

Biofungicides evaluation in two coffee cultivars for *Hemileia vastatrix* control

Evaluación de biofungicidas en dos variedades de café para el control de *Hemileia vastatrix*

Marja Liza Fajardo-Franco, Martin Aguilar-Tlatelpa, Posgrado en Manejo Sustentable de Recursos Naturales, Universidad Intercultural del Estado de Puebla, Calle Principal a Lipuntahuaca S/N, Lipuntahuaca, Huehuetla, Puebla, CP 73475, México; **Remigio A. Guzmán-Plazola***, Posgrado en Fitosanidad-Fitopatología, Campus Montecillo. Colegio de Postgraduados, Km 36.5 Carretera México-Texcoco, Montecillo, Texcoco, Estado de México, CP 56230. *Autor para correspondencia: rguzman@colpos.mx

Recibido: 08 de Enero, 2020.

Aceptado: 12 de Abril, 2020.

Fajardo-Franco ML, Aguilar-Tlatelpa M and Guzmán-Plazola RA. 2020. Biofungicides evaluation in two coffee cultivars for *Hemileia vastatrix* control. Mexican Journal of Phytopathology 38(2).

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.2001-1

Primera publicación DOI: 20 de Abril, 2020.

First DOI publication: April 20, 2020.

Resumen. El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de biofungicidas elaborados con *Azadirachta indica*, *Melaleuca alternifolia* y la combinación de *Bacillus subtilis* con *A. indica* y *Syzygium aromaticum*, en el control de la roya causada por *Hemileia vastatrix*, en las variedades Garnica y Typica. Se establecieron experimentos en condiciones de campo en tres localidades: Lipuntahuaca, Chilocoyo y Cinco de Mayo, con plantas de cinco meses de edad. Se encontraron diferencias significativas entre biofungicidas y el testigo para la incidencia ($P=0.04$), área bajo la curva del

Abstract. The objective of this study was to evaluate the effect of biofungicides made with *Azadirachta indica*, *Melaleuca alternifolia* and *Bacillus subtilis* plus *A. indica* plus *Syzygium aromaticum*, for the control of coffee rust caused by *Hemileia vastatrix* in cultivars Garnica and Typica. The experiments were established under field conditions in three localities: Lipuntahuaca, Chilocoyo and Cinco de Mayo, using five-month old plants. Significant differences were found between biofungicides and the control for incidence ($P=0.04$), area under the disease progress curve (AUDPC) ($P=0.04$), and apparent infection rate ($P=0.03$). No differences were found in severity except in the last evaluation. *M. alternifolia* induced the lowest values of incidence (34.4%), AUDPC (61.8) and apparent infection rate (0.028), with percentages of reduction regarding the control of 20.9, 14.2 and 39.1%, respectively. There were no significant differences between the Typica and Garnica cultivars for incidence and severity. The experimental plants in Lipuntahuaca had lower

progreso de la severidad (ABCPE) ($P=0.04$) y tasa de infección aparente ($P=0.03$). No se encontraron diferencias en severidad excepto en la última evaluación. *M. alternifolia* indujo los valores más bajos de incidencia (34.4 %), ABCPE (61.8) y tasa de infección aparente (0.028), con porcentajes de reducción con respecto al testigo de 20.9, 14.2 y 39.1%, respectivamente. No se presentaron diferencias significativas entre las variedades Typica y Garnica para incidencia y severidad. Las plantas de la localidad de Lipuntahuaca tuvieron menor incidencia (26.9%) y severidad (2.3%) en comparación con Chilocoyo y Cinco de Mayo con 51.5 y 44.5 % (incidencia) y 4.2 y 3.4% (severidad), respectivamente ($P<0.0001$). Los biofungicidas no suprimieron la infección, pero los resultados sugieren que debe continuarse la investigación en este patosistema.

Palabras clave: Severidad, incidencia, roya, *Coffea arabica*, fungicidas botánicos.

El café es uno de los cultivos más importantes en el mundo, debido a que es crucial para la economía de al menos 60 países y es la principal fuente de ingresos de 100 millones de personas (Talhinhas *et al.*, 2017). En México, este cultivo es estratégico ya que en su producción se emplean 500 000 productores en 14 estados y 480 municipios (SAGARPA, 2017). Los principales estados productores de café cereza son Chiapas (357 733 t), Veracruz (192 341 t) y Puebla (112 228 t). En este último, el valor de la producción asciende a 778 526 miles de pesos (SIAP, 2018). Sin embargo, el cultivo es afectado por la roya, enfermedad causada por el hongo *Hemileia vastatrix*. Los síntomas de la enfermedad se observan en hojas, inicialmente como manchas cloróticas que se tornan necróticas con el avance de la infección. El efecto varía desde defoliación menor

incidencia (26.9%) and severity (2.3%) compared to Chilocoyo and Cinco de Mayo, with a 51.5 and 44.5% (incidence) and 4.2 and 3.4% (severity), respectively ($P<0.0001$). The biofungicides did not suppress the infection but the results suggest that research in this pathosystem should be continued.

Key words: Severity, incidence, coffee rust, *Coffea arabica*, botanical fungicides.

Coffee is one of the most important crops around the world because it is crucial for the economy of at least 60 countries and the major source of income for 100 million people (Talhinhas *et al.*, 2017). In Mexico, coffee is a strategic crop since its production employs more than 500,000 producers from 14 states and 480 municipalities (SAGARPA, 2017). The major coffee cherry producing states are Chiapas (357 733 t), Veracruz (192 341 t) and Puebla (112 228 t). In Puebla, coffee production is valued at 778 526 thousand pesos (SIAP, 2018). However, the coffee crop is affected by rust, a disease caused by *Hemileia vastatrix*. The disease symptoms appear on coffee leaves, initially in the form of chlorotic spots that become necrotic as the infection advances. The effect varies from slight defoliation to up 50% yield loss (Avelino *et al.*, 2015, Zambolim, 2016; Talhinhas *et al.*, 2017). Preventive and systemic fungicides containing copper, epoxiconazole or pyraclostrobin are applied in the diverse coffee producing regions to control the pathogen (Zambolim, 2016; Talhinhas *et al.*, 2017). In Mexico, SENASICA ran a control program based on a successful Surveillance System that contained the 2012-2013 regional epidemic outbreak (PVEF-CAFETO, 2018). In the Sierra Norte de Puebla, coffee is traditionally grown with minimum use of inputs, which means that production is under organic management. However, this has

