

Evaluación de Extractos de Plantas Nativas Yucatecas Contra *Alternaria chrysanthemi* y Espectro de Actividad Antifúngica de *Acalypha gaumeri*

Evaluation of Native Yucatecan Plant Extracts Against *Alternaria chrysanthemi* and Antifungal Activity Spectrum of *Acalypha gaumeri*

Arely A. Vargas Díaz, Marcela Gamboa Angulo, Irma L. Medina Baizabal, Daisy Pérez Brito, Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. Calle 43 No. 130, Chuburná, Mérida, Yucatán, CP 97200, México; **Jairo Cristóbal Alejo, Esaú Ruiz Sánchez,** Departamento de Posgrado, Instituto Tecnológico de Conkal, Conkal, Yucatán, CP 97345, México. Correspondencia: mmarcela@cicy.mx

(Recibido: Mayo 19, 2014 Aceptado: Agosto 14, 2014)

Vargas Díaz AA, Gamboa Angulo M, Medina Baizabal IL, Pérez Brito D, Crsitóbal Alejo J y Ruiz Sánchez E. 2014. Evaluación de extractos de plantas nativas yucatecas contra *Alternaria chrysanthemi* y espectro de actividad antifúngica de *Acalypha gaumeri*. Revista Mexicana de Fitopatología 32: 1-11.

Resumen. Un total de 24 extractos (acuosos y etanólicos) de nueve especies de plantas se evaluaron contra *Alternaria chrysanthemi*, el agente causal del tizón foliar en crisantemo. La mayor actividad antifúngica se detectó con los extractos etanólico y acuoso de la raíz de *Acalypha gaumeri* (inhibición del crecimiento, IC=75 y 69%, respectivamente), y los acuosos del tallo y hoja de *Bonellia flammae* (IC= 63 y 50%, respectivamente). Estos extractos activos subsecuentemente se evaluaron en el bioensayo de dilución en agar, donde el extracto etanólico (EE) de la raíz de *A. gaumeri* causó una alta inhibición del crecimiento micelial y esporulación, con una Concentración Inhibitoria media (CI₅₀) de 0.53 mg/mL contra la IC de *A. chrysanthemi*. Este extracto se particionó y la mayor actividad se observó en la fracción de mediana polaridad (ACR-1E) con una CI₅₀=0.13 mg/mL. Esta fracción completamente inhibe la infección causada por *A. chrysanthemi* en las hojas de crisantemo a una concentración de 85 µg/cm². También el EE de *A. gaumeri* inhibe el crecimiento de las cepas fúngicas *Alternaria* sp. (ITC02), *Colletotrichum capsici*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Corynespora cassiicola*, *Curvularia* sp. (ITC10), y *Helminthosporium* sp. (ITC04). El EE de la raíz de *A. gaumeri* puede ser un fungicida botánico potencial para el control de fitopatógenos.

Palabras clave adicionales: *Acalypha gaumeri*, *Alternaria chrysanthemi*, ensayos antifúngicos, ensayo en microdilución, fungicidas naturales, extractos de plantas.

Abstract. A total of 24 extracts (aqueous and ethanolic) from nine plant species were evaluated against *Alternaria chrysanthemi*, the causal agent of leaf spot of chrysanthemum. The highest antifungal activity was shown by ethanolic and aqueous extracts of *Acalypha gaumeri* root (Growth inhibition, GI = 75 and 69%, respectively), and by the aqueous extracts of *Bonellia flammae* stem and leaf (GI = 63 and 50%, respectively). These active extracts were subsequently assessed by agar dilution assay, where ethanolic extract (EE) of *A. gaumeri* root caused the highest inhibition of mycelial growth and sporulation, with a median Inhibitory Concentration (IC₅₀) of 0.53 mg/mL against *A. chrysanthemi* GI. This extract was partitioned and the highest activity was observed in the medium polarity fraction (ACR-1E), where an IC₅₀ of 0.13 mg/mL was recorded. This fraction completely inhibited *A. chrysanthemi* infection in chrysanthemum leaf, at concentrations of 85 µg/cm². Also, *A. gaumeri* extract was able to inhibit the fungal strains *Alternaria* sp. (ITC02), *Colletotrichum capsici*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Corynespora cassiicola*, *Curvularia* sp. (ITC10), and *Helminthosporium* sp. (ITC04). The EE of *A. gaumeri* root may be a potential source of botanical fungicide to control phytopathogens.

