



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

**CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE INVESTIGACIÓN
PARA EL DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL
UNIDAD OAXACA**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS EN CONSERVACIÓN Y
APROVECHAMIENTO DE RECURSOS NATURALES**

**"Extractos de Propóleos contra roya del Cafeto (*Hemileia vastatrix* Berk y
Broome)"**

TESIS

Que para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS
(PRODUCCIÓN Y PROTECCIÓN VEGETAL)**

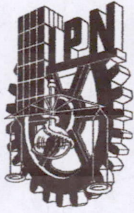
PRESENTA:

San Juan Martínez Marlo

DIRECTORES DE TESIS:

**Dr. Teodulfo Aquino Bolaños
Dra. Martha Angélica Bautista Cruz**

Santa Cruz Xoxocotlán, Oaxaca, mayo de 2022



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARIA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REGISTRO DE TEMA DE TESIS Y DESIGNACIÓN DE DIRECTOR DE TESIS

Ciudad de México, 09 de mayo del 2022

El Colegio de Profesores de Posgrado de **CIIDIR UNIDAD OAXACA** en su Sesión
(Unidad Académica)

ordinaria No. 10 celebrada el día 04 del mes octubre de 2021 conoció la solicitud presentada por el alumno:

Apellido Paterno:	San Juan	Apellido Materno:	Martínez	Nombre (s):	Marlo
-------------------	----------	-------------------	----------	-------------	-------

Número de registro: A 2 0 0 1 3 9

del Programa Académico de Posgrado: **Maestría en Ciencias en Conservación y Aprovechamiento de Recursos Naturales.**

Referente al registro de su tema de tesis; acordando lo siguiente:

1.- Se designa al aspirante el tema de tesis titulado:

"Extractos de Propóleos contra roya del Cafeto (*Hemileia vastatrix* Berk y Broome)"

Objetivo general del trabajo de tesis:

Determinar *in vitro* los efectos del propóleos de tres regiones del estado de Oaxaca en *Hemileia vastatrix*.

2.- Se designa como Directores de Tesis a los profesores:

Director: **Dr. Teodulfo Aquino Bolaños** 2° Directora: **Dra. Martha Angélica Bautista Cruz**
No aplica:

3.- El Trabajo de investigación base para el desarrollo de la tesis será elaborado por el alumno en:

El Laboratorio de control biológico del Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Unidad Oaxaca.

que cuenta con los recursos e infraestructura necesarios.

4.- El interesado deberá asistir a los seminarios desarrollados en el área de adscripción del trabajo desde la fecha en que se suscribe la presente, hasta la aprobación de la versión completa de la tesis por parte de la Comisión Revisora correspondiente.

Director de Tesis

Dr. Teodulfo Aquino Bolaños

Aspirante

San Juan Martínez Marlo

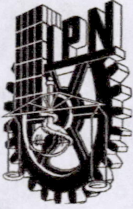
2° Directora de Tesis

Dra. Martha Angélica Bautista Cruz

Presidente del Colegio

Dr. Salvador Isidro Belmonte Jiménez

ESTADOS UNIDOS MEXICANOS
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
CENTRO INTERDISCIPLINARIO
DE INVESTIGACIÓN PARA EL
DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL
UNIDAD OAXACA



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Santa Cruz Xoxocotlán, Oax., siendo las 12:00 horas del día 27 del mes de mayo del 2022 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de profesores de posgrado del Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Unidad Oaxaca (CIIDIR UNIDAD OAXACA) para examinar la tesis titulada:

"Extractos de Propóleos contra roya del Cafeto (*Hemileia vastatrix* Berk y Broome)"

del alumno:

Apellido Paterno:	<u>San Juan</u>	Apellido Materno:	<u>Martínez</u>	Nombre (s):	<u>Marlo</u>
--------------------------	-----------------	--------------------------	-----------------	--------------------	--------------

Número de registro: A 2 0 0 1 3 9

Aspirante del Programa Académico de Posgrado: Maestría en Ciencias en Conservación y

Aprovechamiento de Recursos Naturales

Una vez que se realizó un análisis de similitud de texto, utilizando el software antiplagio, se encontró que el trabajo de tesis tiene 9% de similitud. **Se adjunta reporte de software utilizado.**

Después que esta Comisión revisó exhaustivamente el contenido, estructura, intención y ubicación de los textos de la tesis identificados como coincidentes con otros documentos, concluyó que en el presente trabajo **SI** **NO** **SE CONSTITUYE UN POSIBLE PLAGIO.**

JUSTIFICACIÓN DE LA CONCLUSIÓN: (Por ejemplo, el % de similitud se localiza en metodologías adecuadamente referidas a fuente original)

El 9 % de similitud fue encontrado en las referencias bibliográficas, dando crédito a los autores citados, el resto del documento corresponde a la redacción y la estructura original por los autores, por lo que no constituye un posible plagio.

****Es responsabilidad del alumno como autor de la tesis la verificación antiplagio, y del Director o Directores de tesis el análisis del % de similitud para establecer el riesgo o la existencia de un posible plagio.**

Finalmente, y posterior a la lectura, revisión individual, así como el análisis e intercambio de opiniones, los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR** **SUSPENDER** **NO APROBAR** la tesis por **UNANIMIDAD** o **MAYORÍA** en virtud de los motivos siguientes:

La información que se generó en este trabajo de investigación fue novedosa, ya que por primera vez se evaluó la actividad fungicida contra la roya del café (*Hemileia vastatrix*) a base de extractos de propóleos nativos, encontrando una respuesta positiva en el manejo de esta enfermedad.

COMISIÓN REVISORA DE TESIS

Dr. Teodulfo Aquino Bolaños
Director de Tesis
Nombre completo y firma

M.C. Laura Martínez Martínez
Nombre completo y firma

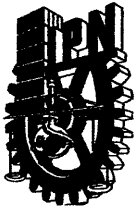
Dr. José Antonio Sánchez García
Nombre completo y firma

Dra. Martha Angélica Bautista Cruz
2° Director de Tesis
Nombre completo y firma

Dr. David Martínez Sánchez
Nombre completo y firma

Dr. Salvador Isidro Belmonte Jiménez
Nombre completo y firma
PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES





INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA DE AUTORIZACIÓN DE USO DE OBRA PARA DIFUSIÓN

En la Ciudad de México el día 08 del mes de junio del año 2022, el que suscribe **San Juan Martínez Marlo** alumno del programa de **Maestría en Ciencias en Conservación y Aprovechamiento de Recursos Naturales** con número de registro **A200139**, adscrito al Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Unidad Oaxaca manifiesta que es autor intelectual del presente trabajo de tesis bajo la dirección de **Dr. Teodulfo Aquino Bolaños y la Dra. Martha Angélica Bautista Cruz** y cede los derechos del trabajo intitulado **“Extractos de Propóleos contra roya del Cafeto (*Hemileia vastatrix* Berk y Broome)”**, al Instituto Politécnico Nacional, para su difusión con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expresado del autor y/o directores. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección de correo: mvzmarlo@gmail.com. Si el permiso se otorga, al usuario deberá dar agradecimiento correspondiente y citar la fuente de este.



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
CENTRO INTERDISCIPLINARIO
DE INVESTIGACIÓN PARA EL
DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL
UNIDAD OAXACA

San Juan Martínez Marlo

DEDICATORIAS

A mi madre por el apoyo incondicional que siempre me brinda.

A mis hijos Mariana y Alejandro, mi motivación para superarme día con día.

A mis hermanos Erwin y Jair por motivarme a superarme día con día.

A ustedes dedico este importante logro.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por permitirme culminar con éxito un proyecto más en mi vida.

Al CONACYT por el apoyo económico brindado para el desarrollo de mis estudios de maestría.

Al Instituto Politécnico Nacional en especial al CIIDIR unidad Oaxaca por brindarme las herramientas para mi desarrollo durante el desarrollo de mis estudios.

A los profesores, gracias por la paciencia brindada a su servidor, por los consejos en la realización de los experimentos desarrollados.

A mi comité tutorial, por su asesoría brindada durante el desarrollo del proyecto de investigación, por sus consejos, por compartir su experiencia conmigo.

A los productores por colaborar en el proyecto de investigación, por dar facilidades en la recolección de las muestras.

Al Dr. Teodulfo Aquino Bolaños por los consejos y apoyo brindado para el desarrollo de la investigación.

A todos infinitas gracias.

RESUMEN

Hemileia vastatrix, clasificado con un patógeno biotrófico es el agente causal de la roya en el cafeto, una de las principales limitantes de la producción de café. Su control se basa en compuestos productos cuyo principal ingrediente activo es el cobre, el cual genera toxicidad al suelo, cadenas tróficas, y a la fenología de la planta. Existe evidencia que demuestra que los biofungicidas formulados a partir de extractos vegetales representan una alternativa en el manejo de esta enfermedad. En este trabajo se evaluó la actividad fungicida contra *H. vastatrix* a base de extractos de propóleos provenientes de tres regiones del estado de Oaxaca, México: Mixteca, Valles Centrales y Costa. Se evaluaron tres concentraciones al 2.5, 5 y 10 %, un testigo y un control (Alto 100 sl); y se determinó el a) el daño a la uredospora, b) la inhibición de la germinación de la uredospora y c) la inhibición de la uredospora en hojas del cafeto en condiciones de laboratorio. Se encontraron dos tratamientos en dañar a la uredospora a las 48 h, el tratamiento Mixteca 10 con una efectividad del 12.6 %, y el tratamiento Valles Centrales 10 con una efectividad del 8.2%. En la inhibición de la germinación de la uredospora *in vitro*, solo el tratamiento Mixteca 10 alcanzó un 98.2%. Y finalmente en la inhibición a la uredospora en hojas de café, nuevamente el tratamiento Mixteca 10 presentó la mayor eficiencia con un 95% otro tratamiento a resaltar fue Valles Centrales 10 logró una inhibición del 85 %.

Palabras clave: extractos, patógeno, uredospora, *in vitro* y fungicida

ABSTRACT

Hemileia vastatrix, classified as a biotrophic pathogen, is the causal agent of coffee rust, one of the main limitations of coffee production. Its control is based on product compounds whose main active ingredient is copper, which generates toxicity to the soil, food chains, and plant phenology. There is evidence that shows that biofungicides formulated from plant extracts represent an alternative in the management of this disease. In this work, the fungicidal activity against *H. vastatrix* was evaluated based on propolis extracts from three regions of the state of Oaxaca, Mexico: Mixteca, Valles Centrales y Costa: Three concentrations at 2.5, 5 and 10%, a witness and a control (Alto 100 sl) were evaluated; and the a) damage to the uredospore, b) the inhibition of uredospore germination and c) the inhibition of uredospore in coffee leaves under laboratory conditions were determined. Two treatments were found to damage the uredospore at 48 h, the Mixteca 10 treatment with an effectiveness of 12.6%, and the Valles Centrales 10 treatment with an effectiveness of 8.2%. In the inhibition of uredospore germination in vitro, only the Mixteca 10 treatment reached 98.2%. And finally, in the inhibition of the uredospore in coffee leaves, again the Mixteca 10 treatment presented the highest efficiency with 95%, another treatment to highlight was Valles Centrales 10, which achieved an 85% inhibition.

Keywords: extracts, pathogen, uredospora, *in vitro* and fungicidal

INDICE

RESUMEN	iii
ABSTRACT	iv
INDICE DE CUADROS	viii
INDICE DE FIGURAS	ix
I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS	3
2.1 Objetivo general	3
2.2 Objetivos específicos	3
III. HIPÓTESIS	4
IV. REVISIÓN DE LITERATURA	5
4.1 Café 5	
4.1.1 Regiones productoras de café en México.....	7
4.1.2 Generalidades del cultivo del café	8
4.1.3 Descripción de <i>Coffea arabica L.</i>	8
4.2 Plagas y enfermedades del café.	9
4.2.1 Roya del café	9
4.2.2 Situación fitosanitaria de la roya del café en México	10
4.2.3 Taxonomía y descripción de <i>Hemileia vastatrix</i> Berk y Broome	12
4.2.4 Hospederos de <i>Hemileia vastatrix</i>	13
4.2.5 Ciclo patológico de la roya del café	13
4.3 Propóleos.	14

4.3.1 Etimología de los propóleos.....	16
4.3.2 Origen y naturaleza de los propóleos.....	16
4.3.3 Propiedades de los propóleos.....	17
4.3.4 Propiedades físicas de los propóleos.....	18
4.3.5 Estructura química de los propóleos.....	18
V. MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
5.1 Colecta del material en campo.....	21
5.1.1 Recolección de propóleos.....	21
5.1.2 Colecta de roya (<i>Hemileia vastatrix</i>).....	24
5.2 Obtención y preparación de extractos etanólicos de propóleos (EEP) en laboratorio	26
5.3 Rendimiento de los propóleos de tres zonas del estado de Oaxaca.....	30
5.4 Identificación de <i>Hemileia vastatrix</i>.....	30
5.4.1 Preparación de la suspensión de uredosporas.....	30
5.4.2 Detección e identificación de <i>Hemileia vastatrix</i>	32
5.5 Efecto de propóleos sobre la germinación de uredosporas de <i>Hemileia vastatrix</i>..	33
5.5.1 Evaluación de daño a uredosporas en portaobjetos.....	33
5.5.2 Inhibición de germinación de uredosporas a base de propóleos.....	35
5.5.3 Evaluación de extracto etanólico de los propóleos en la inhibición de la germinación de uredosporas en disco de hoja de café en laboratorio.....	37
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	41
6.1 Rendimiento de extractos etanólicos.....	41
6.2 Identificación del hongo <i>Hemileia vastatrix</i>.....	42

6.3 Evaluación del daño a la uredospora por el efecto de propóleos en condiciones de laboratorio.....	43
6.4 Inhibición de la germinación de la uredospora a base de propóleos.	45
6.5 Inhibición de la uredospora en hoja de café	46
<i>VII. CONCLUSIONES.....</i>	49
<i>VIII. RECOMENDACIONES.....</i>	50
<i>IX. LITERATURA CITADA.....</i>	51