hasta pérdida del 50% en el rendimiento (Avelino *et al.*, 2015, Zambolim, 2016; Talhinhos *et al.*, 2017). La aplicación de fungicidas preventivos y sistémicos que contienen cobre, epoxiconazol o pyraclostrobin es la principal forma de control del patógeno en las diversas regiones productoras (Zambolim, 2016; Talhinhos *et al.*, 2017). En México, el SENASICA impulsó un programa de control basado en un exitoso Sistema de Vigilancia que logró la contención epidémica regional del brote epidémico de 2012-2013 (PVEF-CAFETO, 2018). En la Sierra Norte de Puebla, la cafecultura se realiza tradicionalmente con un uso mínimo de insumos, lo que ha propiciado que la producción se oriente hacia el manejo orgánico, pero ha favorecido que la enfermedad se presente año tras año, causando pérdidas variables en la producción. Las variedades comúnmente utilizadas son Typica, Garnica y Mundo Novo (Benitez-García *et al.*, 2015). Diversas investigaciones han demostrado el uso potencial de biofungicidas. Estos productos son elaborados a partir de plantas y microorganismos para el control de hongos. En México se ha identificado a *Acremonium byssoides*, *Calcarisporium arbuscula*, *C. ovalisporum*, *Sporothrix guttuliformis*, *Fusarium pallidorosum*, *Verticillium lecanii*, *Simplicillium* sp. y *Lecanicillium* sp. con potencial para controlar a *H. vastatrix* (Carrión y Rico-Gray, 2002; Gómez-De La Cruz *et al.*, 2018). Otros estudios realizados en condiciones de invernadero y laboratorio han indicado el potencial de biofungicidas formulados a partir de *Cinnamomum zeylanicum*, *Cymbopogon nardus*, *Cymbopogon citratus*, *Corymbia citriodora*, *Melaleuca alternifolia*, *Thymus vulgaris*, *Azadirachta indica*, *Syzygium aromaticum* y *Allium sativum* para el control de *H. vastatrix*. Este tipo de productos representa una alternativa de manejo para la producción de café orgánico, el cual es valorado a nivel mundial (Borges *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2014). Su aplicación en el control de la

contributed to the disease occurring year after year, causing variable production losses. The varieties most commonly cultivated are Typica, Garnica and Mundo Novo (Benitez-García *et al.*, 2015). Diverse studies have demonstrated the potential use of biofungicides. These products are made from plants and microorganisms fungi control. In Mexico, *Acremonium byssoides*, *Calcarisporium arbuscula*, *C. ovalisporum*, *Sporothrix guttuliformis*, *Fusarium pallidorosum*, *Verticillium lecanii*, *Simplicillium* sp. and *Lecanicillium* sp. have been identified as having the potential to control *H. vastatrix* (Carrión and Rico-Gray, 2002; Gómez-De La Cruz *et al.*, 2018). Other studies conducted under greenhouse and laboratory conditions have indicated the potential of biofungicides based on *Cinnamomum zeylanicum*, *Cymbopogon nardus*, *Cymbopogon citratus*, *Corymbia citriodora*, *Melaleuca alternifolia*, *Thymus vulgaris*, *Azadirachta indica*, *Syzygium aromaticum* and *Allium sativum* to control *H. vastatrix*. This kind of products offer a management alternative for the production of organic coffee, which is valued worldwide (Borges *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2014). The use of biofungicides to control rust is a low cost and low environmental impact option that reduces the risk for *H. vastatrix* to develop resistance compared to the use of synthetic fungicides (Avelino *et al.*, 2015; Ibañez and Blackman, 2016; Talhinhos *et al.*, 2017). However, it is necessary to analyze the effect that formulations based on plants or microorganisms have on disease progress in the field in order to come up with recommendations that can be incorporated into integrated management practices. For this reason, the objective of the present study was to evaluate the effectiveness of biofungicides based on *Azadirachta indica* (neem), *Melaleuca alternifolia* (tea tree) and the combination of *Bacillus subtilis* with *Azadirachta indica* and *Syzygium aromaticum* (clove) to control rust caused by *H. vastatrix* on

roya es una opción de bajo costo y menor impacto ambiental, con menor riesgo en la generación de resistencia de *H. vastatrix*, en comparación con el uso de fungicidas sintéticos (Avelino *et al.*, 2015; Ibañez y Blackman, 2016; Talhinhos *et al.*, 2017). Sin embargo, es necesario analizar el efecto de formulaciones elaboradas a partir de plantas o de microorganismos en el progreso de la enfermedad bajo condiciones de campo para generar recomendaciones que puedan incorporarse a las prácticas de manejo integrado. Por tal motivo, el objetivo del presente estudio fue evaluar la efectividad de biofungicidas elaborados con *Azadirachta indica* (neem), *Melaleuca alternifolia* (árbol de té) y la combinación de *Bacillus subtilis* con *Azadirachta indica* y *Syzygium aromaticum* (clavo) en el control de la roya causada por *H. vastatrix* en dos variedades de café.

En 2017, se establecieron experimentos en tres localidades del municipio de Huehuetla, Puebla: a) Lipuntahuaca (20° 04' N y 97° 37' O; 546 msnm), b) Chilocoyo (20° 04' N y 97° 39' O; 907 msnm) y c) Cinco de Mayo (20° 07' N y 97° 37' O; 608 msnm). En este municipio se tiene una precipitación anual de 2900 a 3600 mm, la precipitación del mes más seco es mayor de 40 mm y presenta un clima semicálido húmedo, con un rango de temperatura de 18 a 24 °C (INEGI, 2009). En cada experimento se evaluó el efecto de tres biofungicidas en plantas de café de las variedades Garnica y Typica (Cuadro 1).

Los experimentos se desarrollaron en condiciones de campo, en sitios rodeados con parcelas de café sin aplicación de fungicidas, donde la enfermedad se presenta año tras año. Se utilizaron plantas procedentes de vivero, con cinco meses de edad desde la siembra en el semillero, sin tratamiento con fungicidas. La infección fue natural. Los experimentos en cada localidad se establecieron en un diseño de tratamientos de parcelas subdivididas con tres repeticiones (Villaseñor-Mir *et*

two coffee tree varieties.

In 2017, experiments were established at three sites in the Huehuetla municipality, Puebla: a) Lipuntahuaca (20° 04' N and 97° 37' W; 546 masl); b) Chilocoyo (20° 04' N and 97° 39' W; 907 masl); and c) Cinco de Mayo (20° 07' N and 97° 37' W; 608 masl). In this municipality, annual precipitation is 2900-3600 mm; the precipitation in the driest month is higher than 40 mm, which is a semi-warm and humid climate where the temperature varies from 18 to 24 °C (INEGI, 2009). The effect of three biofungicides on coffee plants of the Garnica and Typica varieties was evaluated in each experiment (Table 1).

The experiments were established in the field in sites surrounded by coffee tree fields to which no fungicides were applied and where the disease occurs year after year. Five-month old plants grown in seedbeds with no fungicide treatment were taken from the nursery for the experiment. Infection was natural. The experiments in each location were established using a treatment design of subdivided plots with three replications (Villaseñor-Mir *et al.*, 2012). Locations were established in the large plot (3), treatments with and without biofungicide in the intermediate plot (4), and Garnica and Typica (2) in the small plots (Villaseñor-Mir *et al.*, 2012; Santa-Rosa *et al.*, 2016). Each experiment unit consisted of three plants. Each location had nine plants of each variety per treatment, for a total of 18 plants of the two varieties in each treatment. Disease progress was monitored on all the leaves of each of the 72 plants per location.

