentran la anonaina, anomuricina, anomurina, asimilobina, atherospermina, atherosperminina, coclaurina, coreximina, coreximipa, reticulinea y tiramina (Rivas-Cacsire, 2006); de *Annona purpurea* se han aislado alrededor de 44 alcaloides entre ellos, la annomontina que es un alcaloide beta-carbolínico (Castro-Moreno *et al.*, 2020a).

No todas las especies se han estudiado de la misma forma, de *A. reticulata* y *S. microcarpus* se conoce muy poco de sus metabolitos, se reporta que contienen acetogeninas y alcaloides en sus raíces (Jamkhande y Wattamwar, 2015; De-la-Cruz-Chacon *et al.*, 2019). Varios de esos alcaloides mencionados han sido reportados con actividad antifúngica sobre fitopatógenos, por ejemplo, la anonaina,

liriodenina, oxopurpureina y anonomontina (De la Cruz *et al.*, 2019), se ha documentado incluso que los alcaloides anonaina y la liriodenina tienen varios mecanismos de acción ya sea generando apoptosis celular, inhibición de la replicación celular y efectos metabólicos, entre ellos la: generación de óxido nítrico y especies reactivas de oxígeno, reducción de la concentración de glutatión intracelular, activación de caspasas y proteínas relacionadas con la apoptosis, inhibición de las enzimas colinesteras y topoisomerasa está última involucradas en los daños al ADN (Li *et al.*, 2013; Huang *et al.*, 2022), lo que los señalaría como los posibles principios activos que están actuando sobre la germinación de *H. vastatrix* y su colonización de las hojas de las plantas del café.

Es importante mencionar que muchos de los alcaloides en las anonáceas, aún no han sido estudiados desde la perspectiva de sus actividades biológicas, menos aún sobre sus mecanismos de acción, lo que representa una oportunidad para la profundización de sus estudios.

Aunque las cinco especies activas en este estudio presentan diferencias entre los alcaloides, la potencia antifúngica es muy similar para inhibir a *H. vastatrix*, lo que señalaría dos escenarios químicos: a) la presencia de alcaloides comunes en los extractos como anoaina y liriodenina y b) la posibilidad de la presencia de varias moléculas responsables de la actividad.

IX. CONCLUSIONES

Este es el primer reporte de la actividad antifúngica de extractos de alcaloides de anonáceas sobre *Hemileia vastatrix*, el fitopatógeno principal en el cultivo del café.

De las seis especies evaluadas, los extractos alcaloidales de *Annona muricata*, *A. purpurea*, *A. reticulata*, *Sapranthus microcarpus* y *S. campechianus* inhibieron la germinación de las uredosporas de *Hemileia vastatrix* *in vitro* e *in vivo*

Los extractos alcaloidales de *A. purpurea*, *A. reticulata* y *Sapranthus microcarpus* mostraron capacidad de controlar el avance de la enfermedad en las plantas del café, tanto en la inhibición de las esporas del hongo como en la proporción de los síntomas de la enfermedad de la roya

La aplicación de una segunda dosis es relevante para conservar el efecto antifúngico de los extractos.

Se observó en general, que a mayor concentración mayor potencia antifúngica.

El efecto de la aplicación de los extractos es temporal, lo que conlleva a suponer que refuerzos en la ampliación podría extender el periodo del efecto antifúngico.

Los extractos afectan la morfología de las uredosporas germinadas, reduce la longitud de las hifas y la formación de la estructura del apresorio, el cual es vital para el establecimiento del hongo en los tejidos vivos de su huésped.

La capacidad antifúngica de las anonáceas sobre *H. vastatrix* señala la importancia de conservar los recursos botánicos del estado ya que son una fuente de moléculas con posibles aplicaciones agrícolas en la resolución de problemas de infecciones fúngicas de cultivos de relevancia económica como el café lo que las convierte en una incipiente quimiodiversidad alternativa para el control de la roya.