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Producción anual de café cereza en Oaxaca.....	6
Cuadro 2. Producción de café en el estado de Oaxaca en el año 2018.	8
Cuadro 3. Tratamientos evaluados de uredosporas en portaobjetos con propóleos.....	34
Cuadro 4. Tratamientos evaluados en la inhibición de la germinación de uredosporas en discos de hojas de café con propóleos en laboratorio.	40
Cuadro 5. Rendimientos de los propóleos por sitio de estudio.	42
Cuadro 6. Daño a la uredospora por el efecto de propóleos de los sitios Mixteca, Costa y Valles Centrales de Oaxaca.....	44
Cuadro 7. Evaluación en la inhibición de la germinación de la uredospora.	45
Cuadro 8. Evaluación de la inhibición de la uredospora en hojas de café.	47

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Municipios con antecedentes de la roya del cafeto en México (SENASICA 2019)	11
Figura 2. Ubicación del Laboratorio de control biológico del CIIDIR unidad Oaxaca, IPN.	21
Figura 3. Ubicación de sitios de colecta de propóleos. a) Santiago Ihuitlán Plumas, b) Zimatlán de Álvarez, c) San Andrés Huaxpaltepec.	22
Figura 4. Colecta de propóleos en el municipio de San Andrés Huaxpaltepec (región costa)	23
Figura 5. Almacenaje de muestras de propóleos	23
Figura 6. Plantas de cafeto con presencia de roya	24
Figura 7. Determinación de severidad e intensidad de roya en hoja de café.	25
Figura 8. Escala logarítmica-diagramática de 7 clases para la determinación del porcentaje de daño de la roya en tejido foliar (SENASICA 2018).	25
Figura 9. Almacenamiento de cámaras húmedas con muestras de roya de café.	26
Figura 10. Mezcla propóleos/etanol.	27
Figura 11. Agitación de la mezcla propóleos/etanol.	27
Figura 12. Sedimentado de ceras por refrigeración EEP Costa.	28
Figura 13. Filtrado de EPP región Costa para eliminación de ceras.	29
Figura 14. Eliminación de etanol en EEP.	29
Figura 15. Observación de lesión de roya en microscopio estereoscópico.	31
Figura 16. Conteo de uredosporas en cámara de Neubauer.	31
Figura 17. Diluciones seriadas de solución con <i>H. vastatrix</i> .	32

Figura 18. Evaluación de daño a uredospora en portaobjetos. Propóleos región costa al 10%	33
Figura 19. Uredospora de <i>H. vastatrix</i> con lisis celular en tratamiento de propóleos de la mixteca al 10%.	34
Figura 20. Ensayo de inhibición de germinación de uredosporas con propóleos de la región mixteca al 2.5, 5 y 10%.	36
Figura 21. Inhibición de la germinación de propóleos de la región mixteca al 10% a las 48 h.	36
Figura 22. Evaluación de propóleos en inhibición de la germinación de uredosporas en disco de hoja de café.	38
Figura 23. Uso de ImageJ para evaluación del área de necrosis en prueba de inhibición en hoja de café	39

I. INTRODUCCIÓN

Hemileia vastatrix Berkeley y Broome agente causal de la roya en el cafeto es clasificado como un patógeno biotrófico, ataca las hojas vivas del cafeto convirtiéndola en una de las enfermedades con mayor capacidad destructiva, lo cual la ubica como una de las enfermedades de mayor importancia, y principal limitante en la producción de café (Talhinhas et al., 2017). *Coffea arabica* L. y *Coffea canephora* P son las especies más atacadas por este hongo, en brotes agudos cuando la defoliación es prematura propicia la reducción en la capacidad fotosintética ocasionando la muerte progresiva de ramas (Avelino et al., 2015). Los daños de las infecciones de *H. vastatrix* en los años 2012 y 2013 en México ocasionaron una disminución del 40 al 50% en los volúmenes de producción del cultivo en los años subsecuentes (Cressey, 2013). La Organización Internacional del Café señala que factores económicos, agronómicos, descapitalización, así como la falta de manejo del cultivo, acentúan los daños de la roya del café (International Coffee Organization, 2019). Clasificada como plaga de importancia económica *H. vastatrix* se encuentra presente en el territorio mexicano, sujeta a control oficial (SENASICA. Laboratorio de Micología, 2018). Su control se ha venido realizado con productos cuyo principal ingrediente activo es el cobre, los cuales ocasionan deterioro del ecosistema por acumulación de cobre en la superficie del suelo, altas concentraciones de cobre afectan a los organismos que viven en el suelo, y el desarrollo fenológico del cafeto, considerando el control químico poco promisorio más en el sector orgánico, requiriéndose evaluar nuevas alternativas más amigables para el medio ambiente (Santiago-Elena et al., 2020).

La aplicación y los costos de los agroquímicos hacen insostenible el manejo de la enfermedad mediante productos químicos. Las tendencias y desarrollos actuales utilizadas como complemento para el control y tratamiento de la roya procuran la búsqueda de productos

sostenibles e inocuos para el medio ambiente (Alvarado-Castillo et al., 2017). Existe evidencia científica que demuestra la capacidad de los fungicidas elaborados a base de extractos de plantas para el control de *H. vastatrix*, y que por bajo precio e inocuidad para el medio ambiente representan una alternativa en el manejo de la enfermedad (Fajardo-Franco et al., 2020).

Los propóleos son producidos por varios géneros de abejas, el cual elaboran al mezclar enzimas mandibulares, aceites vegetales, polen, exudados de plantas y árboles, los cuales recolectan durante el pecoreo. Las abejas lo emplean como desinfectante y embalsamador de cadáveres invasores a la colmena (Freitas et al., 2019). Debido a su composición química y a la presencia de moléculas biológicamente activas presenta numerosas propiedades farmacológicas como lo es la antimicrobiana, antiviral, antioxidante, recientemente se ha descubierto su actividad antifúngica. Estudios demuestran que la fracción de los polifenoles son los responsables de las propiedades de los propóleos, la cual esta directamente relacionada con la vegetación y el periodo de cosecha de los propóleos (Letullier et al., 2020).

II. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general.

Determinar *in vitro* los efectos del propóleos de tres regiones del estado de Oaxaca en *Hemileia vastatrix*.

2.2 Objetivos específicos.

- Determinar el rendimiento de propóleos de tres zonas (Costa, Valles y Mixteca) del estado de Oaxaca.
- Realizar la identificación morfométrica del hongo *H. vastatrix* a través de características morfológicas de las uredosporas.
- Determinar el efecto de propóleos sobre la germinación de uredosporas de *H. vastatrix* en condiciones de laboratorio.

III. HIPÓTESIS

- Ha. Al menos una muestra de propóleos tendrá capacidad antifúngica en la germinación de uredosporas de *H. vastatrix* igual o mayor al presentado por fungicidas químicos.
- H0. Ninguna de las muestras de propóleos tendrán la capacidad y efecto antifúngico en la germinación de uredosporas de *H. vastatrix* igual o mayor al presentado por fungicidas químicos

IV. REVISIÓN DE LITERATURA

4.1 Café

El cafeto es originario de África tropical, del altiplano de la actual Etiopía. Se encuentra ampliamente distribuido alrededor de los trópicos, siendo Brasil el principal productor de café (*International Coffee Organization - Aspectos botánicos*, s. f.).

En la agricultura nacional el café es un cultivo estratégico para el desarrollo del país, los cafetales se ubican sobre las vertientes del Pacífico y Golfo de México, en terrenos con pendientes suaves a muy profundas, y bajo cubierta de diversos árboles, localizados desde los 100 a los 2 000 msnm, distribuidas de la siguiente manera 21.5% de las plantaciones se ubican hasta los 600 msnm; el 43% entre los 600 a 900 msn, 35% de los cafetales se ubican a alturas superiores de los 900 msnm (González & Santana 2016). Generadora de divisas para el país, la producción de café emplea más de medio millón de productores de 480 municipios en 14 estados del país (Hernández Sánchez & Nava Tablada, 2016).

Registros señalan que el café llegó a México a finales del siglo XVII, introducida en la hacienda Guadalupe en Córdoba provincia de Veracruz por el C. Juan Antonio Gómez de Guevara (Asociación Mexicana de Cafés y Cafeterías de Especialidad A.C., 2016). Mathieu de Fossey menciona que a finales del siglo XIX en Oaxaca ya existían cultivos de cafetos, José María Cortés fue quien plantó los primeros cafetos en el año de 1854 en el municipio de San Agustín Ixtiuchil. (Morales, 2013).

México se encuentra dentro de los primeros 10 países productores de café. En 2018, los volúmenes de producción ascendieron a 860 000 t de granos de café producidas en 630 000 ha, el estado de Oaxaca contribuyó con el 20% de la producción nacional (Morales-Antonio et al., 2021). De la producción de este grano el 70% se exporta a más de 35 países. México

se posiciona en el tercer lugar como productor de café arábica, posicionandose como uno de los mejores cafes a nivel mundial (Barrera et al., 2004).

De acuerdo a informes del SIAP del año 2021 la superficie sembrada de café a nivel nacional en el año 2016 era de 730 011.13 hectáreas (Cuadro 1); en el año 2017 la superficie cultivada disminuyo en un 1.4 % en relación con el año 2016; en el año 2018 la superficie sembrada disminuyo en un 1.44 % comparado con el año 2017, para el año 2019 la superficie sembrada disminuyó en 0.23 % en comparación con la superficie cultivada en el año 2018. En el aspecto productivo en el año 2016 se obtuvo una producción de 824 082.15 toneladas, para el año 2017 la producción incremento en 1.37% en relación con el año 2016, en el año 2018 el incremento de la producción fue de 2.95% comparado con el año 2017, finalmente en 2019 se incremento la producción en un 4.68% respecto al año 2018 (SIAP 2021).

Cuadro 1. Producción anual de café cereza en Oaxaca.

Año	Hectáreas (ha)		Toneladas producidas
	Sembrada	Cosechada	
2016	730,011.13	645,637.69	824,082.15
2017	722,444.32	638,603.28	835,380.37
2018	712,015.85	629,798.88	859,992.30
2019	710,360.63	629,300.47	900,215.33

4.1.1 Regiones productoras de café en México

México posee climas favorables para el establecimiento del café, la mayor parte de los productores se concentran en las zonas rurales poseedores de pequeñas parcelas, con sistemas de producción tradicional y bajo sombra (García-Domínguez et al., 2021).

Las regiones productivas de café en México son las siguientes:

- Región del Golfo: conformada por Hidalgo, Veracruz, San Luis Potosí, , Puebla y Estado de México
- Región del Océano Pacífico: agrupa a los estados de Oaxaca, Guerrero, Colima, Jalisco y Nayarit.
- Región del Soconusco: integrada por la mayor parte del estado de Chiapas
- La parte norte del estado de Chiapas conforma una cuarta región.

En estas regiones el desarrollo del café es adecuado ya que presentan características como: altitud, temperatura o precipitaciones adecuadas para el establecimiento del cultivo (SIAP, 2018).

En 2018 el volumen de café producido fue de 852.2 mil toneladas el cual fue producido en 14 entidades, dentro de los que destacan los estados de Chiapas con el 40.7%, Veracruz con el 24.7%, Puebla con el 15.9% y Oaxaca aportó el 8.3%, (SIAP, 2019). Typica, Garnica y Mundo Novo son las variedades más usadas en el establecimiento de cafetales. Su cultivo se caracteriza por el reducido uso de insumos, lo que facilita la transición de tradicional a orgánico (Fajardo-Franco et al., 2020). Las plantaciones de café en su mayoría se establecen bajo sombra, permitiendo conservar la cubierta vegetal sobre el suelo, el medio ambiente, así como la flora y la fauna (Flores, 2014).

La altitud, clima y suelos del estado Oaxaca favorecen el establecimiento del cultivo de café en 7 de las 8 regiones del estado, (García-Domínguez et al., 2021). El cuadro 2 resume los valores de producción y el rendimiento en toneladas por hectárea al 31 de diciembre de 2018 para el estado de Oaxaca (SIAP 2021).

Cuadro 2. Producción de café en el estado de Oaxaca en el año 2018.

Estado	Superficie (ha)		Producción obtenida (ton)	Rendimiento obtenido (ton)
	Sembrada	Cosechada		
Oaxaca	136,150	66,622	31,410	0.471

Fuente SIAP (2018)

4.1.2 Generalidades del cultivo del café

Planta de tipo arbustivo de porte bajo, de hoja perenne, perteneciente a la familia de las *Rubiaceae*, conformada por más 500 géneros y 6 000 especies, de las cuales las más importantes económicamente hablando son *Coffea arabica* L. y *Coffea canephora* P, la primera aporta más del 60% de la producción mundial (*International Coffee Organization - Aspectos botánicos*, s. f.)

4.1.3 Descripción de *Coffea arabica* L.

Coffea arabica L. fue descrita en 1753 por Linneo. El género *coffea* es una planta de tipo arbustivo, las cuales crecen de manera silvestre en África ecuatorial y Madagascar (Koutouleas et al., 2019). Su genoma está compuesto por dos subgenomas escasamente diferenciado (Romero et al., 2010). Presenta alturas que van de los 4 a los 6 metros, hojas globosas, brillantes y verdes. flores blancas y aromáticas de la cual se desarrolla el fruto el

cual tarda en madurar de 7 hasta 9 meses, habitualmente contiene dos semillas aplastadas. Es una especie que se autopoliniza lo que hace que las variedades permanezcan genéticamente estables. (SAGARPA, 2017).

4.2 Plagas y enfermedades del café.

El café se ve afectado con alrededor de 900 plagas y enfermedades. Las cuales afectan desde pequeños productores familiares hasta productores a escala empresarial al representar un gasto extra en la producción de este grano. Las plagas presentes con mayor frecuencia son la broca de café (*Hypothenemus hampei* Ferrari), el chacuatete (*Idiarthron subquadratum* Saussure y Pictet) y los pulgones (*Toxoptera aurantii* B. de F.), entre otras. De las enfermedades destacan la roya del café (*Hemileia vastatrix* Berk y Broome), el mal de hilachas (*Corticium koleroga* Cooke Höhn), la mancha de hierro (*Cercospora coffeicola* Berkeley y curtis), marchitez del café (*Gibberella xylarioides* Heim y Saccas), volcamiento (*Rhizoctonia solani* Kühn), canchales (*Myrothecium roridum* Tode) y la antracnosis (*Colletotrichum coffeanum* Noack) (Silva et al., 2014).