The infection caused by *H. vastatrix* occurred naturally. The first signs and symptoms were observed by inspecting the leaves with a 40 X magnifying glass and under a stereoscopic and compound microscope (SENASICA, 2019). The disease progress was monitored by conducting seven evaluations and estimating the following variables (Campbell and Neher, 1994): 1) Incidence,

Cuadro 1. Biofungicidas evaluados para el control de la roya del café en Huehuetla, Puebla.
Table 1. Biofungicides evaluated to control coffee rust in Huehuetla, Puebla.

Biofungicida	Nombre comercial	Composición	Dosis aplicada
BA+AI+SA	Roya Out®	50% de <i>Bacillus subtilis</i> (1x10 ⁸ ufc mL ⁻¹), 2.5% de <i>Azadirachta indica</i> , 2.5% de <i>Syzygium aromaticum</i>	1.5 L ha ⁻¹
AI	Biogeneser®	<i>Azadirachta indica</i>	2.0 L ha ⁻¹
MA	Timorex Gold®	23.8% de aceite de <i>Melaleuca alternifolia</i> , equivalente a 222.5 g de i.a. L ⁻¹	1.5 L ha ⁻¹
TE	-----	-----	Testigo, sin aplicación

La aplicación de los biofungicidas se realizó con aspersoras manuales de mochila (Antarix modelo AS-18) con boquilla de abanico, cada 22 días (A1= 06 de abril, A2= 28 de abril y A3=20 de mayo), con un total de tres aplicaciones. Las dosis corresponden a la recomendación del fabricante / The biofungicides were applied every 22 days (A1= 06 April, A2= 28 April and A3=20 May) using manual backpack sprayers (Antarix model AS-18) with a fan nozzle. A total of three applications were made. The doses were applied following the manufacturer's recommendations.

al., 2012). En la parcela grande se establecieron las localidades (3), en la mediana los tratamientos con y sin biofungicida (4), mientras que en las parcelas chicas estuvieron las variedades (Garnica y Typica) (2) (Villaseñor-Mir *et al.*, 2012; Santa-Rosa *et al.*, 2016). Cada unidad experimental estuvo constituida por tres plantas; en cada localidad se contó con nueve plantas por tratamiento en cada variedad, considerando las dos variedades se tuvieron 18 plantas en cada tratamiento. Se dio seguimiento al progreso de la enfermedad en 72 plantas por localidad, en todas las hojas de cada planta.

La infección por *H. vastatrix* se produjo de manera natural; la confirmación de los primeros signos y síntomas fue mediante la inspección de hojas con una lupa de 40 X y observaciones en el microscopio estereoscópico y compuesto (SENASICA, 2019). Se dio seguimiento al progreso de la enfermedad mediante siete evaluaciones y la estimación de las siguientes variables (Campbell y Neher, 1994): 1) Incidencia, calculada como el porcentaje de hojas enfermas respecto al total de hojas por planta; 2) Severidad en hoja, calculada como el porcentaje de área foliar dañada en cada hoja de la planta mediante una escala diagramática (SINAVEF, 2013);

calculated as the percent of infected leaves compared to the total of leaves per plant; 2) severity in leaves, calculated as the percent of damaged foliar area on each leaf using a diagrammatic scale (SINAVEF, 2013); 3) total severity, evaluated based on the average severity observed on each leaf of the plant, on each evaluation date.

The disease was evaluated two days after the first application (dpa), at eight dpa, 16 dpa, 29 dpa, 36 dpa, 43 dpa and at 51 dpa. Based on the total severity values, the area under the disease progress curve was estimated (AUDPC) (Simko and Piepho, 2012) by the following equation:

$$ABCPE = \sum_{i=1}^{n-1} \frac{(Y_i + Y_{i+1})}{2} * (t_{i+1} - t_i)$$

AUDPC

Where:

Y_i= disease intensity

t= evaluation period (time)

n= number of evaluations

The incidence and severity data were subjected to a validation of assumption of normality using Shapiro-Wilk's test and homogeneity of variance

3) Severidad total, evaluada mediante el promedio de la severidad observada en cada una de las hojas en la planta, en cada fecha de evaluación.

La evaluación de la enfermedad se realizó a los dos días después de la primera aplicación (dpa), a los ocho dpa, 16 dpa, 29 dpa, 36 dpa, 43 dpa y a los 51 dpa. Con los valores de severidad total se estimó el área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE) (Simko y Piepho, 2012) expresada en la siguiente ecuación:

$$ABCPE = \sum_{i=1}^{n-1} \frac{(Y_i + Y_{i+1})}{2} * (t_{i+1} - t_i)$$

Donde:

Y_i = intensidad de la enfermedad

t = periodo de evaluación (tiempo)

n = número de evaluaciones

Los datos de incidencia y severidad se sometieron a la comprobación de los supuestos de normalidad mediante la prueba de Shapiro-Wilk y de homogeneidad de varianzas mediante la prueba de Levene (Zar, 1999). Al no resultar datos normales, los porcentajes de incidencia y severidad fueron transformados al arcoseno de la raíz cuadrada del valor porcentual. Los datos transformados fueron sometidos a un análisis de varianza con el procedimiento ANOVA en el paquete estadístico SAS versión 9.4 (Statistical Analysis System, Cary, North Carolina) para identificar las diferencias entre localidades y tratamientos, así como las interacciones. Adicionalmente, se realizaron análisis de varianza por cada fecha de evaluación. Las medias se compararon mediante la prueba de rangos múltiples de Duncan ($p \leq 0.05$) (Steel y Torrie, 1985). El análisis incluyó el ANOVA del área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE) con base en la severidad estimada a partir de los datos transformados, así como la estimación de la tasa de infección

using Levene's test (Zar, 1999). Since the tests indicated that the data were not normal, the incidence and severity percents were converted to the arcsine square root of the percent value. The transformed data were subjected to an analysis of variance using ANOVA with the SAS statistical program version 9.4 (Statistical Analysis System, Cary, North Carolina) to identify the differences between locations and treatments, as well as the interactions. In addition, analyses of variance were conducted for each evaluation date. The means were compared using Duncan's multiple range test ($p \leq 0.05$) (Steel and Torrie, 1985). The analysis included ANOVA of the area under the disease progress curve (AUDPC) based on the severity which was estimated using the transformed data, as well as the estimation of the apparent infection rate with the transformed percentages of infected foliar area using $\ln(x/(1-x))$ and considering the time during which the disease was monitored (APS, 2019).