X. RECOMENDACIONES

- ❖ Realizar pruebas con los alcaloides responsables de la inhibición de la germinación.
- ❖ Realizar ensayos en cafetos de edad adulta para comprobar la eficacia y el potencial antifúngico de los MS y las dosificaciones que se requieren.
- ❖ Realizar ensayos enfocados en el crecimiento del apresorio para determinar que tanto afecta a las uredosporas, y si el porcentaje de uredosporas germinadas corresponde al porcentaje de apresorio y área infectada en las hojas.
- ❖ Ampliar los estudios con los extractos de la familia Anonácea, para determinar que otras especies contienen MS con potencial para el control del hongo *Hemileia vastatrix*.

XI. REFERENCIAS DOCUMENTALES

- Akula, R., y Ravishankar, G. A. 2011. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signaling & Behavior*, 6(11), 1720–1731.
- APS, 2021. The American Phytopathological Society. Coffee rust (*Hemileia vastatrix*). En línea: <https://www.apsnet.org/edcenter/disandpath/fungalbasidio/pdlessons/Pages/CoffeeRustspan.aspx>
- Arez, J. L. 2015. Plantas leñosas ornamentales: control de enfermedades producidas por hongos y cromistas. Editorial Mundi-Prensa. España. Pp. 36.
- Arias-Navarro, C. F., Bueno-Durán. A. Y. 2020. Evaluación in vitro de la actividad antifúngica del extracto etanolico de hojas de guanábana (*annona muricata* L) sobre hongos fitopatógenos de mano (*Mangifera indica* L) Cv. ataulfo de potcosecha cultivado en el estado de Nayarit. En: Montalvo G. e., Chacón, L. M. A., Gutiérrez, M. P y Sánchez, B. J. A. (Eds). Anonáceas Plantas antiguas, Estudios recientes. Parte 3. SAMSARA. Instituto Tecnológico de Tepic, Nayarit México. Pp. 86-90
- Arneson, P. A y Ordóñez, M. E. 2011 *Roya del Café. Revista The Plant Health Instructor*. DOI: 10.1094/PHI-I-2000-0718-02.
- Avelino, J y Galileo, R. 2014. La roya anaranjada del cafeto. HAL open science. <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-01071036>. Consultado el 12 de febrero del 2022.
- Barquero-Miranda, M. 2013. Recomendaciones para el Combate de la Roya del Cafeto. 3era edición. Costa Rica.
- Barrance, A., Boshier, D. H., Chamberlain, J., Cordero, J., Detlefsen, G., Finegan, B y Stewart, J. 2003. *Annona reticulata* L. CATIE, Turrialba (Costa Rica) Oxford Forestry Institute, Oxford (RU). Pp 371-376.

- Calzada-Rovirosa, J. E. 2017. Café Mexicano. Planificación agrícola nacional 2017-2030. Secretaria de Agricultura Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) México.
- Canet-Brenes, G., Soto-Viquez, C., Ocampo-Thomason, P., Rivera-Ramírez, J., Navarro-Hurtado, A., Guatemala-Morales, G. M y Villanueva-Rodríguez. S. 2016. La Situación y tendencias de la producción de café en América Latina y El Caribe. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA). Pp. 15-17.
- Castro-Moreno, M., Arrollo-Gómez, S., Sancristobal-Dominguez, T., De-La-Cruz-Chacón, I., Riley-Saldaña, C. A y González-Esquinca, A. R. 2020. Asociaciones estacionales de la actividad Antifúngica de extractos Hexánicos de *annona purpurea* Mociño & Sessé ex Dunal. En: Montalvo G. e., Chacón, L. M. A., Gutiérrez, M. P y Sánchez, B. J. A. (Eds). Anonáceas Plantas antiguas, Estudios recientes. Parte 3. SAMSARA. Instituto Tecnológico de Tepic, Nayarit México. Pp.104-112
- Centro de Estudios de las Finanzas Públicas (CEFP). 2021. El Mercado del café en México. Palacio Legislativo de San Lázaro D.F. Pp. 1-33.
- Centro de estudios para el Desarrollo Rural Sustentable y la Soberanía Alimentaria (CEDRSSA). 2019. Investigación Interna Comercio Internacional del café, el caso de México. Palacio legislativo de San Lázaro México. Pp. 1-11.
- Cerna, C, E., Magaña, A. R., Velázquez, G. J. J., Ochoa, F. Y. M., Cepeda, S. M y Hernández, B. O. 2019. Evaluación de extractos vegetales sobre incidencia y severidad de *Hemileia vastatrix* en cultivo de café. Nota Científica Ecosistemas y Recursos Agropecuarios. 6(18):557-563.
- Chatrou, L. W. (1999). The Annonaceae and the Annonaceae project: a brief overview of the state of affairs. *Acta Horticulturae*, (497): 43-58.
- Chong-Rodríguez, E. A. 2020. Alcaloides antifúngicos de *Sapranthus campechianus* (Kunth) Standl.: Un recurso natural de la biodiversidad