4.2.1 Roya del café

El primer reporte oficial de la roya del café fue a inicios del año 1869 en el continente asiático en la isla de Sri Lanka. Para el mismo año el micólogo Miles Joseph Berkeley identifica al agente causal de la enfermedad *H. vastatrix* (Avelino & Rivas, 2013). *H. vastatrix* ataca las hojas vivas del café, y particularmente la especie *C. arabica* L y *C. canephora* P (Avelino et al., 2015). La roya se encuentra presente en los países productores de café de todo el mundo, diseminada entre los años 1870 a 1920 a las zonas cafetaleras de la cuenca del Océano Índico y el Pacífico, posteriormente a los países africanos atlánticos en

las décadas de 1950 y 1960, y finalmente se extendió por América del Sur y Central durante las décadas de 1970 y 1980 (Talhinhas et al., 2017). La roya de la hoja del café es la plaga más peligrosa a nivel mundial. La epidemia de 2012-2013 en América central trascendió en una disminución del 16% en los niveles de producción de ese año en relación con la cosecha 2011-2012, y una reducción posterior del 10% para el ciclo de crecimiento 2013-2014 (McCook & Vandermeer, 2015). El ciclo vida del patógeno se desarrolla en las hojas del cafeto, provocando clorosis y defoliación los cuales afectan el llenado, la maduración, el tamaño y calidad del grano de café (Martínez et al., 2012). La interacción del patógeno *H. vastatrix*, el medio ambiente, rango de temperatura diurna, prácticas de manejo con el hospedero determinan la intensidad de la afectación, en afectaciones graves causa defoliación la cual puede provocar la muerte de las ramas, provocando pérdidas primarias y secundarias que repercuten en la producción de años posteriores a la infestación (Boudrot et al., 2016). EL hongo *H. vastatrix* exhibe gran potencial evolutivo, con capacidad para ser transportado largas distancias por el aire. Cuenta con multiplicación asexual y reproducción sexual, en cada pústula se producen millones de esporas (Avelino & Rivas, 2013). Su nombre proviene del latín “*vastare o vastador*” que significa devastador y “*hemileia*” que significa mitad lisa, la cual hace alusión a la parte lisa de la uredospora. El primer reporte en el continente americano se dio en enero de 1970 en una provincia de Itabuna, Brasil. (Hernández-Martínez & Velázquez-Premio, 2016).

4.2.2 Situación fitosanitaria de la roya del café en México

H. vastatrix patógeno causante de la roya del café fue detectado en los años 80's en el territorio nacional, estableciéndose en las zonas cafetaleras a nivel subendémico. El punto de entrada a México fue por el estado de Chiapas, a partir de donde se diseminó a los demás

estados, estableciéndose en las zonas cafetaleras del país en el año de 1981. El cambio climático predispone a un ataque masivo por la roya del café en México. Entre 2007 y 2012 la epidemia presentada en América Central demostro el riesgo socioeconómico de la enfermedad debido a su distribución, incidencia y severidad, a lo que se sumo el limitado manejo agronómico en plantaciones superiores a 20 años de edad susceptibles al hongo (Mora-Aguilera et al., 2021) Actualmente el hogo esta localizado en gran parte de las zonas de café del país sembradas con variedades susceptibles (Figura 1), afectando la producción de café cereza desde el año 2012 (Santiago-Elena et al., 2020). Los niveles de incidencia y severidad de *H. vastatrix* dependen de las condiciones agroecológicas de cada región, así como del manejo agronómico realizado en el cultivo (SENASICA, 2018a). Por efecto del cambio climatico *H. vastatrix* puede incrementar su distribución altitudinal causando efectos adversos. La precipitación influye directamente en la presentación y severidad de la enfermedad. En los siete últimos años ha provocado perdidas económicas y desastre ecológico en los estados de Oaxaca, Chiapas, Veracruz y Puebla. (Parada-Molina et al., 2020).



Figura 1. Municipios con antecedentes de la roya del cafeto en México (SENASICA 2019)

4.2.3 Taxonomía y descripción de *Hemileia vastatrix* Berk y Broome

Clasificación taxonómica.

La roya del café provocada por *H. vastatrix* identificada a inicios de 1989 en plantaciones de café en la isla de Sri Lanka. Fue descrito por primera vez por el micólogo británico MJ Berkeley como responsable de la enfermedad. Es un parásito obligado, la forma primaria de reproducción es la uredospora. El nombre genérico *Hemileia* refleja la morfología característica de la uredospora que mide 1 μm de ancho, equinulada en su lado convexo y lisa en su cara cóncava, característica que da nombre al género. Tiene gran potencial evolutivo y capacidad de mutación. (Avelino & Rivas, 2013).

Phylum: *Basidiomycota*

Clase: *Urediniomycetes*

Orden: *Uredinales*

Familia: *Chaconiaceae*

Género: *Hemileia*

El género *Hemileia* presenta las siguientes características morfológicas: soros suprastomáticos en forma de ramo, uredosporas ovoides o reniformes con un lado ventral liso y un lado dorsal convexo equinulado, y teliosporas angulares-globosas a muy irregulares. Las uredosporas de *H. vastatrix* miden de 28-36 x 18-28 μm , las teliosporas miden de 20 a 28 μm diámetro, presentan pared hialina lisa de 1 μm de ancho (Talhinhas et al., 2017). Actualmente, se reconocen más de 50 razas fisiológicas de este hongo, identificándose 16 de estas razas en América Latina, siendo la raza II la de mayor espectro de infección (Capucho et al., 2012).

4.2.4 Hospederos de *Hemileia vastatrix*.

H. vastatrix produce uredosporas, teliosporas y basidiosporas sexuales. No se ha informado de la infección por basidiosporas (Koutouleas et al., 2019). Se desconoce la existencia de algún hospedante alternativo capaz de soportar la etapa aecial en el ciclo de la enfermedad, se conoce como único hospedador al género *Coffea* spp., ataca principalmente al café árabica y robusta (SENASICA, 2018b).

4.2.5 Ciclo patológico de la roya del café

Desde el diagnóstico del primer foco de infección de *H. vastatrix* en el continente americano este ha evolucionado de manera constante como resultado de la presión ejercida de los genotipos en colecciones o parcelas comerciales (Avelino et al., 2015).

Los hongos de la roya como biótropos obligados solo pueden alimentarse, crecer y reproducirse en huéspedes vivos, solo en ellos es donde diferencian los haustorios, estructuras específicas necesarias para establecer interacciones íntimas dentro de tejidos del huésped infectado (Lorrain et al., 2018). A pesar de ser considerado parásito obligado, su germinación es posible en medios de cultivo (Alvarado-Castillo et al., 2017) .

Hemileia vastatrix produce uredosporas, teliosporas y basidiosporas, las primeras dos se producen en el mismo soro, pero en momentos diferentes. Las uredosporas son dicarióticas y representan el ciclo asexual, reinfectando las hojas cada vez que existan condiciones ambientales óptimas para su desarrollo. Las teliosporas ocurren raramente y germinan *in situ*, producen promicelio del cual se forman cuatro basidiosporas, estas últimas no pueden infectar las hojas del café (Koutouleas et al., 2019).

La primera etapa infectiva de la roya es la diseminación de uredosporas la cual presenta las fases de liberación, cuando la uredospora se desprende del esporóforo, la dispersión se da

cuando la espora abandona la lesión, la última fase se da con la depositación de la uredospora en la hoja del cafeto. Le siguiente etapa es la germinación, en su inicio esta se lleva a cabo únicamente con las reservas de la uredospora. La tercera etapa se da cuando el hongo ingresa por los estomas de la hoja, estableciéndose la relación trófica entre el hongo y el hospedero, marcando el inicio de la infección. Cuando las hifas colonizan las hojas dan origen a la aparición de las lesiones amarillas, siendo las hojas jóvenes las más susceptibles. El periodo de incubación abarca desde la germinación a la aparición de los primeros signos de la enfermedad, este periodo se reduce ante la presencia de factores ambientales óptimos que favorecen el crecimiento del patógeno e invade a la planta al máximo de su potencial, dando origen a epidemias más graves (Ghini et al., 2011).

La producción del esporóforo y la aparición de uredosporas con capacidad infectiva conforman la etapa denominada esporulación. La variable de mayor importancia es el periodo de latencia que comprende del inicio de la germinación a la esporulación, mientras más corto sea, más se repite el ciclo originando epidemias más graves, las cuales se originan durante y al final de la cosecha (Avelino & Rivas, 2013).

La roya del café afecta de manera negativa la producción de café, en México de los años 2013 al 2016 hubo una reducción del 45%, equivalente a 2.8 millones de sacos, afectando de manera directa a la economía de 510 544 agricultores cuya actividad principal es la venta de café (Cerna-Chávez et al., 2019).

4.3 Propóleos.

Los propóleos son un producto fabricado por diversos géneros de abejas, el cual elaboran al mezclar enzimas mandibulares, aceites vegetales, polen y exudados de plantas y árboles circundantes a la colmena los cuales recolectan durante el pecoreo, el cual usan como

desinfectante y embalsamador de cadáveres invasores a la colmena. Cuenta con diversas propiedades demostradas como lo es su capacidad antimicrobiana, antioxidante, inmunomodulador (Freitas et al., 2019). Los polifenoles son su principal constituyente, los cuales representan su principal ingrediente activo. En el transcurso de la historia se ha hecho mención de los propóleos y su uso como medicina, es mencionado por Aristóteles como remedio para infecciones de la piel, usado por los incas para combatir cuadros febriles originados por infecciones, usado por los franceses en el siglo XVII y XVIII como tratamiento de heridas infectadas y cicatrizante (Bucio et al., 2016).

Las ceras y material insoluble en etanol representan el mayor porcentaje del peso de los propóleos (Delgado et al., 2015). Su composición química es variada a consecuencia de factores tales como: el origen de los exudados, factores medioambientales, vegetación y época de producción-recolección. La complejidad en su composición química y concentración de los compuestos químicos en los propóleos complican su estandarización y control de calidad (Katekhaye et al., 2019).

La importancia de este subproducto de la colmena radica en las moléculas con actividad biológica activas presentes en él, de los cuales se han reconocido más de 350 diferentes compuestos, y aún se siguen descubriendo nuevos compuestos, los cuales le confieren sus principales propiedades (Freitas et al., 2019). Macroscópicamente las resinas y balsamos representan del 50 al 60% de los propóleos, la cera 30 a 40% si este porcentaje mayor afecta la pureza de los propóleos (Palomino et al., 2010), en proporción del 7 al 10% se encuentran presentes aceites esenciales y aromáticos, polen en un 5%, complejos orgánicos en un 4%, elementos minerales en un 1% (Valencia et al., 2012).

4.3.1 Etimología de los propóleos.

Etimológicamente deriva de las palabras griegas “pro” antes y “polis” ciudad, haciendo alusión a la función protectora que desempeña el producto en la colmena. La palabra fue acuñada por Aristóteles, la cual se ha extendido y se usa indistintamente como propóleos o própolis, siendo este último más universal (Katekhaye et al., 2019).

4.3.2 Origen y naturaleza de los propóleos.

Definido los propóleos como una mezcla donde intervienen principalmente partes vegetales (resinas) y animales (cera y enzimas), la composición de la fracción resinosa de los propóleos está estrechamente vinculada con la vegetación del cual se obtuvieron los elementos para su elaboración. El proceso de pecoreo de los diversos materiales para la elaboración de los propóleos es realizado por las abejas adultas, las cuales recolectan exudaciones de diversas plantas, resinas, gomas y materiales lipofílicos entre otros, ayudándose de su sistema mandibular y primer par de patas, adicionándole de manera simultánea secreciones enzimáticas que favorecen el ablandamiento y moldeado del material recolectado. La variabilidad química de los propóleos producido por *Apis mellifera* está influenciada principalmente por la flora presente en los sitios de pecoreo, esta varía en las diferentes áreas geográficas y periodos determinados, otros factores que afectan su composición química son la relación planta insecto, disponibilidad de polen, oferta de néctar o de exudaciones que favorecen la elaboración de propóleos (Bankova, 2009). La producción de propóleos es única en cada región geográfica, determinada por diversidad de la vegetación donde las abejas realizan el pecoreo para su elaboración, la composición de estos compuestos químicos determinan la composición química del propóleos haciéndolos únicos (Delgado et al., 2015).

4.3.3 Propiedades de los propóleos.

Los propóleos son un subproducto de la colmena el cual ha sido utilizado durante milenios por sus diversas propiedades, actualmente es ocupado en apiterapia por sus propiedades medicinales. Sus propiedades medicinales se encuentran avalados por investigación científica, las más reconocidas son su capacidad antimicrobiana, cicatrizante, antiinflamatoria, inmunomodulador, antioxidante, antivírica, antitumoral, así como en la conservación postcosecha de frutas y verduras (Salamanca Grosso, 2017).

Actividad antimicrobiana de los propóleos.

Los propóleos manifiestan actividad biocida contra bacterias y hongos (Bucio et al., 2016). El espectro farmacológico de los propóleos es resultado de la mezcla y acción sinérgica de sus componentes individuales (Trusheva et al., 2019). Su aplicación en la medicina complementaria y alternativa esta dada por la presencia de compuestos fenólicos biológicamente activos tales como: prenilflavonas, cardols, ácidos anacardicos, entre otros (Popova et al., 2013).

Actividad Antifúngica de los propóleos.

Los componentes de naturaleza lipofílica (flavonas e isoflavonas metoxiladas, o isopreniladas) son la primera respuesta que se activa en los tejidos de las plantas los cuales demuestran su potencial antifúngico como barrera frente a la penetración de patógenos (Salamanca Grosso, 2017). El modulador de la actividad antifúngica en los propóleos es el fenético del ácido cafeico (CAPE) (Bankova, 2009). Los propóleos se consideran una alternativa en el control de enfermedades fúngicas debido a que es más amigable con el medio ambiente (Curifuta et al., 2012).

4.3.4 Propiedades físicas de los propóleos

La composición de los propóleos determina sus propiedades físicas, estas se ven afectadas por la forma de colecta, las condiciones medioambientales, y el origen de las resinas (oleorresinas, bálsamos y gomas). A temperaturas de 15 °C su consistencia es dura, a temperaturas inferiores de 4 °C se torna quebradizo. Entre los 25 y 45 °C presenta textura suave, flexible y pegajoso. A temperaturas mayores a 45 °C se torna gomoso. A temperaturas de 60 a 70 °C se vuelve líquido. En algunos propóleos su punto de fusión se presenta a los 64 °C (Ecem-bayram & Can, 2019). El color es influenciado por la presencia de el flavonoide crisina, las tonalidades que presenta son marrón, pardo, verdoso y en algunos casos rojo. El aroma que presentan esta dado básicamente por la presencia de bálsamos y aceites esenciales, el cual puede ser resinoso, desde muy suave hasta aromático, de sabor insípido, astringente o picante (Puerto et al., 2016).