Statistically significant differences ($p \leq 0.01$) among locations and biofungicides were observed for both rust incidence and severity. However, there were no differences in the rust incidence among the varieties, although the analysis of variance showed differences in severity (Table 2). At two dpa, the control plants and the plants treated with a mixture of *B. subtilis* + *A. indica* + *S. aromaticum* showed 9.5% and 8.7% incidence values, respectively, followed by the plants that were treated with *A. indica* (14.2%) and *M. alternifolia* (18.9%) (Figure 1A). This pattern was also observed at eight dpa and was more associated with natural expression of the disease on aggregation spots than to the effect of the biofungicides (Quiñones-Valdéz *et al.*, 2015). Starting at 16 dpa, the incidence levels increased in all the treatments, but no significant differences were detected. However, the apparent infection rate (r) made it possible to differentiate the level of the

aparente con la transformación de los porcentajes del área foliar dañada mediante $\ln(x/(1-x))$ y considerando el tiempo de seguimiento de la enfermedad (APS, 2019).

Se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.01$) entre localidades y biofungicidas ($p \leq 0.05$) tanto para la incidencia de la roya como para la severidad. Sin embargo, no se observaron diferencias entre variedades respecto a la incidencia de la roya, aunque el análisis de varianza indicó diferencias para la severidad (Cuadro 2). A los dos dpa las plantas testigo y las tratadas con la mezcla de *B. subtilis* + *A. indica* + *S. aromaticum* tuvieron valores de incidencia de 9.5% y 8.7%, respectivamente, seguidas de las plantas tratadas con *A. indica* (14.2%) y *M. alternifolia* (18.9%) (Figura 1A). Este patrón se observó también a los ocho dpa

disease progress between 8 dpa and 16 dpa in each treatment, where the highest rate of infection was observed in plants that were sprayed with a mixture of *B. subtilis* + *A. indica* + *S. aromaticum* ($r=0.16$), followed by the control ($r=0.14$), by plants treated with *A. indica* ($r=0.08$) and by plants treated with *M. alternifolia* ($r=0.04$). This indicates that the biofungicide based on *M. alternifolia* reduced the disease progress compared to the other treatments.

Starting at 29 dpa and up to 51 dpa, the plants treated with *M. alternifolia* had the lowest level of rust incidence ($p \leq 0.05$ on each evaluation date) compared to the other treatments. This behavior was observed in both varieties and could have been caused by the accumulated effect of the first and second biofungicide applications. At 51 dpa, the incidence in plants treated with *M. alternifolia*

Cuadro 2. Efecto de tres biofungicidas sobre la incidencia y severidad en dos variedades de café en tres localidades de Huehuetla, Puebla.

Table 2. Effect of three biofungicides on the disease incidence and severity on two coffee varieties at three locations in Huehuetla, Puebla.

FV	GL	INC	SEV
LOC	2	1407.7 **	51.9**
REP (LOC)	4	5.8 ns	3.6 ns
BIO	3	113.8 *	19.7 *
LOC*BIO	6	71.7 ns	16.7 ns
REP*BIO(LOC)	18	29.3 ns	5.4 ns
VAR	1	104.8 ns	45.9 *
LOC*VAR	2	18.8 ns	3.6 ns
BIO*VAR	3	22.5 ns	9.9 ns
LOC*BIO*VAR	6	47.8 ns	12.5 ns
Error	23	34.9	7.2

La incidencia y severidad se transformaron al arcoseno de la raíz cuadrada antes del análisis. ns= no significativo; *=significativo ($p \leq 0.05$); **=altamente significativo ($p \leq 0.01$). FV=Fuente de variación; GL=grados de libertad; INC=incidencia; SEV=severidad; LOC=Localidad; REP=repeticón; BIO=Biofungicida; VAR=variedad / The incidence and severity were transformed to the arcsine square root before the analysis. ns= not significant; *=significant ($p \leq 0.05$); **=highly significant ($p \leq 0.01$). FV=Source of variation; GL=degrees of freedom; INC=incidence; SEV=severity; LOC=Location; REP=replication; BIO=Biofungicide; VAR=variety.

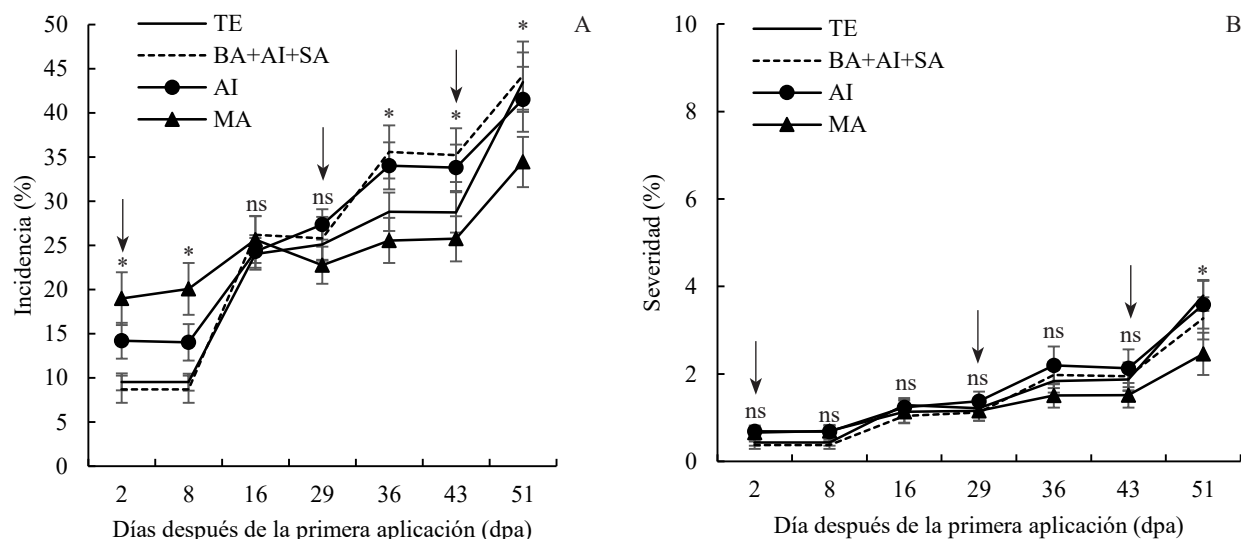


Figura 1. Progreso de la roya causada por *Hemileia vastatrix* en plantas jóvenes de café tratadas con biofungicidas en condiciones de campo en Huehuetla, Puebla. A) Incidencia, B) Severidad total. La incidencia y severidad total se compararon estadísticamente con valores transformados (* = $p \leq 0.05$; ns=no significativo). En la figura se presentan valores no transformados. La flecha indica el momento de la aplicación de fungicida. TE=Testigo, AI= *Azadirachta indica*, MA=*Melaleuca alternifolia* y BA+AI+SA= *Bacillus subtilis* + *A. indica* + *Syzygium aromaticum*. Las barras representan el error estándar de la media en cada evaluación.