chiapaneca. Tesis de Maestría. Instituto de Ciencias Biológicas. Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas.

Chong-Rodríguez, E. A., Riley-Saldaña, C. A., González-Esquinca, A. R. y De-la-Cruz-Chacón, I. 2015. Actividad antifúngica de *Sapranthus campechianus* (Kunth) Standl (ANNONACEAE). X Congreso de Biotecnología Chiapas. Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas.

Coria-Téllez., A. C., Montalvo-González, E., Yahia, M. E y Obledo-Vázquez, E. N. A. 2018. *Annona muricata*: A comprehensive review on its traditional medicinal uses, phytochemicals, pharmacological activities, mechanisms of action and toxicity. *Arabian Journal of chemistry*, 11(5): 662-691.

Dang, Q. L., Kim, W. K., Nguyen, C. M., Choi, Y. H., Choi, G. J., Jang, K. S., Park, M. S., Lim, C. H., Luu, N. H y Kim, J. C 2011. Nematicidal and antifungal activities of annonaceous acetogenins from *Annona squamosa* against various plant pathogens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59: 11160-11167.

De-la-Cruz-Chacón, I y González-Esquinca, A. R. 2016. Desarrollo temprano y defensas químicas de *Annona macrophyllata* Donn. Smith. (Annonaceae). *Revista Lacandonia*. 10(2): 83-94.

De-la-Cruz-Chacón, I y González-Esquinca, A. R. 2015. Actividad de Anonáceas sobre hongos Fitopatógenos. En: *Annonaceae: tópicos seleccionados*. Coordinadores: J Guedes Da Silva Almeida et al. Editora CRV. Brasil. ISBN: 978-45-444-0513-0. Pp 367-398.

De-la-Cruz-Chacón, I., Castro-Moreno, M., Luna-Cázares, L. M y González-Esquinca, A. R. 2016. La familia Annonaceae Juss. En México. *Revista Lacandonia*. 2(10):71-82.

De-la-Cruz-Chacón, I., Chong-Rodríguez, E. F., Riley-Saldaña, C. A., López-Fernández, N.Y y González-Esquinca, A. R. 2020b. Estudios de la actividad antifúngica de anonáceas de la selva baja caducifolia de Chiapas. En: Montalvo G. e., Chacón, L. M. A., Gutiérrez, M. P y Sánchez, B. J. A. (Eds).