4.3.5 Estructura química de los propóleos

El contenido químico de los propóleos resulta complejo y variable. La cantidad de polifenoles y flavonoides totales establecen la variabilidad química de los propóleos, los cuales son afectados por factores endógenos como el origen geográfico y botánico, el clima, las necesidades de la colmena en un periodo específico y la disponibilidad de exudaciones de la vegetación, así como factores exógenos relacionados con actividades propias del apicultor, el método utilizado para su cosecha, tipo de extracción y solvente utilizado, la composición química determina su bioactividad (Graikini et al., 2019).

Químicamente es poco probable crear una clasificación internacional para los diferentes tipos de propóleos (Salamanca Grosso, 2017). Sin embargo, presentan semejantes propiedades antibacterianas y antifúngicas (Sosa-López et al., 2016). Estudios comprueban la presencia

de hasta 350 compuestos, entre los cuales se encuentran los flavonoides, cetonas, aldehídos, ácidos aromáticos, ésteres de ácidos grasos, esteroides, aminoácidos, terpenos, hidrocarburos, alcoholes y elementos inorgánicos, entre otros. (Palomino et al., 2010).

Compuestos Fenólicos

Forman aproximadamente el 50% del peso total extraído. Su presencia y concentración determinan las principales propiedades biológicas de los propóleos. Los ácidos fenólicos derivan de la biosíntesis del ácido benzoico y cinámico. Químicamente su estructura se caracteriza por presentar un anillo aromático, grupo hidroxilo y función carboxílica (Delgado et al., 2015). Existe correlación en el contenido de los fenoles totales con la actividad biológica presente en los propóleos (Salamanca Grosso, 2017).

Terpenos

Responsables del olor especial y sabor amargo de los propóleos. En interacción con los flavonoides incrementan las funciones y actividades farmacológicas de los propóleos. Se constituyen a partir de 5 carbonos, presentan característica lipofílica y solubles en solventes orgánicos. Desempeñan funciones complejas como feromonas, fitohormonas, insecticidas naturales y hormonas sexuales entre otros. Se agrupan según los átomos de carbono del esqueleto carbonado, los monoterpenos (C_{10}), los más sencillos y ampliamente usados de manera comercial, sesquiterpenos (C_{15}), Diterpenos (C_{20}), Triterpenos (C_{30}), Carotenoides (C_{40}) y Poliisoprenoides (C_5)_n (Sun et al., 2020)

Policétidos

Clasificados de acuerdo con el contenido de unidades de acetato: tetracétidos, (C_4), Pentacétidos (C_5), hexacétidos (C_6), Heptacétidos (C_7), Octacétidos (C_8), nonacétidos (C_9)

y decacétidos (C10). Productos resultante del metabolismo secundario de microorganismos, poseen actividades biológicas como antibióticos, antifúngica y antiparasitaria (Salamanca Grosso, 2017).

Alcaloides

Metabolitos secundarios principalmente de las plantas con diversidad fisiológica y estructural, sintetizados a partir de aminoácidos como la ornitina y lisina. Clasificados en protoalcaloides, alcaloides verdaderos, isoquinoleícos, derivados del triptófano, del ácido antranílico y pseudoalcaloides (Salamanca Grosso, 2017).

V. MATERIALES Y MÉTODOS

Esta investigación se realizó en los años 2020-2021. Los ensayos se realizaron en el laboratorio de control biológico ubicado en las instalaciones del Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional del Instituto Politécnico Nacional unidad Oaxaca (Figura 2), en Santa Cruz Xoxocotlán, Oaxaca ($17.027768^{\circ}\text{N}$ y $96.720090^{\circ}\text{O}$ /1564m.s.n.m.).



Figura 2. Ubicación del Laboratorio de control biológico del CIIDIR unidad Oaxaca, IPN.

5.1 Colecta del material en campo

5.1.1 Recolección de propóleos.

La obtención de las muestras de los propóleos se realizaron durante el mes de noviembre de 2020 de colmenas ubicadas en tres municipios del estado de Oaxaca (Figura 3):

- a. San Andrés Huaxpaltepec, Costa de Oaxaca, Latitud $16^{\circ}19'52''$, longitud $97^{\circ}55'34''$, 240 msnm. Rango de temperaturas de $24 - 28^{\circ}\text{C}$, y con un rango de precipitación de

1 200 – 2 000 mm. Clima cálido subhúmedo con lluvias en verano. Vegetación selva (INEGI, 2005).

b. Zimatlán de Álvarez, Valles Centrales de Oaxaca, Latitud 16°53'42", longitud 96°47'59", 1540 msnm. Rango de temperatura 12 -22°C, rango de precipitación 600 – 2500 mm. Templado subhúmedo con lluvias en verano. Vegetación bosque y pastizal inducido (INEGI, 2005).

c. Santiago Ihuitlán Plumas, Mixteca Alta de Oaxaca, latitud 17°51'35" longitud 97°25'12" msnm 2088. Rango de temperatura 14 – 18 °C, Rango de precipitación 600 -700 mm, Templado subhúmedo con lluvias en verano y semiseco templado. Vegetación pastizal inducido y bosque (INEGI, 2005).

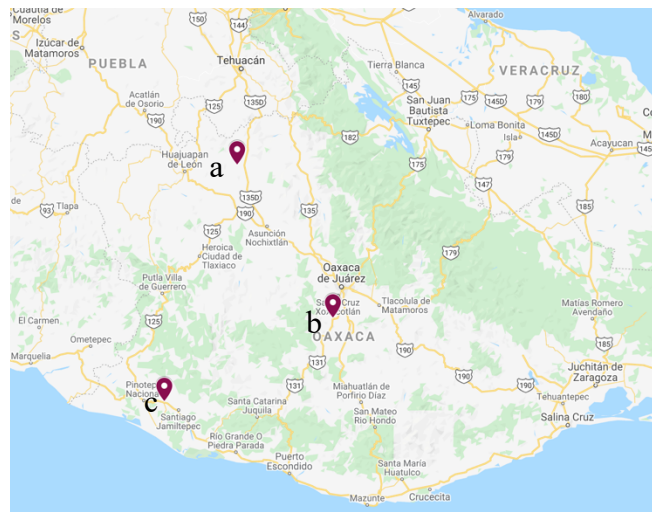


Figura 3. Ubicación de sitios de colecta de propóleos. a) Santiago Ihuitlán Plumas, b) Zimatlán de Álvarez, c) San Andrés Huixtla.

La recolección de los propóleos se realizó siguiendo la metodología señalada en la Norma Oficial Mexicana NOM-003-SAG/GAN-2017.

Embalaje de los propóleos;

Las muestras obtenidas (Figura 4), se depositaron en envases de plástico con capacidad de 500 mL y se almacenó en refrigeración a 8° C (Figura 5), para su transporte al laboratorio central del CIIDIR unidad Oxaca y posterior almacenamiento a -20° C +/- 3° C hasta su uso. Simultáneo a la recolección de los propóleos fueron tomados datos de campo; lugar de la colecta y fecha.



Figura 4. Colecta de propóleos en el municipio de San Andrés Huaxpaltepec (región costa)



Figura 5. Almacenaje de muestras de propóleos

5.1.2 Colecta de roya (*Hemileia vastatrix*)

Las hojas con presencia de roya (*H. vastatrix*) fueron colectadas de cafetales localizados en las coordenadas Latitud 16°58'41", longitud 97°48'45", 1300 msnm en la localidad de San José Zaragoza, Municipio de Santa María Yuchuiti, Oaxaca, donde primero se identificó de forma cualitativa (visual) la existencia del hongo (Figura 6).



Figura 6. Plantas de café con presencia de roya.

Se realizó la colecta de hojas completamente desarrolladas las cuales manifestaban lesiones características de roya (pústulas) en distintos estados de desarrollo las cuales se encontraban libres de micoparásitos de acuerdo con la metodología propuesta por Gómez-De la Cruz (2017). Se recorrió la parcela realizando muestreos a plantas con lesiones de roya, se colectaron 37 hojas ubicadas en el dosel medio de la planta con diferentes niveles de severidad (Figura 7), para posteriormente diagnosticar el grado de daño de la roya en la hoja de acuerdo con la escala propuesta por el SENASICA (Figura 8). La variedad de los cafetos

donde se colectaron las muestras corresponde a la variedad Bourbon, con edad aproximada de 5 años de establecida la plantación.

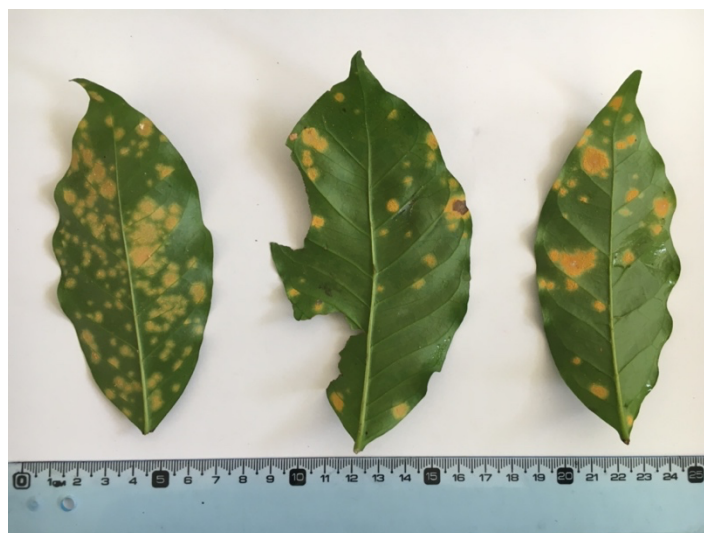


Figura 7. Determinación de severidad e intensidad de roya en hoja de café.

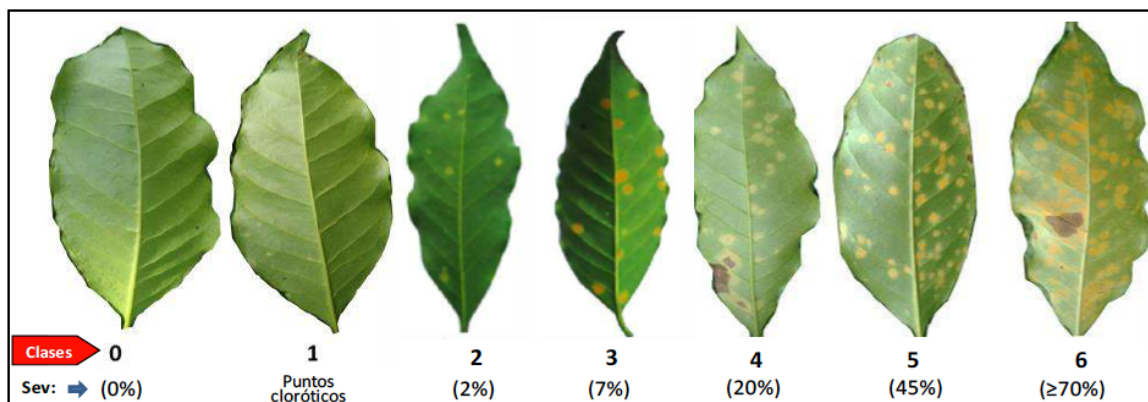


Figura 8. Escala logarítmica-diagramática de 7 clases para la determinación del porcentaje de daño de la roya en tejido foliar (SENASICA 2018).

Las hojas colectadas se depositaron en cámaras húmedas, en una hielera a 8°C +/- 1°C para su traslado al laboratorio del CIIDIR Oaxaca para su análisis (Figura 9).



Figura 9. Almacenamiento de cámaras húmedas con muestras de roya de café.

5.2 Obtención y preparación de extractos etanólicos de propóleos (EEP) en laboratorio

La obtención de los extractos etanólicos se llevo a cabo con lo señalado en la Norma oficial mexicana NOM-003-SAG/GAN-2017, modificando el proceso en la concentración de los propóleos utilizando equipo de baño maria. A las muestras de propóleos colectadas en campo se les retiro todo tipo de contaminación macroscópica tales como pedazos de madera, insectos, restos de plantas. Luego se trituraron de forma mecánica hasta reducir considerablemente su granulometría. Estas se conservaron en refrigeración a 4°C y protegidas de la luz hasta su uso.

De la muestra de propóleos previamente acondicionada se tomaron 130 g los cuales se depositaron en un matraz Erlenmeyer con capacidad de 500 mL, se añadió etanol en una proporción de 1:3 p/v (Figura 10), esta mezcla permanecio en agitación continua usando un sistema de agitación magnética (Cimarec 3) durante 72 h a temperatura ambiente con una máxima de 33 ± 2 °C y una mínima de 23 ± 2 °C en completa oscuridad (Figura 11). Pasado

este tiempo se separó por filtración sobre papel filtro (Whatman No. 45) con poro de 185 mm de diámetro para eliminar posibles sólidos, separando el filtrado y el solido residual, a este filtrado se le realizó un segundo filtrado con papel filtro (Whatman No. 42) con poro de 110 mm de diámetro para eliminar partículas mas pequeñas.

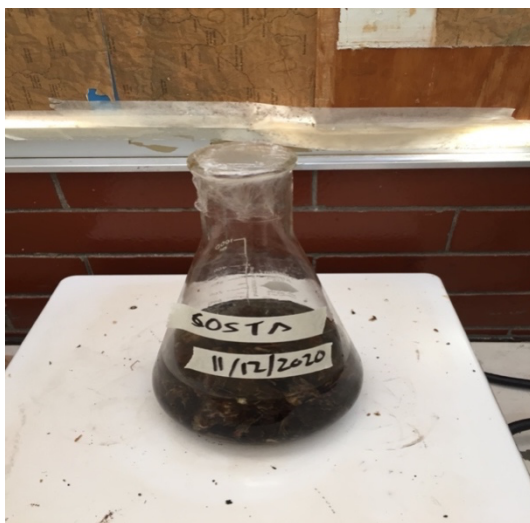


Figura 10. Mezcla propóleos/etanol.



Figura 11. Agitación de la mezcla propóleos/etanol.