Figure 1. Progress of rust caused by *Hemileia vastatrix* in young coffee plants treated with biofungicides in the field, in Huehuetla, Puebla. A) Incidence, B) Total severity. Total incidence and severity were statistically compared by using the transformed values (* = $p \leq 0.05$; ns=not significant). The figure shows the non-transformed values. The arrow indicates the time when the fungicide was applied. TE=Control, AI= *Azadirachta indica*, MA=*Melaleuca alternifolia* and BA+AI+SA= *Bacillus subtilis* + *A. indica* + *Syzygium aromaticum*. The bars represent the standard error of the mean of each evaluation.

y estuvo más asociado a la expresión natural de la enfermedad en focos de agregación que al efecto de los biofungicidas (Quiñones-Valdéz *et al.*, 2015). A partir de los 16 dpa, los niveles de incidencia incrementaron en todos los tratamientos, pero no se detectaron diferencias significativas. Sin embargo, la tasa de infección aparente (r) permitió diferenciar el nivel de avance de la enfermedad entre los ocho dpa y 16 dpa en cada tratamiento, donde la mayor tasa de infección se observó en las plantas asperjadas con la mezcla de *B. subtilis* + *A. indica* + *S. aromaticum* ($r=0.16$), seguidas del testigo ($r=0.14$), las tratadas con *A. indica* ($r=0.08$) y las tratadas con *M. alternifolia* ($r=0.04$). Lo anterior indica que el biofungicida elaborado con *M. alternifolia* disminuyó el avance de la enfermedad en comparación con los demás tratamientos.

was 34.4%, while the incidence in the controls was 43.5%; the differences in the final incidence between the control plants and the plants sprayed with *B. subtilis* + *A. indica* + *S. aromaticum* (44.2%) and *A. indica* (41.5%) were not significant (Figure 1A).

These results indicate that the application of the biofungicide made of *M. alternifolia* reduced the infection caused by the fungus on leaves and at the plant level at the three locations. Similar results were reported by Borges *et al.* (2012), who observed a lower level of coffee rust incidence when they applied essential *M. alternifolia* oils compared to the controls and the plants sprayed with *A. indica*. Regarding the total severity, starting at 16 dpa and up to 51 dpa, the plants treated with *M. alternifolia* showed a lower level of severity with values of less

A partir de los 29 dpa y hasta los 51 dpa, las plantas tratadas con *M. alternifolia* fueron las que presentaron la menor incidencia de roya ($p \leq 0.05$, en cada fecha de evaluación) en comparación con los otros tratamientos. Este comportamiento se observó en ambas variedades y pudo deberse al efecto acumulado de la primera y segunda aplicación de este biofungicida. A los 51 dpa la incidencia de las plantas tratadas con *M. alternifolia* fue de 34.4%, mientras que en las plantas testigo fue de 43.5%; mientras que las diferencias en la incidencia final entre las plantas testigo y las asperjadas con *B. subtilis* + *A. indica* + *S. aromaticum* (44.2%) y *A. indica* (41.5%) no fueron significativas (Figura 1A).

Estos resultados, indican que la aplicación del biofungicida formulado con *M. alternifolia* redujo la infección del hongo entre las hojas y a nivel de planta en las tres localidades. Resultados similares fueron reportados por Borges *et al.* (2012), quienes observaron una reducción de la incidencia de la roya del cafeto al aplicar aceites esenciales de *M. alternifolia* en comparación a las plantas testigo y a las plantas asperjadas con *A. indica*. Respecto a la severidad total, a partir de los 16 dpa y hasta los 51 dpa las plantas tratadas con *M. alternifolia* presentaron menor severidad, con valores menores a 2.5%. Mientras que las plantas tratadas con la mezcla de *B. subtilis* + *A. indica* + *S. aromaticum*, así como las tratadas con *A. indica* y el testigo alcanzaron severidades entre 3.2 y 3.8%. Las diferencias de los valores de severidad entre tratamientos no fueron significativas desde los 2 dpa y hasta los 43 dpa. Sin embargo, en la última evaluación (51 dpa), se observaron diferencias significativas entre los tratamientos ($p \leq 0.05$), donde las plantas testigo alcanzaron los mayores valores de severidad (3.8%), seguidas de las plantas tratadas con *B. subtilis* + *A. indica* + *S. aromaticum* y las tratadas con *A. indica* con severidades de 3.3% y 3.6% respectivamente, los que a su vez fueron iguales estadísticamente

than 2.5%. The plants treated with a mixture of *B. subtilis* + *A. indica* + *S. aromaticum*, and the plants treated with *A. indica* and the control plant had 3.2 and 3.8% severity. The differences in the severity values among treatments were not significant from 2 dpa and up to 43 dpa. However, in the last evaluation (51 dpa), significant differences were observed among the treatments ($p \leq 0.05$), because the control plants reached the highest severity values (3.8%), followed by the plants treated with *B. subtilis* + *A. indica* + *S. aromaticum* and the plants treated with *A. indica* that had 3.3% and 3.6% severity, respectively; these were, in turn, statistically the same ($p \leq 0.05$), while the plants treated with *M. alternifolia* had the lowest percent of damaged foliar area (2.5%) (Figure 1B).

These results are in agreement with the results documented by Borges *et al.* (2012), who reported that *M. alternifolia* was more effective in reducing disease progress than *A. indica*, while Haddad *et al.* (2009) reported a lower level of disease intensity when applying *Bacillus* sp. isolates. Medice *et al.* (2007) reported 35.0-62.0% reduction in Asian rust severity (*Phakopsora pachyrhizi*) in different varieties that were treated with essential oils of thyme (*Thymus vulgaris*), citronella (*Cymbopogon nardus*), eucalyptus (*Corymbia citriodora*) and neem (*Azadirachta indica*). In our experiments, the biofungicide made of *M. alternifolia* reduced *H. vastatrix* incidence by 20.9% compared to the control plants. *M. alternifolia*, *A. indica* y *B. subtilis* + *A. indica* + *S. aromaticum* reduced the disease severity by 35.1%, 5.5% and 13.7%, respectively, compared to the severity in the control plants. Borges *et al.* (2012) obtained similar results where the incidence and severity was reduced by 12.1% and 55.4%, respectively, using essential tea tree oils (*M. alternifolia*). No statistically significant differences were found in the severity of the plants that were sprayed with essential neem oil (*A. indica*)

($p \leq 0.05$), mientras que las plantas tratadas con *M. alternifolia* tuvieron los menores porcentajes de área foliar dañada (2.5%) (Figura 1B).