- Anonáceas Plantas antiguas, Estudios recientes. Parte 3. SAMSARA. Instituto Tecnológico de Tepic, Nayarit México. Pp.114-126.
- De-La-Cruz-Chacón, I., Giroto, C. F., Cixeta, S. M., Fernandez, B. C. S y Ferreira, G. 2020a. Anonas endémicas de Brasil: riqueza y potencial biológico. En: Montalvo G. e., Chacón, L. M. A., Gutiérrez, M. P y Sánchez, B. J. A. (Eds). Anonáceas Plantas antiguas, Estudios recientes. Parte 3. SAMSARA. Instituto Tecnológico de Tepic, Nayarit México. Pp. 86-90
- De-la-Cruz-Chacón, I., López-Fernández, N. Y. Riley-Saldaña, C. A., M. Castro-Moreno, M y González-Esquinca A. R. 2019. Antifungal activity in vitro of *Sapranthus microcarpus* (Annonaceae) against phytopathogens. *Acta Botánica Mexicana*. (126): 1-9.
- Escobar-Ocampo, M. C. y S. Ochoa-Gaona. 2007. Estructura y composición florística de la vegetación del parque educativo Laguna Bélgica, Chiapas, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 78(2): 391-419.
- García-Pérez, J. A., Alarcón-Gutiérrez E., y Torres Pelayo, V. D. R. (2021). Extractos acuosos de plantas como inhibidores de la germinación de urediniosporas de *Hemileia vastatrix*; la roya anaranjada del café.
- Global Biodiversity Information Facility. 2022. <https://www.gbif.org/> consultado el 12 de mayo del 2022.
- González-Esquinca, A. R. 2005. La familia Anonáceae en Chiapas y sus metabolitos. En: Ciencia y Tecnología en la Frontera del estado de Chiapas, Patiño, T. E et al. Editorial COCyTECH. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. México.
- González-Esquinca, A. R. 2016. Annonaceae: relevancia biológica de sus atributos químicos. *Revista Lacandonia*. 2(10): 69-70.
- Hernández-Martínez, G y Velázquez-Premio, T. 2016. Análisis integral sobre la roya del café y su control. *Revista Internacional de Desarrollo Sustentable*. 1(1): 92-99.

- Hernández-Martínez, G y Velázquez-Premio, T. 2016. Análisis integral sobre la roya del café y su control. *RINDERESU*, 1(1):92-99.
- Huang, X., Hao, N., Wang, Q., Li, R., Zhang, G., Chen, G y Che, Z. (2022). Non-food bioactive forest product liriodenine: Sources, chemistry, and bioactivities. *Industrial Crops and Products*, 187, 115447.
- Index Fungorum. (2022). An international project to index all formal names in the Fungi kingdom. <http://www.indexfungorum.org/names/Names.asp>. Consultado el 27 de febrero del 2022.
- INEGI, 2021. Ocuilapa de Juárez municipio de Ocozocoautla de Espinoza Chiapas México. <https://www.google.com/intl/es419/earth/>. Fecha de descarga: 23/010/2021. Google Earth Pro.
- Iniciativas de Economía alternativa y solidaria (IDEAS). 2006. El mercado internacional del café. Boletín N° 14. Córdoba España.
- Jamkhande, P. G., y Wattamwar, A. S. 2015. *Annona reticulata* Linn. (Bullock's heart): Plant profile, phytochemistry and pharmacological properties. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 5(3), 144-152.
- Jamkhande, P. G., Wattamwar, A. S., Kankudte, A. D., Tidke, P. S y Kalaskar, M. G. 2016. Assessment of *Annona reticulata* Linn. leaves fractions for invitro antioxidative effect and antimicrobial potential against standard human pathogenic strains. *Alexandria Journal of Medicine*, 52(1), 19-25.
- Lam, G. A. 2019. Actividad antifúngica de extractos de *Baccharis glutinosa* pers. Sobre la roya (*Hemileia vastratix*) del cafeto: enfoque metabólico y génico. Tesis de doctorado en ciencias de los alimentos y biotecnología. Instituto Tecnológico De Tuxtla Gutiérrez.
- León, W. J. 2007. Anatomía xilemática de 26 especies de la familia Annonaceae en Venezuela. *Revista forestal venezolana*, 51(2), 165-177.