Para la eliminación de ceras, los filtrados de los extractos se almacenaron en refrigeración a temperatura de 4°C hasta dejar de observar precipitación de las ceras (Figura 12), y por medio de decantación se separaron del extracto (Figura 13), la etapa de refrigeración se realizo hasta que las ceras dejaron de precipitarse, posteriormente fueron filtrados mediante papel filtro Whatman No. 42. El nuevo filtrado constituyo el filtrado final, los cuales se almacenaron en frascos estériles color ámbar de 200 mL de capacidad rotulados y mantenidos en refrigeración a 4°C.

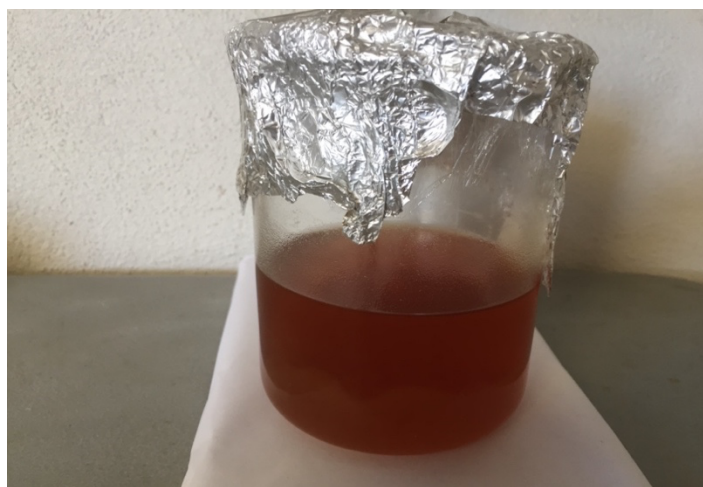


Figura 12. Sedimentado de ceras por refrigeración EEP Costa.

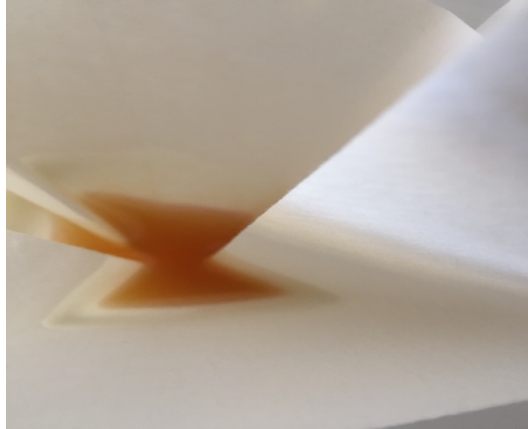


Figura 13. Filtrado de EPP región Costa para eliminación de ceras.

La eliminación del solvente de los extractos etanólicos de propóleos (EEP) se llevo acabo sometiendo los filtrados a baño maria a temperatura constante de $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 5 h (Figura 14), obteniéndose el extracto blando. Posteriormente los extractos blandos se depositaron en una bomba de vacio para retirar todo el etanol. El extracto resultante se almaceno en botes de plástico de color oscuro conservándolos en refrigeración a una temperatura de 4°C , protegiendolos de la luz hasta su uso y análisis, y se considero la base de 100% en concentración para elaborar los tratamientos a evaular al 2.5, 5 y 10% de concentración.



Figura 14. Eliminación de etanol en EEP.

5.3 Rendimiento de los propóleos de tres zonas del estado de Oaxaca.

El rendimiento de los extractos obtenidos se estableció por diferencia de peso en relación al peso seco del propóleo al inicio de la prueba, para esta determinación se trabajó con tres muestras por sitio de la región de estudio (Costa, Mixteca y Valles de Oaxaca) y se empleó la fórmula propuesta por Rodríguez Pérez et al. (2022). El rendimiento de cada propóleo se calculó empleando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de rendimiento} = \frac{\text{Peso del extracto (g)}}{\text{Peso inicial de la muestra (g)}} \times 100$$

Análisis estadístico

Los resultados obtenidos fueron analizados mediante un análisis de varianza (ANOVA), la comparación de las medias entre los tratamientos, se realizó utilizando una prueba de Tukey con un nivel de significancia del 95% con el programa estadístico Statistical Analysis System (2002) y así determinar si existía diferencia estadística significativa entre las medias de los rendimientos de los propóleos.

5.4 Identificación de *Hemileia vastatrix*

5.4.1 Preparación de la suspensión de uredosporas

El inóculo de *H. vastatrix* se obtuvo de lesiones frescas de roya, las cuales se inspeccionaron previamente utilizando un microscopio estereoscópico (Figura 15), para seleccionar solo aquellas lesiones libres de artrópodos micófagos, principalmente ácaros y larvas de dípteros, y micoparasitos (Carvalho et al., 2011).



Figura 15. Observación de lesión de roya en microscopio estereoscópico.

Para asegurar la viabilidad de las uredosporas de *H. vastatrix* se seleccionaron pústulas de color naranja con esporulación, de donde se obtuvieron directamente uredosporas a través del raspado con ayuda de un asa de platino de uso bacteriológica depositando el raspado en un vaso de precipitados de 100 mL de capacidad el cual contenía agua destilada. Como dispersante en la separación de las uredosporas del agua se utilizó Tween 80, en seguida se realizaron diluciones seriadas en agua destilada esteril más Tween 80 a 0.1% hasta conseguir concentraciones que permitieron contabilizar las uredosporas usando la cámara Neubauer (Figura 16). Establecida la suspensión inicial, se preparó la concentración final de 1×10^7 uredosporas/mL (Figura 17).



Figura 16. Conteo de uredosporas en cámara de Neubauer.

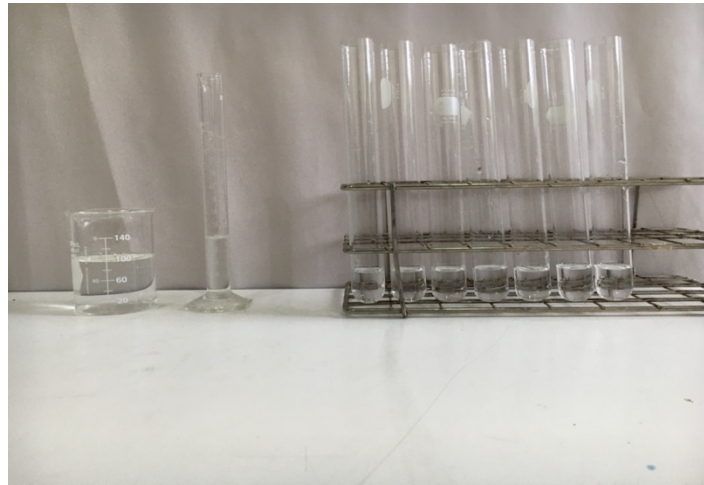


Figura 17. Diluciones seriadas de solución con *H. vastatrix*.

Hecha la suspensión de uredosporas se procedio a la identificación del hongo y se realizo mediante la elaboración de preparaciones temporales, de acuerdo con la metodología propuesta por el SENASICA.

5.4.2 Detección e identificación de *Hemileia vastatrix*.

Para la indentificación del hongo se utilizo la metodología propuesta por el laboratorio de micología del Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria del SENASICA 2018. Se coloco una gota de agua destilada en un portaobjetos, impidiendo la formación de burbujas de aire, con ayuda de un asa bacteriológica se raspo una pústula de roya adicionandola a la gota colocada en el portaobjetos, posteriormente se coloco un cubreobjetos y se presiono ligeramente, posteriormente se realizo su observación en un microscopio con el objetivo de 100x. Para esta determinación se observaron 20 muestras

5.5 Efecto de propóleos sobre la germinación de uredosporas de *Hemileia vastatrix*.

5.5.1 Evaluación de daño a uredosporas en portaobjetos.

Para el desarrollo del experimento se empleó la metodología diseñada por Martínez et al. (2012). En un portaobjetos se colocaron 5 μL de la suspensión de uredosporas de *H. vastatrix* (1×10^7 uredosporas/mL), a cada gota se le aplicaron 12 μL de cada uno de los tratamientos a evaluar. Cada portaobjetos se colocó en una cámara húmeda (Stock y Kaya, 1997), las cuales se consistieron de una caja Petri de 110 x 15 mm de diámetro la cual contenía en su interior una tapa de caja Petri de 55 x 10 mm de diámetro; luego, sobre la caja Petri de menor diámetro se colocó un círculo de papel filtro Whatman No. 45 de 10 cm de diámetro, al cual se le agregaron 5 mL de agua destilada estéril las cuales se mantuvieron en oscuridad a una temperatura de 24°C (Figura 18).

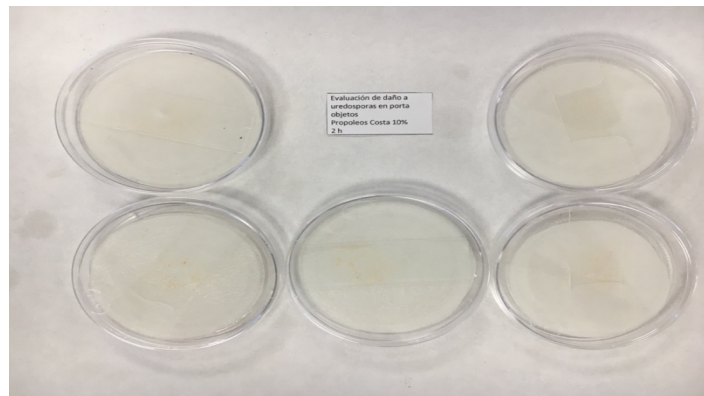


Figura 18. Evaluación de daño a uredospora en portaobjetos. Propóleos región costa al 10%

La variable a medir fue el daño a las uredosporas en los periodos de tiempo de 2, 4, 6, y 48 h. Los portaobjetos se examinaron en un microscopio con el objetivo de 100x, se determinó el daño ocasionado a 100 uredosporas seleccionadas al azar. Se consideró daño a la

uredospora cuando esta presentó deshidratación, lisis o decoloración con respecto a su apariencia normal (Figura 19). El porcentaje de daño de las uredosporas se calculó sobre las uredosporas evaluadas (100).

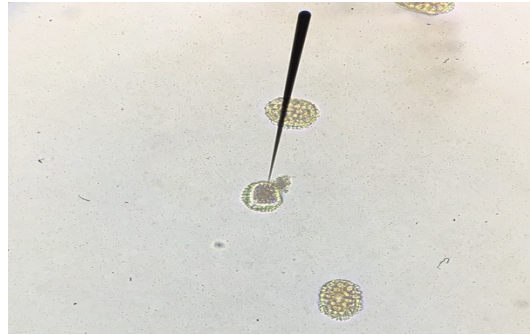


Figura 19. Uredospora de *H. vastatrix* con lisis celular en tratamiento de propóleos de la mixteca al 10%.

Cuadro 3. Tratamientos evaluados de uredosporas en portaobjetos con propóleos.

Factor	Niveles	Tratamiento
Región	a1=costa	T1=a1*b1
	a2=Mixteca	T2=a1*b2
	a3=Valles Centrales	T3=a1*B3
Concentración	b1=10%	T4=a2*b1
	b2=5%	T5=a2*b2
	b3=2.5%	T6=a2*b3
		T7=a3*b1
		T8=a3*b2
		T9=a3*b3
		T10=control negativo agua destilada
		T11=control positivo Alto 100 sl

Diseño Experimental.

Se trabajo con un Factorial multinivel 3X3, n=5, total de 45 unidades experimentales. La unidad experimental estuvo formada por unidades de lectura en las cuales se determino el porcentaje de daño a la uredospora. Se considero región de colecta de los propóleos, y su concentración. Para el factor región, tres niveles: Costa, Mixteca y Valles centrales, el factor concentración, tres niveles 2.5, 5 y 10%, un control negativo (agua destilada) y un control positivo (Alto 100 sl), para un total de 11 tratamientos con cinco repeticiones cada uno.

Análisis estadístico

Los resultados obtenidos fueron analizados mediante un análisis de varianza (ANOVA), la comparación de las medias entre los tratamientos, se realizó utilizando una prueba de Tukey con un nivel de significancia del 95% con el programa estadístico Statiscal Analysis System (2002), además se hizo una análisis de regresión lineal para establecer el comportamiento del daño hacia la uredospora.

5.5.2 Inhibición de germinación de uredosporas a base de propóleos.

Para esta determinación se trabajo con la metodología diseñada por Alvaro-Carrillo *et al.* (2017) modificando los tiempos en los cuales se realizaron las lecturas (Alvarado-Castillo *et al.*, 2017) .

Se evaluo la inhibición de germinación de uredosporas con cada propóleos. Se evaluaron tres concentraciones de cada propóleo: 2.5, 5 y 10%, un control positivo que contenia fungicida comercial (Alto 100 sl) en la dosis recomendada por el fabricante. Se deposito 1 mL de cada tratamiento en las placas de posillos multiples a los cuales se les añadio 1 mL de suspension

de uredosporas 1×10^7 uredosporas/mL, se incubaron en cámara húmeda a 24°C en condiciones de oscuridad (Figura 20). De esta solución se tomaron 12 μ l los cuales se colocaron en portaobjetos de vidrio y se observaron a 100X de aumento en microscopio compuesto, realizando las observaciones a las 2, 4, 6, 48 y 72 h de haberse aplicado el tratamiento (Figura 21). El porcentaje (%) de inhibición de uredosporas germinadas se calculo sobre las uredosporas totales, este proceso se llevo a cabo en cinco repeticiones.

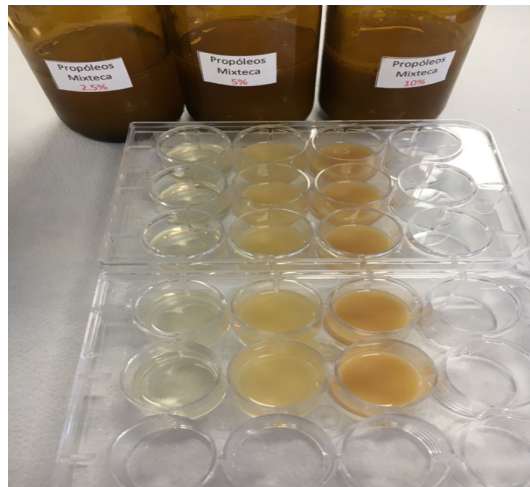


Figura 20. Ensayo de inhibición de germinación de uredosporas con propóleos de la región mixteca al 2.5, 5 y 10%.