Estos resultados coinciden con lo documentado por Borges *et al.* (2012), quienes reportaron una mayor eficiencia de *M. alternifolia* en la disminución del progreso de la enfermedad en comparación con *A. indica*, mientras que Haddad *et al.* (2009) reportaron una disminución de la intensidad de la enfermedad mediante la aplicación de aislamientos de *Bacillus* sp. Medice *et al.* (2007) reportaron una reducción del 35.0% al 62.0% de la severidad de la roya asiática de la soya (*Phakopsora pachyrhizi*) en diferentes variedades tratadas con aceites esenciales de tomillo (*Thymus vulgaris*), citronela (*Cymbopogon nardus*), eucalipto (*Corymbia citriodora*) y neem (*Azadirachta indica*). En nuestros experimentos, el biofungicida elaborado con *M. alternifolia*, redujo 20.9% la incidencia de *H. vastatrix* respecto a las plantas testigo. *M. alternifolia*, *A. indica* y *B. subtilis* + *A. indica* + *S. aromaticum* redujeron la severidad de la enfermedad 35.1%, 5.5% y 13.7% respectivamente, en comparación con la severidad de las plantas testigo. Borges *et al.* (2012) encontraron resultados similares, donde la incidencia y la severidad se redujo 12.1% y 55.4%, respectivamente, al utilizar aceites esenciales del árbol del té (*M. alternifolia*); no se presentaron diferencias estadísticamente significativas en la severidad de las plantas asperjadas con aceite esencial de neem (*A. indica*) y el testigo. En estos experimentos la aplicación de *M. alternifolia* limitó el progreso de la enfermedad e infección del hongo, pero no evitó incrementos en el tiempo.

El análisis de varianza del ABCPE con base en la severidad y de la tasa de infección aparente indicó diferencias significativas entre tratamientos ($p \leq 0.05$). Aunque el biofungicida elaborado con *M. alternifolia* disminuyó el progreso de la enfermedad, la prueba de medias no indicó diferencias significativas respecto al testigo, lo cual pudo de-

regarding the control plants. In these experiments, the application of *M. alternifolia* limited the disease progress and fungal infection but did not prevent increases over time.

The analysis of variance of AUDPC based on the severity and the apparent infection rate indicated significant differences among treatments ($p \leq 0.05$). Although the biofungicide made of *M. alternifolia* reduced the disease progress, the mean comparison test did not show significant differences regarding the control, which could be due to a variation in the levels of severity recorded during the first evaluations as a result of the initial infection process and the recent application of the biofungicide. The comparison of the AUDPC means indicated that the application of *A. indica* did not limit the disease progress and that it was even higher than that of the control (Table 3). However, the means test conducted on the apparent infection rate indicated significant differences among treatments ($p \leq 0.05$), where *M. alternifolia* had the lowest infection rate ($r=0.028$), while the control had the highest value ($r=0.046$). In percentage terms, the reduction in the apparent infection rate compared to that of the control was 39.1% with *M. alternifolia*.

Haddad *et al.* (2009) reported that the application of *Bacillus* sp. was effective in controlling *H. vastatrix*. They also mentioned that certain isolates did not show significant differences due to unfavorable environmental conditions for this biological control agent. It is likely that the response of the isolate in the formulation of the biofungicide based on *Bacillus* sp. was caused by its low adaptative ability to the environmental conditions at the experiment sites. This means that formulations must be prepared with isolates obtained from each coffee producing area, since using commercial formulations made from microorganisms to control the disease can lead to lower effectiveness caused by the effect of the environmental conditions in each area.

berse a la variación en los niveles de severidad registrados en las primeras evaluaciones, como resultado del proceso de infección inicial y de la reciente aplicación del biofungicida. La comparación de medias del ABCPE indicó que la aplicación de *A. indica* no limitó el progreso de la enfermedad e incluso fue superior al testigo (Cuadro 3). Sin embargo, la prueba de medias realizada con la tasa de infección aparente indicó diferencias significativas entre los tratamientos ($p \leq 0.05$), donde *M. alternifolia* tuvo la menor tasa de infección ($r=0.028$), mientras que el testigo tuvo el mayor valor ($r=0.046$); en términos porcentuales la reducción de la tasa de infección aparente con respecto al testigo fue 39.1% con *M. alternifolia*.

Haddad *et al.* (2009) reportaron que la aplicación de *Bacillus* sp. fue efectiva para el control de *H. vastatrix*; también mencionaron que ciertos aislamientos no presentaron diferencias significativas debido a condiciones ambientales desfavorables para este agente de control biológico. Es probable que la respuesta del aislamiento en la formulación del biofungicida a base de *Bacillus* sp. se deba a su baja adaptabilidad a las condiciones ambientales de los sitios experimentales. Esto evidencia la nece-

The incidence and severity had significant differences among locations ($p < 0.01$). The Chilocoyo location had the highest final disease incidence and severity values, while Lipuntahuaca had the lowest level of incidence and severity (Figure 2). Plants of the Garnica variety had 29.0% to 55.0% incidence, while the plants of Typica had 24.7% to 48.2% incidence. According to the analysis of variance, Typica and Garnica varieties had no significant differences in the incidence in each of the locations (Figure 2A). Regarding the average severity, the Typica variety reached values between 1.7% and 3.5%, while the Garnica variety had values between 2.9% and 4.8%. These varieties had significant differences in severity only in the Lipuntahuaca location ($p \leq 0.01$), where the Garnica variety was more susceptible to the disease (Figure 2B). According to reports from the Coffee Rust Surveillance Program, varieties Garnica and Typica have been the most severely affected compared to other varieties such as Geisha, Costa Rica and Catimor (PVEF-CAFETO, 2018). The disease was not eradicated with the use of biofungicides, but the applications of *M. alternifolia* reduced the infection caused by the fungus at the

Cuadro 3. Efecto de la aplicación de biofungicidas en el área bajo la curva del progreso de la severidad (ABCPE) y tasa de infección aparente (r) de la severidad de la roya del café en plantas jóvenes establecidas en condiciones de campo en Huehuetla, Puebla.

Table 3. Effect of the application of biofungicides on the area under the disease progress curve (AUDPC) of the severity and apparent infection rate (r) of coffee rust in young plants established in the field in Huehuetla, Puebla.

Tratamiento	ABCPE	r
Testigo (TE)	72 ab*	0.046 a
<i>B. subtilis</i> + <i>A. indica</i> + <i>S. aromaticum</i> (BA + AI+SA)	67.3 ab	0.046 a
<i>Azadirachta indica</i> (AI)	79.3 a	0.033 ab
<i>Melaleuca alternifolia</i> (MA)	61.8 b	0.028 b

* Valores con la misma letra en la misma columna son iguales estadísticamente (Duncan, $p \leq 0.05$) ♦ Values with the same letter in the same column are statistically the same (Duncan, $p \leq 0.05$).

sidad de generar formulaciones con aislamientos obtenidos en cada zona cafecultora, ya que el control de la enfermedad mediante formulaciones comerciales a base de microorganismos puede llevar a una baja eficiencia en el control por efecto de las condiciones ambientales de cada zona.