- Li, H. T., Wu, H. M., Chen, H. L., Liu, C. y Chen, C. Y. (2013). The pharmacological activities of anonaine". *Molecules* (Basel, Switzerland). 18 (7): 8257–63. doi:10.3390/molecules18078257. PMC 6270643. PMID 23857128.
- López, B. O., Ramírez. G, S. I., Ramírez, G., M., González, M. O., Espinosa, Z. S y Villarreal, F. J. M. 2009. Extractos de *Thymus vulgaris* y *Heliotropium indicum* sobre el crecimiento *in vitro* de *Phytophthora palmivora* (Butler) en cacao (*Theobroma cacao* L.). *Qué hacer Científico en Chiapas*. 1(8): 44-51.
- López, J. M., Marín-Ramírez, G., Gaitán, A y Ángel, C. A. 2018. Diagrama de Área Estándar para la estimación visual de severidad de roya del cafeto. *Avances Técnicos Cenicafé*, 498, 1–8
- Luna-Cazáres, L, M y González-Esquinca, A. R. 2015. La chincuya (*Annona purpurea* Moc. & Sessé Ex Dunal): una planta mesoamericana. En: Vidal-Lezama, E.; Vidal M. N. A.; Vidal H. L. (Eds). *Anonáceas. Plantas antiguas. Estudios recientes. Parte 2*. Universidad Autónoma Chapingo. Versión electrónica. Chapingo, Texcoco, Edo. de México. Pp. 229-248.
- Maas, P. J. M., Westra, L. Y. T., Rainer, H., Lobão, A. Q y Erkens, R. H. J. 2011. An updated index to genera, species, and infraspecific taxa of Neotropical Annonaceae. *Nordic Journal of Botany*, 29(3): 257-356.
- Martínez-Velarde, M. F y Fonseca, R. M. 2017. Flora de Guerrero no. 73: Annonaceae. Univesidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Ciencias México, D.F Pp. 1-56.
- Morales, A. A. M., Martínez, G. M. S., López, A. V., Ortiz, G. R., Trejo, S. L., y Hidalgo, E. C. 2021. Uredospore germination of *Hemileia vastatrix* and its inhibition by the effect of plant extracts *in vitro*. *Ciencia e investigación agraria: revista latinoamericana de ciencias de la agricultura*, 48(2), 108-114.
- Orozco-Castillo, J. A., Cruz-Ortega, R., Martinez-Vázquez, M y González-Esquinca, A. R. 2016. Aporphine alkaloid contents increase with moderate nitrogen

- supply in *Annona diversifolia* Saff. (Annonaceae) seedlings during diurnal periods. *Natural Product Research*, 30(19): 1-2.
- Palomares-Reyes, J. A., González-Sánchez, J. D. y Mireles-Rangel, S. C. 2012. Investigación: Café orgánico en México. <http://infocafes.com/portal/wp-content/uploads/2017/05/cafe-organico-terminado.pdf>. Consultado el 12 de marzo del 2022.
- Pereira, R. B., Lucas, G. C., Perina, F. J., y Alves, E. 2012. Essential oils for rust control on coffee plants. *Ciencia y Agrotecnología*, 36, 16-24.
- Pérez-Alonso, N y Jiménez, E. 2011. Producción de metabolitos secundarios de plantas mediante el cultivo in vitro. *Reseña científica, Biotecnología Vegetal*, 4(11): 195 – 211.
- Ramírez-Méndez, R., Arenas-de-Moreno, I., Acosta K., Yamarte, M., Sandoval, L. 2012. Efecto del escaldado sobre sobre la calidad nutricional de pulpa de guanábana (*annona muricata* L) *Revista Iberoamericana de Tecnología Poscosecha*, 13(1): 48.57.
- Riley-Saldaña, C. A., Cruz-Ortega, M. R., Martínez, V. M., De-la-Cruz-Chacón, I., Castro-Moreno M y Alma Rosa González-Esquinca, A R. 2017. Acetogenins and alkaloids during the initial development of *Annona muricata* L. (Annonaceae). *Naturforsch.* 72(11–12):497–506.
- Rivas-Cacsire, V. D. 2006. Extracción de alcaloides a partir de la corteza y hojas de la guanábana. Tesis de ingeniería química. Universidad Nacional del Callao Facultad de Ingeniería Química.
- Rodríguez-Peña, R. 2021. Eficacia de aceites esenciales de plantas de la familia Myrtaceae en el control de la roya de café (*Hemileia vastatrix* Berk. & Broom). *Revista Agropecuaria forestal*, 10(2), 69-82.
- Rojo-Jiménez, E y Pérez-Urria. C. E. 2015. Café I (G. Coffea). *Revista Reduca* (biología). 7 (2): 113-132.