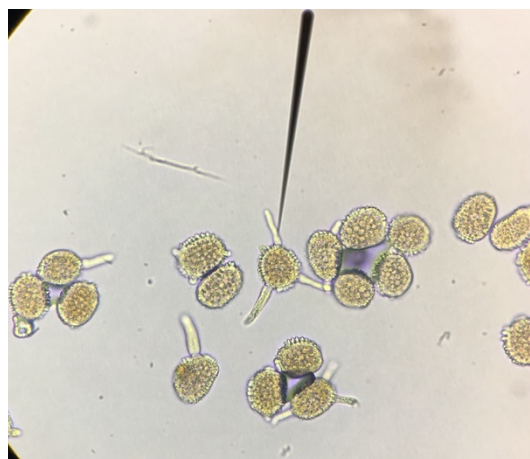


Figura 21. Inhibición de la germinación de propóleos de la región mixteca al 10% a las 48 h.

5.5.2.1 Conteo de la inhibición en la germinación de uredosporas

Con la ayuda de un hemacitómetro se contabilizaron las uredosporas germinadas y no germinadas a las 2, 4, 6, 48 y 72 h. Las uredosporas se consideraron como germinadas cuando presentaban el desarrollo de uno o más tubos de germinación y se consideraron como no germinadas cuando no presentaban tubos de germinación.

Análisis de datos.

Se utilizó un diseño aleatorio en arreglo factorial para todas las pruebas. Para observar diferencias significativas específicas entre tratamientos se utilizó una prueba (ANOVA), las comparaciones de las medias entre los tratamientos se realizó utilizando una prueba de tukey con un nivel de significancia del 95% con el programa estadístico Statistical Analysis System (2002). Se realizó un análisis de regresión lineal para establecer el comportamiento de la inhibición de la germinación hacia la uredospora.

5.5.3 Evaluación de extracto etanólico de los propóleos en la inhibición de la germinación de uredosporas en disco de hoja de café en laboratorio

Se realizó con la metodología propuesta por García-Nevárez (2019), se colectaron hojas de variedad bourboun completamente desarrolladas y con lesiones de roya en distintos estados de crecimiento que no contuvieran micoparásitos, los discos de hoja de café con pustulas de roya se extrajeron con sacabocados de 1.2 cm de diámetro, estos se colocaron en una cámara húmeda y se les aplicaron 12 μ l de cada uno de los tratamientos a evaluar (Figura 22).

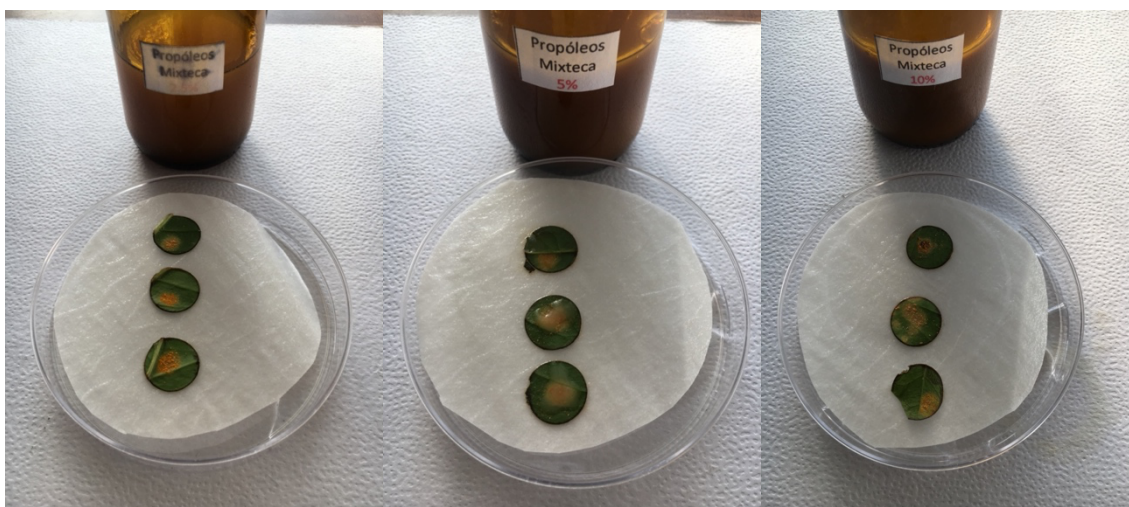


Figura 22. Evaluación de propóleos en inhibición de la germinación de uredosporas en disco de hoja de café.

Evaluación en la inhibición de la germinación de uredosporas en disco de café de propóleos. La variable a medir fue la necrosis de las uredosporas sobre las pústulas de *H. vastatrix*. Las mediciones se hicieron cada 24 h hasta siete días después de la aplicación del tratamiento para lo cual se tomaron fotografías a cada disco de hoja, a las cuales posteriormente se les realizó un procedimiento de cambio de colores empleando el programa ImageJ el cual nos permitió delimitar superficies con mayor exactitud y precisión en los discos de hoja (Figura 23). Se eligió y midió la superficie ocupada por la lesión de roya para posteriormente ajustar el umbral de color para que la coloración negra causada por la necrosis de las uredosporas sobre las pústulas se identificara con facilidad. El porcentaje de necrosis se obtuvo dividiendo el área necrótica entre el área total de la lesión y el resultado se multiplicó por cien (García-Nevárez & Hidalgo-Jamison, 2019)

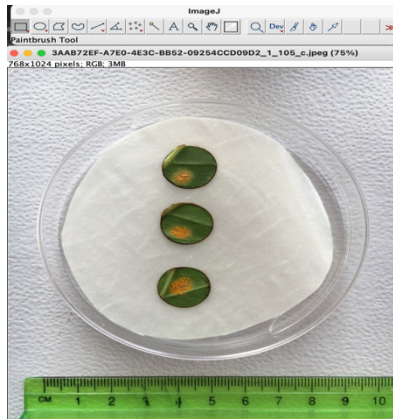


Figura 23. Uso de ImageJ para evaluación del área de necrosis en prueba de inhibición en hoja de café .

Diseño Experimental del ensayo en la inhibición de la germinación de uredosporas en discos de hoja de café en laboratorio.

Se empleó un diseño completamente al azar de dos factores; región de colecta de los propóleos, y concentración. Para el factor región, tres niveles; Costa, Mixteca y Valles centrales, el factor concentración tres niveles 2.5, 5 y 10%, un control negativo (agua destilada) y un control positivo (alto 100 sl), para un total de 11 tratamientos con 3 repeticiones cada uno, el número de repeticiones obedeció a la cantidad de material disponible para la prueba.

Cuadro 4. Tratamientos evaluados en la inhibición de la germinación de uredosporas en discos de hojas de café con propóleos en laboratorio.

Factor	Niveles	Tratamiento
Región	a1=costa	T1=a1 *b1
	a2=Mixteca	T2=a1 *b2
	a3=Valles Centrales	T3=a1 *B3
Concentración	b1=10%	T4=a2 *b1
	b2=5%	T5=a2 *b2
	b3=2.5%	T6=a2 *b3
		T7=a3 *b1
		T8=a3 *b2
		T9=a3 *b3
	T10= agua destilada	
	T11= Alto 100 sl	

La variable respuesta a evaluar fue la muerte de uredosporas, evaluada a las 24, 48, 72, 96, 120, 144 y 168 h.

Análisis estadístico

Los resultados obtenidos fueron analizados mediante un análisis de varianza (ANOVA), la comparación de las medias entre los tratamientos, se realizó utilizando una prueba de Tukey con un nivel de significancia del 95% con el programa estadístico Statiscal Analysis System (2002), además se hizo un análisis de regresión lineal para establecer el comportamiento de la inhibición de la germinación hacia la uredospora

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Rendimiento de extractos etanólicos

Para esta determinación se encontró que la región de la mixteca obtuvo los mayores rendimientos (g) de propóleos en las tres muestras obtenidas con una media de 24.57 g seguido del propóleos obtenido de los Valles Centrales con un 11.96 g y finalmente el propóleos de la Costa con tan solo un 8.1 g. Se encontró una diferencia en peso de 12.61 g con respecto a Valles y 16.47 g con respecto a la Costa. (cuadro 5). La región de la mixteca superó a los Valles y la Costa en más del 51, 33 y 67.04% respectivamente. Para poder explicar esta diferencia de rendimientos encontrados de propóleos en estas tres zonas de estudio, un factor a considerar es la vegetación del área de recolección, así como las condiciones climáticas como lo demuestra Lugo-Sepulveda (2009), la región de la mixteca se caracteriza por climas con altas temperaturas, inviernos fríos y veranos secos, con pastizales bien establecidos de forma permanente y bosques mesófilo de montaña, además de diversos tipos de matorrales, con temperaturas que van desde 16 – 22 °C factores ambientales poco modificados, aunque la costa presenta mayor diversidad de vegetación de dunas costeras, selva baja caducifolia y selva baja espinosa, esta vegetación es propia para la producción de miel por el flujo de néctar que presenta no así para la producción de propóleos por la reducida producción de exudados por parte de la flora. Además de temperaturas altas que van desde 25 -33 °C los cuales limitan la presencia de gomas, resinas y exudados de la vegetación como lo confirman trabajos de Milena Popova (2017). Bucio Villalobos et al. (2017) en Irapuato, México, obtuvo una producción de 45 g/colonia por un periodo de un año, Campero Lazarte (2017) obtuvo en la comunidad de Chulamani Bolivia una producción de 80 g/colonia al año. Ambos trabajos obtuvieron mayor rendimiento de propóleos de 20.5

y 55.5 g, es importante señalar que en el presente trabajo se tomó solo una vez la muestra y que en promedio se pueden tomar tres veces al año el propóleo, además de que se obtuvieron diferentes rendimientos entre los propóleos de las diferentes regiones, situación que fue previamente reportada por Rodríguez-Pérez et al. (2020), donde se menciona que la composición y rendimiento de los propóleos varían de acuerdo a la vegetación presente. Las medias encontradas en los sitios señalan que hay diferencia significativa entre los rendimientos de los propóleos de la Mixteca, Valles Centrales y la Costa, siendo los propóleos de la Mixteca los que mayor rendimiento presentaron.

Cuadro 5. Rendimientos de los propóleos por sitio de estudio.

Muestra de propóleos	Rendimiento (g)			Medias (g)
	repetición 1	repetición 2	repetición 3	
Costa	8	8.2	8.1	8.1 a
Valles Centrales	12	11.7	12.2	11.96 a
Mixteca	25	25.43	23.3	24.57 b

Letras distintas indican diferencia significativa entre regiones para las pruebas de Tukey ($P \leq 0.05$)

6.2 Identificación del hongo *Hemileia vastatrix*

De las muestras obtenidas en campo (37 hojas). Se encontraron que el 100 % de las hojas de cafetos presentaban síntomas y signos propios de la enfermedad, manchas cloróticas en la cara inferior de las hojas y pustulas de color naranja en diferentes estadios de desarrollo por la presencia de uredosporas. En laboratorio, el diagnóstico confirmativo de la presencia de

H. vastatrix se dio tras la identificación positiva de uredosporas al observarlas en el microscopio compuesto con el objetivo de 100X las cuales presentaban características morfométricas tales como paredes laterales lisas y planas las cuales están en contacto con otras uredosporas, las paredes libres convexas y equinuladas, con verrugas cónicas o truncas, de 3 a 4 μm de largo típicas que definen a *H. vastatrix*, existen otras formas y trabajos más confiables en la determinación en la presencia o ausencia de *H. vastatrix* en hojas de café, trabajos como los expuestos por Setiawati et al. (2021) y Quispe-Apaza et al. (2017) en Perú analizaron la variedad genética de *Hemileia vastatrix* a través de secuenciación de los espaciadores internos transcribibles del ADN ribosomal (ITS). Calderón Rueda (2015) identificó a través de métodos moleculares a los morfotipos de *Hemileia vastatrix* causante de la roya del café en la provincia de Loja en Ecuador. Ramón Silva-Acuña et al (1997) determinaron la presencia de dos razas de *Hemileia vastatrix* y la identificación estuvo basada en la evaluación del espectro de reacciones encontrados en los municipios San Cristóbal y Junín Venezuela.

6.3 Evaluación del daño a la uredospora por el efecto de propóleos en condiciones de laboratorio

A las 2 h todos los tratamientos de propóleos a diferentes concentraciones presentaron porcentajes de control en uredosporas, a este mismo tiempo de evaluación el tratamiento Mixteca 10 presentó el porcentaje más alto con 4 % seguido del tratamiento Valles Centrales 10 con un 3.6 % en los testigos no hubo efecto para eliminar uredospora, a las 4 h estos mismos tratamientos incrementaron su efecto en el control de uredosporas el tratamiento Mixteca 10 incrementó en un 66 % y el tratamiento Valles Centrales 10 en un 6 % y nuevamente los testigos no presentan algún efecto contra uredosporas, a las 6 h se siguió

con la misma tendencia de incrementar los porcentajes de control en todos los tratamientos incluyendo los testigos (Agua destilada 2.2 y Alto 100 sl 1.6%). A las 48 h se debe resaltar que el tratamiento Mixteca 10 presento el porcentaje más alto con 12.6 %, además estadísticamente es diferente con todos los tratamientos evaluados incluido los testigos que presentaron los porcentajes más bajos.

Cuadro 6. Daño a la uredospora por el efecto de propóleos de los sitios Mixteca, Costa y Valles Centrales de Oaxaca.

Tratamientos	%	Tiempo de evaluación (h)			
		2	4	6	48
Costa	10	1.8 b	3.6 b	5.8 b	5.8 b
Costa	5	1.4 b	1.4 b	3.4 c	4.2 c
Costa	2.5	0.8 b	1.2 b	1.8 c	2.8 c
Mixteca	10	4 a	6.6 a	9.6 a	12.6 a
Mixteca	5	3.2 a	4.8 a	5.6 b	8 b
Mixteca	2.5	2.6 b	4 a	4.6 b	7.2 b
Valles Centrales	10	3.6 a	6 a	8.2 b	8.2 b
Valles Centrales	5	1.8 b	2 b	3.2 c	4.4 c
Valles Centrales	2.5	1.8 b	2 b	2.6 c	3 c
Agua destialda		0 b	0 b	2.2 c	2.6 c
Alto 100 sl		0 b	0 b	1.6 c	2.2 c

Letras distintas indican diferencia significativa entre tratamientos para la prueba de tukey (P ≤ 0.05)

Se puede observar que el tratamiento Mixteca10 posee el mejor comportamiento en el daño contra la uredospora, se obtuvo una recta de regresión de $y=14.95+0.8504x$, lo que significa que el tratamiento con este propóleos no solamente tiene la mayor tasa antifúngica, sino que además es el que más rápido presenta los efectos antifúngicos. Trabajos como el de Abbasi et al. (2018) donde hicieron una revisión y se pudo comprobar que los extractos de propóleos son altamente eficaces como bactericidas y fungicidas en tratamientos bucales.