La incidencia y severidad presentaron diferencias significativas entre localidades ($p < 0.01$); en la localidad de Chilocoyo se presentaron los mayores valores de incidencia y severidad final de la enfermedad, mientras que la localidad de Lipuntahuaca tuvo la menor incidencia y severidad (Figura 2). Las plantas de la variedad Garnica tuvieron una incidencia en el rango de 29.0% a 55.0% mientras que en las plantas de la variedad Typica los valores estuvieron en el rango de 24.7% a 48.2%; de acuerdo con el análisis de varianza, las variedades Typica y Garnica no presentaron diferencias significativas en los niveles de incidencia en cada una de las localidades (Figura 2A). Respecto a la severidad promedio, la variedad Typica alcanzó valores entre 1.7% y 3.5%, mientras que la variedad Garnica tuvo

plant level. They also showed a tendency to reduce the disease after two applications; that is, 29 days after the first application; also although it did not prevent an increase, it was the treatment with the lowest apparent infection rate ($r=0.028$, $p \leq 0.05$). By using *M. alternifolia*, the percentage of disease reduction compared to the control, at the end of the evaluation, was 20.9% for incidence, 35.4% for severity, 14.2% for AUDPC and 39.1% for apparent infection rate. The Typica and Garnica varieties did not show significant differences in *H. vastatrix* incidence and severity, except in the Lipuntahuaca location, where the Garnica variety had the highest level of foliar damage. The use of *M. alternifolia* extracts to control rust in young coffee plants could be combined with integrated management practices as a compatible alternative aligned with the principles of sustainable organic coffee production. However, these results suggest that further research must be done, considering better inoculum control, alternative doses, reproductive-age plants and periods of higher regional epidemic intensity.

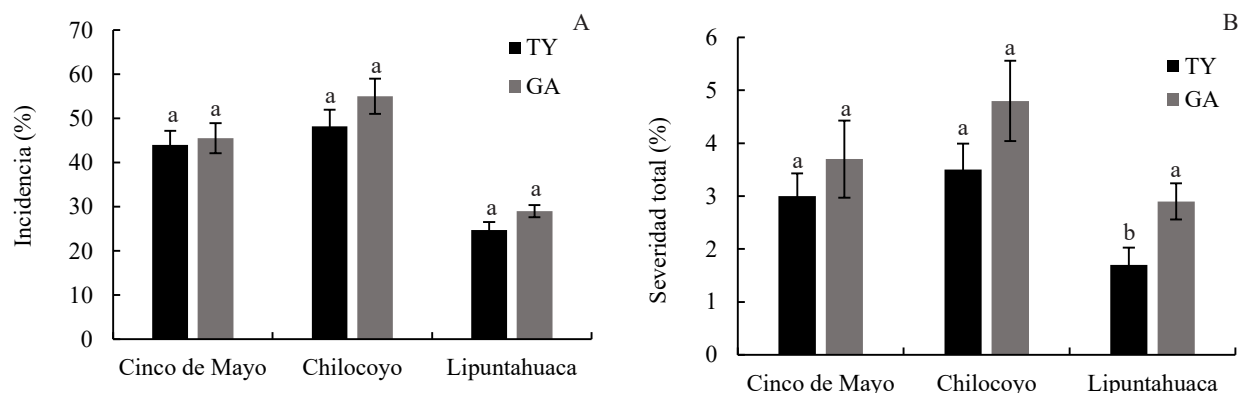


Figura 2. Comportamiento de la roya del café en plantas jóvenes de dos variedades evaluadas por localidad en condiciones de campo en Huehuetla, Puebla. A) Incidencia, B) Severidad. La incidencia y severidad se compararon estadísticamente con valores transformados. En las barras se presentan valores no transformados. TY=Typica, GA=Garnica. Barras con la misma letra en la misma localidad son estadísticamente iguales (Duncan, $p \leq 0.05$). Las barras representan el error estándar de la media en cada evaluación.

Figure 2. Behavior of coffee rust in young plants of two varieties evaluated per location in the field in Huehuetla, Puebla. A) Incidence, B) Severity. The incidence and severity were statistically compared using transformed values. The bars show non transformed values. TY=Typica, GA=Garnica. Bars with the same letter in each locality are statistically the same (Duncan, $p \leq 0.05$). The bars represent the standard error of the mean at each evaluation.

valores entre 2.9% y 4.8%. Estas variedades tuvieron diferencias significativas en la severidad únicamente en la localidad de Lipuntahuaca ($p \leq 0.01$), donde la variedad Garnica fue más susceptible a la enfermedad (Figura 2B). De acuerdo con lo reportado en los informes del Programa de Vigilancia de la Roya del Cafeto las variedades Garnica y Typica son las que han sido mayormente afectadas por la roya en comparación con otras variedades como Geisha, Costa Rica y Catimor (PVEF-CAFETO, 2018).