- Santos, S. N. F y Ordaz, D. E. 2017. Actividad antioxidante, antifúngica y caracterización de metabolitos de las semillas de *Annona purpurea*. Tesis de Maestro en Ciencias: Productos Naturales y Alimentos. Universidad Tecnológica de la Mixteca, Huajuapán de León, Oaxaca.
- Schatz, G. E., Maas, P. J. M., Maas-van, K. H., Westra, L. Y. T y Wieringa, J. J. 2018. Revision of the Neotropical genus *Sapranthus* (Annonaceae). *Revista Blumea*. 1 (63): 54 – 66
- SENASICA, 2016. Roya del cafeto (*Hemileia vastatrix* Berkeley & Broome). Dirección General de Sanidad Vegetal. Programa de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria. México, D.F. Ficha Técnica No. 40. 23 p
- Silva, J., Souza, P.E., Monteiro, F.P., Freitas, M.L.O., Silva, M.B, y Belan, L.L. 2014. Actividad antifúngica mediante extractos de plantas medicinales contra patógenos del cafeto. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*. 3(16):539- 544.
- Talhinhas, P., Batista, D., Diniz, I., Vieira, A., Silva, D. N., Loureiro, A y Do Céu Silva, M. 2017. The coffee leaf rust pathogen *Hemileia vastatrix*: one and a half centuries around the tropics. *Molecular plant pathology*, 18(8), 1039.
- Torres, O., Santafé, G., Angulo, A., Villa, H., Zuluaga, J y Doria, M. 2007. Obtención de alcaloides a partir de corteza y madera de la especie *Rollinia pittieri* (ANNONACEAE) *Scientia Et Technica*, 33(13): 333-336.
- Vidal. H., Vidal-Lezama, E y Vidal M. N. A. 2020. Anonáceas. Plantas antiguas. Estudios recientes. Parte 2. Universidad Autónoma Chapingo. Versión electrónica. Chapingo, Texcoco, Edo. de México. Pág. 1.
- Vidal-Lezama, E., Sáenz, P. C. A., Curiel, R. A., Segura L. S. D., Cuevas, S. J y Campos, R. E. 2020. Propagación sexual de cinco especies de anonáceas. una breve revisión. En: Montalvo G. e., Chacón, L. M. A., Gutiérrez, M. P y Sánchez, B. J. A. (Eds). Anonáceas Plantas antiguas, Estudios recientes. Parte 3. SAMSARA. Instituto Tecnológico de Tepic, Nayarit México. Pp.73-109.

- Vidal-Lezama, E., Villegas-Monter, A., Vaquera-Huerta, H., Robledo-Paz, A y Martínez-Palacios, A. 2018. *Annona purpurea* Moc. & Sessé ex Dunal especie nativa de México, subutilizada. *Agroproductividad*: 12(3): 9-15.
- Virginio-Filho, E M, y Astorga, D. C. 2015. Prevención y control de la roya del café. Manual de buenas prácticas para técnicos y facilitadores. Serie Técnica. Manual Técnico, no. 131.
- WFO. La flora mundial en línea. 2022. *Coffea arabica* L. Publicado en Internet; <http://www.worldfloraonline.org/taxon/wfo-0000910097>. Consultado el 15 de abril del 2022.
- Yamarte, M., Marín, M., Bautista, D y Avilán. L. 2006. Características del crecimiento de las ramas del guanábano (*Annona muricata* L.) bajo las condiciones de un bosque muy seco tropical. *Revista de la Facultad de Agronomía*.1 (23): 1-16.