6.4 Inhibición de la germinación de la uredospora a base de propóleos.

En el cuadro 7 se puede observar que todos los tratamientos establecidos además del testigo, presentaron porcentajes de inhibición de la germinación de la uredospora, aunque son bajos en su mayoría nos dan la pauta para seguir trabajando con los propóleos de otros sitios, es de resaltar que se encontraron dos tratamientos que mostraron porcentajes altos en la inhibición de la germinación de la uredospora a todos los tiempos de la evaluación a (2, 4, 6, 48 y 72 h), el primero fue Alto 100 sl con 1, 3.2, 6.2, 7.2 y 11 %, el segundo mejor tratamiento fue Mixteca 10 con 1.8, 4.4, 7.4, 9 y 10.6 %. otro dato a considerar fueron las concentraciones altas de 10 % están superaron a las concentraciones de 5 y 2.5 % en la inhibición de la germinación de la uredospora.

Cuadro 7. Evaluación en la inhibición de la germinación de la uredospora.

Tratamientos	%	Tiempo de evaluación (h)				
		2	4	6	48	72
Costa	10	2.4 a	9.8 a	16.8 a	27 a	28 a
Costa	5	2.6 a	9.8 a	17.4 a	25.4 a	32.4 a
Costa	2.5	3 a	10.2 a	20.2 a	29.4 a	33.2 a
Mixteca	10	1.8 a	4.4 b	7.4 b	9 b	10.6 b
Mixteca	5	2.6 a	9.4 a	13.6 a	15.4 a	17.6 a
Mixteca	2.5	2.8 a	9.6 a	14.4 a	16.8 a	20.2 a
Valles Centrales	10	2.6 a	9.4 a	17.8 a	25.4 a	26.8 a
Valles Centrales	5	2.6 a	9.6 a	18 a	26 a	27 a
Valles Centrales	2.5	2.8 a	9.8 a	19.8 a	27.2 a	30.8 a
Agua destilada		3 a	11 a	20.6 a	34.2 a	37.4 a
Alto 100 sl		1 a	3.2 b	6.2 b	7.2 b	11 b

Letras distintas indican diferencia significativa entre tratamientos para la prueba de tukey ($P \leq 0.05$).

El análisis de regresión lineal ($y = 0.3521+0.03986x$) demuestra que, a excepción de Mixteca10, los tratamientos no inhiben la germinación de la uredospora tan eficientemente

como lo hace el fungicida Alto 100 sl. Para comprobar que Mixteca10 es tan eficiente como Alto 100 sl, se determinó que no existe diferencia estadística entre el fungicida Alto 100 sl y el propóleo Mixteca10, Silva-Castro et al. (2018) evaluaron la actividad antifúngica con *H. vastatrix* y encontraron que los extractos etanólicos de propóleo brasileño inhiben la germinación de la uredospora hasta en un 54%, aquí se encontró que el propóleo Mixteca10 inhibió la germinación de la uredospora hasta en un 90%, 36% mayor efectividad que lo mostrado por Silva-Castro et al. (2018) y fue igual de eficiente que el fungicida comercial Alto 100 sl. Papp et al. (2021) mostraron la efectividad de los propóleos como antifúngico, aunque no se trató del hongo de la roya del café, pero si demuestran que el propóleo es altamente eficiente como antifúngico, como se demostró también en este trabajo. Otro estudio como el que realizó Manrique Antonio (2006) usó el propóleo y mostró actividad antimicrobiana, al inhibir el desarrollo del *Staphylococcus aureus* ATCC 25.923 con halos de inhibición de hasta 30 mm y del *Micrococcus luteus* ATCC 9.341.

6.5 Inhibición de la uredospora en hoja de café

En la inhibición de esporas en hojas de café a las 48 h se puede observar que el tratamiento Mixteca 10 presentó los valores más altos con un 20.6%, seguido del testigo Alto 100 sl con un 15 % y estadísticamente estos dos tratamientos son diferentes al resto de los tratamientos. A las 72 h se alcanzaron porcentajes de inhibición de más del 50 % en dos tratamientos Mixteca 10 presentó un 58%, Valles Centrales 10 un 63.3%. A las 144 h tiempo que se terminaron las observaciones y es de resaltar que las concentraciones altas al 10% por sitio de muestreo de propóleos, se presentaron los mayores porcentajes en la iniciación de la uredospora, como fue al tratamiento Costa 10 con un porcentaje de un 76.6%, mixteca 10 con un 95.3%, y finalmente al tratamiento Valles Centrales 10 con un 83.6%, además del

testigo Alto 100 sl con un 96%, el testigo (agua destilada) fue el tratamiento con los menores porcentajes de inhibición con 37.6 % a las 144 h y este tratamiento fue estadísticamente diferente a los sitios con concentraciones del 10%. Trabajos como el de Silva-Castro et al. (2018) en su trabajo donde evaluó la germinación de la uredospora en hojas de *Coffea arabica* presenta resultados diferentes ya que el lapso de tiempo analizado fue mayor en el presente trabajo.

Cuadro 8. Evaluación de la inhibición de la uredospora en hojas de café.

Tratamiento %	Tiempo de evaluación (h)				
	48	72	96	120	144
Costa 10	3.3 b	30.3 b	50 b	67.6 b	76.6 b
Costa 5	2.6 b	27.3 b	33.3 b	48.6 b	61.3 b
Costa 2.5	0.3 b	2.3 b	16.3 b	26 b	38.3b
Mixteca 10	20.6 a	58 a	86.6 a	90.6 a	95.3 a
Mixteca 5	8.3 b	27.3 b	43.3 b	60 b	77.6 b
Mixteca 2.5	4.3 b	17.3 b	25.6 b	37.6 b	48.6b
Valles Centrales 10	9.6 b	63.3 a	72.3 a	77 a	83.6 a
Valles Centrales 5	5.6 b	22.6 b	41 b	54 b	66 b
Valles Centrales 2.5	0.3 b	7.6 b	19 b	30 b	45.3 b
Agua destilada	1 b	6.6 b	16 b	30.3 b	37.6 b
Alto 100 sl	15 a	33.6 a	79.6 a	86.3 a	96 a

Letras distintas indican diferencia significativa entre tratamientos para la prueba de tukey ($P \leq 0.05$).

Se determinó que entre el fungicida Alto 100 sl y el propóleos Mixteca10 no existe una diferencia estadística entre ellos, lo que significa que Mixteca10 inhibe a la uredospora *in vivo* de manera tan eficiente como el fungicida Alto 100 sl. Lo anterior fue previamente observado por Papp et al. (2021), Silva-Castro et al. (2018) y Rodríguez-Pérez et al. (2020), quienes observaron una alta eficiencia antifúngica de los propóleos que ellos evaluaron,

aunque solo Silva-Castro y colaboradores evaluaron a *H. vastatrix* y los otros trabajos evaluaron la actividad antifúngica en otros hongos y bacterias

VIII. CONCLUSIONES

1. Los mejores rendimientos de los propóleos evaluados, se encontraron en la zona de la Mixteca con un total de 73.71 g/colmena, con diferencias de más del 51.32% respecto a la zona de los Valles y de un 67.0% respecto a la zona de la Costa de Oaxaca.
2. Dos tratamientos a las 48 h respondieron en dañar a la uredospora, el tratamiento Mixteca 10 presentó una efectividad del 12.6 % y el tratamiento Valles Centrales 10 a presentó un 8.2%.
3. En la inhibición de la uredospora *in vitro*, solo el tratamiento Mixteca 10 inhibe en un 98.2 % de la germinación de la uredospora.
4. En la inhibición a la uredospora *in vivo* en hojas de café, el tratamiento Mixteca 10 tuvo una eficiencia del 95 % otro tratamiento a resaltar Valles Centrales 10 logró una inhibición del 85 %.

VIII. RECOMENDACIONES

1. Evaluar propóleos de otras regiones (Istmo, Cañada, Papaloapam, Sierra Sur, Sierra Norte, del estado de Oaxaca), ya que de acuerdo al origen de los propóleos fueron los porcentajes de control del *H. vastatrix*
2. Estudiar la vegetación cercana a las colmenas y determinar sus compuestos químicos para determinar que plantas son la fuente de recursos para la elaboración de los propóleos por las abejas.
3. Probar concentraciones de propóleos mayores al 10 % ya que son las que eliminaron al hongo *H. vastatrix* en laboratorio.
4. Se propone a los propóleos como agente fungicida contra *H. vastatrix*, al propóleos proveniente de la Mixteca y los propóleos de los Valles Centrales

IX. LITERATURA CITADA

- Alvarado-Castillo, G., Benítez-Badillo, G., Lozada-García, J. A., Ortiz-Ceballos, G. C., & TORRES- PELAYO, V. R. (2017). Uredospores' mycelium germination inhibition of coffee rust (*Hemileia Vastatrix*) through three alternative compounds: First study. *Wulfenia Journal*, 24(2), 65-78.
- Antonio, M. A. M., Martínez, G. M. S., López, A. V., Ortiz, G. R., Trejo, S. L., & 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. <https://doi.org/10.7764/ijanr.v48i2.2272>
- Asociación Mexicana de Cafés y Cafeterías de Especialidad A.C. (2016, diciembre 5). *La historia del café en México*. Asociación Mexicana de Cafés y Cafeterías de Especialidad A.C. <http://www.amcce.org.mx/letras-de-cafe/post/la-historia-del-cafe-en-mexico>
- Avelino, J., Cristancho, M., Georgiou, S., Imbach, P., Aguilar, L., Bornemann, G., ... & Morales, C. (2015). The coffee rust crises in Colombia and Central America (2008–2013): impacts, plausible causes and proposed solutions. *Food Security*, 7(2), 303-321. <https://doi.org/10.1007/s12571-015-0446-9>
- Avelino, J., & Rivas, G. (2013). *La roya anaranjada del cafeto* (<https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-01071036>). 48.
- Bankova, V. (2009). Chemical diversity of propolis makes it a valuable source of new biologically active compounds. *Journal of ApiProduct and ApiMedical Science*, 1(2), 23-28. <https://doi.org/10.3896/IBRA.4.01.2.0>

- Barrera, J. F., Parra, M., Herrera, O. B., Jarquín, R., & Pohlan, J. (2004). *Plan Estatal de Manejo Agroecológico del Café en Chiapas: Guía hacia una Cafeticultura Sustentable*. Comisión para el Desarrollo y Fomento del Café de Chiapas y El Colegio de la Frontera Sur. Tapachula, Chiapas, México. 164 p.
- Bucio, C. M., Navarro, F. A., Martínez, O. A., Torres, J. J., & García, E. (2016). Producción de Propóleo en Campo, Recolectado por Abejas Productoras de Miel (*Apis mellifera*). *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 1(1), 515-520.
- Bucio-Villalobos, C. M., & Martínez-Jaime, O. A. (2017). Actividad antibacteriana de un extracto acuoso de propóleo del municipio de Irapuato, Guanajuato, México. *Agronomía Mesoamericana*, 28(1), 223-227.
- Boudrot, A., Pico, J., Merle, I., Granados, E., Vilchez, S., Tixier, P., ... & Avelino, J. (2016). Shade effects on the dispersal of airborne *Hemileia vastatrix* uredospores. *Phytopathology*, 106(6), 572-580. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-02-15-0058-R>
- Calderón Rueda Ximena Soledad 2016. Identificación molecular de morfotipos *Hemileia vastractix* causantes de la roya del café en la provincia de Loja Peru. Trabajo de titulación para obtener el grado de biólogo de la Universidad de Técnica particular de Loja Ecuador 38 p
- Campero Lazarte Juan Paolo 2017. producción de la miel y propoleo de abeja para su comercialización del propomiel en los municipios de chulumani-coripata. Trabajo de Grado para Optar el Título de Licenciatura en Administración de Empresas y Organizaciones Públicas. Chulumani – Bolivia 2017
- Capucho, A. S., Zambolim, E. M., Freitas, R. L., Haddad, F., Caixeta, E. T., & Zambolim, L. (2012). Identification of race XXXIII of *Hemileia vastatrix* on *Coffea arabica*

- Catimor derivatives in Brazil. *Australasian Plant Disease Notes*, 7(1), 189-191.
<https://doi.org/10.1007/s13314-012-0081-7>
- Carvalho, C. R., Fernandes, R. C., Carvalho, G. M. A., Barreto, R. W., & Evans, H. C. (2011). Cryptosexuality and the Genetic Diversity Paradox in Coffee Rust, *Hemileia vastatrix*. *PLoS ONE*, 6(11), 1-7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026387>
- Cerna-Chávez, E., Magaña-Arteaga, R., Velázquez-Guerrero, J. J., Ochoa-Fuentes, Y. M., Cepeda-Siller, M., & Hernández-Bautista, O. (2019). Evaluación de extractos vegetales sobre incidencia y severidad de *Hemileia vastatrix* en cultivo de café. *Ecosistemas y recursos agropecuarios*, 6(18), 557-563.
<https://doi.org/10.19136/era.a6n18.2182>
- Cinthia Sheila Quispe-Apaza, Roberto Carlos Mansilla-Samaniego, César Fernando López-Bonilla, Rosa Espejo-Joya, Juan Villanueva-Caceda, Criss Monzón 2017. Diversidad genética de *Hemileia vastatrix* de dos zonas productoras de café en el Perú. *Rev. mex. fitopatol* vol.35 no.3 Texcoco sep. 2017
- Cressey, D. (2013). Coffee rust regains foothold. *Nature News*, 493(7434), 587.
<https://doi.org/10.1038/493587a>
- Curifuta, M., Pardenilla, J. V., Sanchez, J., Contreras, A., Salazar, L. A., & Alvear, M. (2012). The in vitro antifungal evaluation of a commercial extract of Chilean propolis against six fungi of agricultural importance. *Ciencia e investigación agraria: revista latinoamericana de ciencias de la agricultura*, 39(2), 347-359.
- DE LA CRUZ, F. O. (2017). Estudio de la diversidad genética de la roya (*hemileia vastatrix* berk. y br.) del café (*coffea arabica*) en la Concordia, Chiapas.
<http://www.repositorio.unach.mx/jspui/handle/123456789/3139>