La enfermedad no se erradicó con el uso de los biofungicidas, sin embargo, las aplicaciones de *M. alternifolia* disminuyeron la infección del hongo causante de la roya del cafeto a nivel de planta; además mostraron una tendencia a disminuir el progreso de la enfermedad después de dos aplicaciones, es decir, a los 29 días después de la primera aplicación; aunque no evitó que se incrementara fue el tratamiento con la menor tasa de infección aparente ($r=0.028$, $p \leq 0.05$). Al utilizar *M. alternifolia*, el porcentaje de reducción de la enfermedad con respecto al testigo, al final de la evaluación, fue 20.9% para la incidencia, 35.4% para la severidad, 14.2% en el ABCPE y 39.1% en la tasa de infección aparente. Las variedades Typica y Garnica no presentaron diferencias significativas en la incidencia y severidad de *H. vastatrix*, excepto en la localidad de Lipuntahuaca donde la variedad Garnica tuvo mayor daño foliar debido a la roya. El uso de extractos de *M. alternifolia* para el control de la roya en plantas jóvenes de cafeto podría combinarse con prácticas de manejo integrado, como una alternativa compatible con los principios de la producción sustentable de café orgánico. Sin embargo, estos resultados sugieren que la investigación debe continuar, considerando un mayor control de inóculo, dosis alternativas, plantas en edad productiva y periodo de mayor intensidad epidémica regional.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank the Programa para el Desarrollo Profesional Docente, for the superior type (PRODEP), for funding this research. And to coffee growers for their cooperation.

~~~~~ End of the English version ~~~~~

## AGRADECIMIENTOS

Al Programa para el Desarrollo Profesional Docente, para el tipo Superior (PRODEP) por el financiamiento de la investigación. A los cafeticultores por su colaboración.

## LITERATURA CITADA

- APS. 2019. Modelos del progreso de la enfermedad. The American Phytopathological Society. (Consulta, mayo de 2019. <https://www.apsnet.org/edcenter/disimpactmngmnt/topc/Epidemiologia/Pages/ModelosProgreso.aspx>)
- Avelino J, Cristancho M, Georgiou S, Imbach P, Aguilar L, Bornemann G, Läderach P, Anzueto F, Hruska AJ, Morales C. 2015. The coffee rust crises in Colombia and Central America (2008–2013): Impacts, plausible causes and proposed solutions. *Food Security* 7:303–321. <https://doi.org/10.1007/s12571-015-0446-9>
- Benitez-García E, Jaramillo-Villanueva JL, Escobedo-Garrido S, Mora-Flores S. 2015. Caracterización de la producción y del comercio de café en el municipio de Cuetzalan, Puebla. *Agricultura, Sociedad y Desarrollo* 12:181–198. <https://www.colpos.mx/asyd/volumen12/numero2/asd-13-098.pdf>
- Borges PR, Ciavareli LG, José PF, Alves E. 2012. Essential oils for rust control on coffee plants. *Ciência Agro-tecnologia* 36:16–24. <https://doi.org/10.1590/S1413-70542012000100002>
- Campbell CL, Neher DA. 1994. Estimating Disease Severity and Incidence. In: Campbell CL and Benson DM. (eds.). *Epidemiology and Management of Root Diseases*. Springer, Berlin, Heidelberg. 339 p. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-85063-9\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-642-85063-9_5)
- Carrión G y Rico-Gray V. 2002. Mycoparasites on the coffee rust in Mexico. *Fungal Diversity* 11: 49–60. [http://www.fungaldiversity.org/fdp/sfdp/FD\\_11\\_49-60.pdf](http://www.fungaldiversity.org/fdp/sfdp/FD_11_49-60.pdf)
- Gómez-De La Cruz I, Pérez-Portilla E, Escamilla-Prado E, Martínez-Bolaños M, Carrión-Villanueva GLL, Hernández-Leal TI. 2018. Selection in vitro of mycoparasites with potential for biological control on Coffee Leaf Rust (*Hemileia vastatrix*). *Revista Mexicana de Fitopatología* 36:172–183. <http://dx.doi.org/10.18781/r.mex.fit.1708-1>

- Haddad F, Maffia LA, Mizubuti ESG, Teixeira H. 2009. Biological control of coffee rust by antagonistic bacteria under field conditions in Brazil. *Biological Control* 49:114-119. <http://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2009.02.004>
- Ibañez M y Blackman A. 2016. Is eco-certification a win-win for developing country agriculture? *Organic coffee certification in Colombia*. *World Development*. 82:14-27. <https://doi.org/10.1016/j.worlddev.2016.01.004>
- INEGI, Instituto Nacional de Estadística y Geografía. 2009. *Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos*. Huehuetla, Puebla. Clave geoestadística 21072. INEGI. México. [http://www3.inegi.org.mx/contenidos/app/mexicocifras/datos\\_geograficos/21/21072.pdf](http://www3.inegi.org.mx/contenidos/app/mexicocifras/datos_geograficos/21/21072.pdf)
- Medice R, Alvez E, Tadeu de Assis R, Goulard RMJ, Leite EAGL. 2007. Óleos essenciais no controle da ferrugem asiática da soja *Phakopsora pachyrhizi* Syd. & P. Syd. *Ciencia e Agrotecnología* 31:83-90. <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542007000100013>
- PVEF-CAFETO, Programa de Vigilancia Epidemiológico Fitosanitario del Cafeto. 2018. *Reporte roya del cafeto*. <http://www.royacafe.lanref.org.mx> (Consulta, junio 2018).
- Quiñones-Valdéz R, Sánchez-Pale JR, Castañeda-Vildozola A, Cristóbal de la Cruz M. 2015. Comportamiento espacial de la roya transversal del gladiolo en Jiquipilco, Estado de México, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 33:247-255. <http://rmf.smf.org.mx/Vol3322015/NF/NF4.pdf>
- SAGARPA. 2017. *Planeación agrícola nacional 2017-2030. Café mexicano*. 20 p. [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/256426/B\\_sico-Caf\\_.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/256426/B_sico-Caf_.pdf)
- Santa-Rosa RH, Espitia RE, Martínez-Cruz E, Villaseñor-Mir H, Huerta-Espino J, Mariscal-Amaro LA. 2016. Productividad y calidad industrial de trigos harineros en relación a enfermedades. *Agrociencia* 50:1027-1039. <https://www.colpos.mx/agrocien/Bimestral/2016/nov-dic/art-7.pdf>
- SENASICA. 2019. *Roya del caféto (Hemileia vastatrix Berkeley & Broome)*. Dirección General de Sanidad Vegetal-Programa de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria. México. Ficha técnica No. 46. 16 p. [http://www.cesavep.org/descargas/RDC/Ficha\\_Tecnica\\_Roya\\_del\\_cafeto.pdf](http://www.cesavep.org/descargas/RDC/Ficha_Tecnica_Roya_del_cafeto.pdf)
- SIAP, Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. 2018. *Cierre de la producción agrícola*: <http://www.siap.gob.mx/> (Consulta, mayo 2018).
- Silva JL, Souza PE, Monteiro FP, Freitas MLO, Silva Júnior MB, Belan LL. 2014. Antifungal activity using medicinal plant extracts against pathogens of coffee tree. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* 16:539-544. [http://dx.doi.org/10.1590/1983-084X/12\\_155](http://dx.doi.org/10.1590/1983-084X/12_155)
- Simko I and Piepho HP. 2012. The area under the disease progress stairs: Calculation, advantage, and application. *Phytopathology* 102:381- 389. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-07-11-0216>
- SINAVEF, Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria. 2013. *Ficha técnica roya del caféto Hemileia vastatrix*. Dirección General de Sanidad Vegetal. Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria. México, D. F. 25 p.
- Steel RGD y Torrie JH. 1985. *Bioestadística: principios y procedimientos*. Editorial McGraw-Hill Latinoamericana. Bogotá, Colombia. 622 p.
- Talhinhas P, Batista D, Diniz I, Vieira A, Silva DN, Loureiro A, Tavares S, Pereira AP, Azinheira HG, Guerra-Guimaraes L, Várzea V, Do Céu Silva M. 2017. The coffee leaf rust pathogen *Hemileia vastatrix*: one and a half centuries around the tropics. *Molecular Plant Pathology* 18:1039-1051. <https://doi.org/10.1111/mpp.12512>
- Villaseñor-Mir HE, Hortelano SRR, Martínez CE, Mariscal AL, Leyva MSG, Huerta EJ. 2012. Control químico de las enfermedades: una alternativa para la producción de trigo de temporal en Tlaxcala. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 3:595-600. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=263123205014>
- Zambolim L. 2016. Current status and management of coffee leaf rust in Brazil. *Tropical Plant Pathology* 41:1-8. <http://dx.doi.org/10.1007/s40858-016-0065-9>
- Zar JH. 1999. *Biostatistical Analysis*. Fourth Edition. USA: Prentice Hall. University of Michigan.