- Delgado Aceves, M. D. L., Andrade Ortega, J. Á., & Ramírez Barragán, C. A. (2015). Caracterización fisicoquímica de propóleos colectados en el Bosque La Primavera Zapopan, Jalisco. *Revista mexicana de ciencias forestales*, 6(28), 74-87. <https://doi.org/10.29298/rmcf.v6i28.270>
- Ecem Bayram, N., & Gercek, Y. C. (2019). Appropriate maceration duration for the extraction of propolis. *Fresenius Environmental Bulletin*, 28(1), 188-192.
- Fajardo-Franco, M. L., Aguilar-Tlatelpa, M., & Guzmán-Plazola, R. A. (2020). Biofungicides evaluation in two coffee cultivars for *Hemileia vastatrix* control. *Revista mexicana de fitopatología*, 38(2), 293-306. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2001-1>
- Flores, F. (2014) La producción de café en México: ventana de oportunidad para el sector agrícola de Chiapas. *Espacio I+D Innovación más Desarrollo*, 4 (7), 174-194. doi: 10.31644/IMASD.7.2015.a07
- Freitas, A. S., Cunha, A., Cardoso, S. M., Oliveira, R., & Almeida-Aguiar, C. (2019). Constancy of the bioactivities of propolis samples collected on the same apiary over four years. *Food Research International*, 119, 622-633. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.10.040>
- García-Nevárez, G., & Hidalgo-Jaminson, E. (2019). Efficacy of indigenous and commercial *Simplicillium* and *Lecanicillium* strains for controlling *Hemileia vastatrix*. *Revista mexicana de fitopatología*, 37(2), 237-250.
- Galindo, N. J. P., Suárez, G. A. P., & Guerrero, S. R. C. (2016). Análisis proximal y fisicoquímico de propóleos (propolis) provenientes de apiarios boyacenses. *BISTUA REVISTA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS BASICAS*, 14(2), 126-140. <https://doi.org/10.24054/01204211.v2.n2.2016.2189>

- García, L. R. P., Galán, J. P. M., Pajón, C. M. G., González, J. H. G., & Restrepo, D. L. D. (2010). Caracterización fisicoquímica y actividad antimicrobiana del propóleo en el Municipio de La Unión (Antioquia, Colombia). *Revista Facultad Nacional de Agronomía-Medellín*, 63(1), 5373-5383.
- García-Domínguez, J. U., Villegas, Y., Duran-Medina, E., Carrillo-Rodríguez, J. C., Sangerman-Jarquín, D. M., & Castañeda-Hidalgo, E. (2021). Descripción y análisis de productores de café de la región Mixe, Oaxaca. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 12(7), 1235-1247. <https://doi.org/10.29312/remexca.v12i7.2781>
- Ghini, R., Hamada, E., Pedro Júnior, M. J., & Gonçalves, R. R. D. V. (2011). Incubation period of *Hemileia vastatrix* in coffee plants in Brazil simulated under climate change. *Summa Phytopathologica*, 37, 85-93. <https://doi.org/10.1590/S0100-54052011000200001>
- González, H. A. G., & Santana, J. R. H. (2016). Zonificación agroecológica del *Coffea arabica* en el municipio Atoyac de Álvarez, Guerrero, México. *Investigaciones Geográficas, Boletín del Instituto de Geografía*, 2016(90), 105-118. <https://doi.org/10.14350/rig.49329>
- Graikini, D., Papachristoforou, A., & Mourtzinis, I. (2019). Comparison of qualitative characteristics of propolis extracts using different purification methods. *Journal of Apicultural Research*, 58(5), 792-799. <https://doi.org/10.1080/00218839.2019.1653813>
- Grosso, G. S. (2017). *Origen, naturaleza, propiedades fisicoquímicas y valor terapéutico del propóleo*. Sello Editorial Universidad del Tolima.
- Hernández-Martínez, G., & Velázquez-Premio, T. (2016). Análisis integral sobre la roya del café y su control. *RINDERESU*, 1(1), 92-99.

- Hernández Sánchez, M. I., & Nava Tablada, M. E. (2016). *Cafeticultura y uso sustentable de los recursos naturales: El caso del Sitio Ramsar «Cascadas de Texolo y Su Entorno» en Veracruz, México* (Primera edición). El Colegio de Veracruz ; Juan Pablos Editor.
- INEGI. (2005). *México en cifras*. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. INEGI. <https://www.inegi.org.mx/app/areasgeograficas/>
- International Coffee Organization. (2019). Brote de la Roya del Café. http://www.ico.org/show_news.asp?id=238
- International Coffee Organization—Aspectos botánicos. (s. f.). Recuperado 25 de diciembre de 2021, de https://www.ico.org/es/botanical_c.asp
- Katekhaye, S., Fearnley, H., Fearnley, J., & Paradkar, A. (2019). Gaps in propolis research: challenges posed to commercialization and the need for an holistic approach. *Journal of Apicultural Research*, 58(4), 604-616. <https://doi.org/10.1080/00218839.2019.1614273>
- Koutouleas, A., Jørgen Lyngs Jørgensen, H., Jensen, B., Lillesø, J. P. B., Junge, A., & Ræbild, A. (2019). On the hunt for the alternate host of *Hemileia vastatrix*. *Ecology and evolution*, 9(23), 13619-13631. <https://doi.org/10.1002/ece3.5755>
- Letullier, C., Manduchet, A., Dlalah, N., Hugou, M., Georgé, S., Sforcin, J. M., & Cardinault, N. (2020). Comparison of the antibacterial efficiency of propolis samples from different botanical and geographic origins with and without standardization. *Journal of Apicultural Research*, 59(1), 19-24. <https://doi.org/10.1080/00218839.2019.1681117>

- Lorrain, C., Gonçalves dos Santos, K. C., Germain, H., Hecker, A., & Duplessis, S. (2019). Advances in understanding obligate biotrophy in rust fungi. *New Phytologist*, 222(3), 1190-1206. <https://doi.org/10.1111/nph.15641>
- Manrique J. Antonio 2006. Actividad antimicrobiana de propóleos provenientes de dos zonas climáticas del estado Miranda, Venezuela. Efecto de la variación estacional Revista Zotecnia Vegatal Volumen 24 Numero 1 2006
- Martínez, C. P., Echeverri, C., Florez, J. C., Gaitan, A. L., & Góngora, C. E. (2012). In vitro production of two chitinolytic proteins with an inhibiting effect on the insect coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Ferrari)(Coleoptera: Curculionidae) and the fungus *Hemileia vastatrix* the most limiting pests of coffee crops. *AMB express*, 2(1), 1-11. <https://doi.org/10.1186/2191-0855-2-22>
- McCook, S., & Vandermeer, J. (2015). The big rust and the red queen: long-term perspectives on coffee rust research. *Phytopathology*, 105(9), 1164-1173. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-04-15-0085-RVW>
- Mora-Aguilera, G., Acevedo-Sánchez, G., Guzmán-Hernández, E., Flores-Colorado, O. E., Coria-Contreras, J. J., Mendoza-Ramos, C., ... & Javier-López, M. Á. (2021). Web-based epidemiological surveillance systems and applications to coffee rust disease. *Revista mexicana de fitopatología*, 39(3), 452-492. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2104-6>
- Morales Becerra, I. (2013). Living around coffee: social marginalization of small producers in San Pedro Cafetitlan, Oaxaca, Mexico. *Diálogos Revista Electrónica de Historia*, 14(1), 79-96.
- Palomino García, L. R., Martínez Galán, J. P., García Pajón, C. M., Gil González, J. H., & Durango Restrepo, D. L. (2010). Caracterización fisicoquímica y actividad

- antimicrobiana del propóleos en el Municipio de La Unión (Antioquia, Colombia). *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 63(1), 5373-5383.
- Papp, Z., Bouchelaghem, S., Szekeres, A., Meszéna, R., Gyöngyi, Z., & Papp, G. (2021). The Scent of Antifungal Propolis. *Sensors*, 21(7), 2334.
- Parada-Molina, P. C., Cerdán, C. R., Ortiz Ceballos, G., Barradas Miranda, V. L., & Cervantes-Pérez, J. (2020). Hemileia vastatrix: una prospección ante el cambio climático. *Ecosistemas y recursos agropecuarios*, 7(3). <https://doi.org/doi.org/10.19136/era.a7n3.2507>
- Popova, M., Giannopoulou, E., Skalicka-Woźniak, K., Graikou, K., Widelski, J., Bankova, V., ... & Chinou, I. (2017). Characterization and biological evaluation of propolis from Poland. *Molecules*, 22(7), 1159.
- Popova, M., Dimitrova, R., Al-Lawati, H. T., Tsvetkova, I., Najdenski, H., & Bankova, V. (2013). Omani propolis: chemical profiling, antibacterial activity and new propolis plant sources. *Chemistry Central Journal*, 7(1), 1-8. <https://doi.org/10.1186/1752-153X-7-158>
- Rodríguez Pérez, B., Canales Martínez, M. M., Penieres Carrillo, J. G., & Cruz Sánchez, T. A. (2020). Composición química, propiedades antioxidantes y actividad antimicrobiana de propóleos mexicanos. *Acta universitaria*, 30. <https://doi.org/10.15174/au.2020.2435>
- Romero, J. V., Camayo, G. C., González, L. F., Cortina, H. A., & HERRERA, J. (2010). Caracterización citogenética y morfológica de híbridos interespecíficos entre *C arabica* y las especies diploides *C liberica* y *C eugenioide*. *CENICAFÉ*, 61(3), 206-221.
- SAGARPA. (2017). *Planeación Agrícola Nacional 2017-2030*.

- Salamanca Grosso, G. (2017). Origen, naturaleza, propiedades fisicoquímicas y valor terapéutico del propóleo.
- Santiago-Elena, E., Zamora-Macorra, E. J., Zamora-Macorra, M., & Elizalde-Gaytan, K. G. (2020). Interaction between Mycodiplosis and *Hemileia vastatrix* in three scenarios of coffee crop management (*Coffea arabica*). *Revista mexicana de fitopatología*, 38(3), 320-336. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2005-2>
- Silva Acuña, R., Zambolim, L., & Pérez Nieto, E. (1997). Identificación de razas fisiológicas de la roya del cafeto en el estado Táchira, Venezuela. *BioAgro*, 9, 95-98.
- Silva-Castro, I., Martín-García, J., Díez, J. J., Flores-Pacheco, J. A., Martín-Gil, J., & Martín-Ramos, P. (2018). Potential control of forest diseases by solutions of chitosan oligomers, propolis and nanosilver. *European journal of plant pathology*, 150(2), 401-411.
- SENASICA. (2018a). *Doceavo informe mensual, Programa Fitosanitario contra la Roya del Cafeto* (MENSUAL N.º 12; p. 6).
- SENASICA. (2018b). *Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. Protocolo de Diagnóstico: Hemileia vastatrix (roya del cafeto) [Versión 1.0]* Tecamac, México.
- SENASICA. Laboratorio de Micología. (2018). *Protocolo de diagnóstico Hemileia vastatrix*.
- Setiawati, R., Widiastuti, A., Wibowo, A., & Priyatmojo, A. (2021). Variability of *Lecanicillium spp.* mycoparasite of coffee leaf rust pathogen (*Hemileia vastatrix*) in Indonesia. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 24 (5): 588-598.
- SIAP. (2018). *Café cereza cierra su ciclo productivo 2018**. <http://www.gob.mx/siap/articulos/cafe-cereza-cierra-su-ciclo-productivo-2018?idiom=es>

- SIAP. (2019). Anuario Estadístico de la Producción Agrícola.
<https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>
- Silva, J. L., Souza, P. E., Monteiro, F. P., Freitas, M. L. O., Júnior, S., & Belan, L. L. (2014). Antifungal activity using medicinal plant extracts against pathogens of coffee tree. *Revista brasileira de plantas medicinais*, 16, 539-544.
https://doi.org/10.1590/1983-084X/12_155
- Sosa-López, Á. A., Cabrera, M. G., & Álvarez, M. Y. (2016). Vegetación de origen como parámetro de caracterización microbiana de los propóleos. *Journal of the Selva Andina Biosphere*, 4(1), 3-23.
- Statistical Analysis System. SAS User's Guide: Statistics (Version 8.0 Ed.) SAS Inst. Inc, Cary, NC 2002.
- Stock, H. K. (1997). Techniques in insect nematology. En L. Lacey, *Manual of techniques in insect pathhology* (págs. 281-344).
- Sun, J., Mu, Y., Shi, J., Zhao, Y., & Xu, B. (2020). Super/subcritical fluid extraction combined with ultrasound-assisted ethanol extraction in propolis development. *Journal of Apicultural Research*, 1-9.
<https://doi.org/10.1080/00218839.2020.1772529>
- Talhinhas, P., Batista, D., Diniz, I., Vieira, A., Silva, D. N., Loureiro, A., ... & Silva, M. D. C. (2017). The coffee leaf rust pathogen *Hemileia vastatrix*: one and a half centuries around the tropics. *Molecular plant pathology*, 18(8), 1039-1051.
<https://doi.org/10.1111/mpp.12512>
- Trusheva, B., Petkov, H., Popova, M., Dimitrova, L., Zaharieva, M., Tsvetkova, I., ... & Bankova, V. (2019). " Green" approach to propolis extraction: natural deep eutectic

solvents. *Comptes Rendus de l'Academie Bulgare des Sciences*, 72(7), 897-905.

<https://doi.org/10.7546/CRABS.2019.07.06>

Valencia, D., Alday, E., Robles-Zepeda, R., Garibay-Escobar, A., Galvez-Ruiz, J. C., Salas-

Reyes, M., ... & Velazquez, C. (2012). Seasonal effect on chemical composition and

biological activities of Sonoran propolis. *Food chemistry*, 131(2), 645-651.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.08.086>

Vichi, F. F. (2015). La producción de café en México: ventana de oportunidad para el sector

agrícola de Chiapas. *Espacio I+ D: Innovación más Desarrollo*, 4(7).

<https://doi.org/10.31644/IMASD.7.2015.a07>.