Additional keywords. *Acalypha gaumeri*, *Alternaria chrysanthemi*, antifungal assays, microdilution assay, natural fungicides, plant extracts.

Alternaria chrysanthemi is recognized as the causal agent of *Alternaria* leaf spot, a very important disease of chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum* (Ramat)). This plant is a valuable ornamental species that is used all over the world as a source of cut, garden and pot flowers (Anderson, 2007; Deng *et al.*, 2012). *Alternaria*

El hongo *Alternaria chrysanthemi* es reconocido como el agente causal del tizón foliar por *Alternaria*, la cual es una enfermedad muy importante del crisantemo (*Dendranthema grandiflorum* (Ramat)). Esta planta es una especie ornamental valiosa que se utiliza en todo el mundo como flor de corte, en jardín y macetas (Anderson, 2007; Deng *et al.*, 2012). *Alternaria chrysanthemi* se presenta principalmente en condiciones de altas temperaturas y lluvias continuas; los síntomas de la enfermedad aparecen en el follaje afectando la calidad y vida útil de las flores (Deng *et al.*, 2012; Xu *et al.*, 2010). La principal estrategia de control para *A. chrysanthemi* es el uso de fungicidas sintéticos o semisintéticos, tales como la azoxistrobina, benomilo, captan, carbendazim, clorotalonil y folpet (Villanueva-Couoh *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2010), con sus conocidos impactos negativos sobre la salud humana y el medio ambiente. En este sentido, los productos naturales derivados de plantas actualmente están siendo evaluados como nuevas alternativas ecológicas para el manejo de los hongos patógenos de plantas (Dayan *et al.*, 2009).

En la última década, los estudios sobre productos botánicos para el control de hongos fitopatógenos se han incrementado notablemente (Dellavalle *et al.*, 2011; Gahukar 2012; Talibi *et al.*, 2012). Un gran número de familias de plantas han sido ampliamente estudiados por sus propiedades antifúngicas, tales como Acanthaceae, Amaryllidaceae, Apocynaceae, Asteraceae, Euphorbiaceae, Lamiaceae y Meliaceae (Gahukar 2012; Ravikumar y Garampalli 2013; Zaker, 2013). Los extractos de diversas plantas han sido evaluados *in vitro* en el género *Alternaria*; en particular, los extractos alcohólicos y acuosos se han probado en *Alternaria alternata* (Carvalho *et al.*, 2011), *Alternaria solani* (Yanar *et al.*, 2011; Ravikumar y Garampalli, 2013), y *Alternaria sesami* (Zaker, 2013), donde los extractos de varias especies de plantas se han encontrado prometedores. Además, para el tratamiento de las especies de *Alternaria*, algunos productos botánicos ya están disponibles en el mercado, tales como extractos de *Reynoutria sachalinensis* (Regalia™) y extractos acuosos de *Macleaya cordata* (Qwel®), los cuales contienen una mezcla de cloruro de sanguinarina y cloruro de queleritrina y se han utilizado con éxito en el campo (Copping y Duke, 2007; Newman and Roll, 1999).

La bio-prospección de productos naturales para el manejo hongos fitopatógenos de importancia económica, llevadas a cabo por nuestro grupo de investigación ha dado lugar a la evaluación de plantas nativas de la Península de Yucatán como fuente de nuevos biopesticidas. En un trabajo anterior, encontramos nueve especies de plantas (*Acalypha gaumeri*, *Ambrosia hispida*, *Bonellia flammea*, *Calea urticifolia*, *Croton chichenensis*, *Furcraea cahum*, *Randia obcordata*, *Trichilia minutiflora* y *Vitex gaumeri*) con potencial para inhibir el crecimiento *in vitro* de *Alternaria tagetica* (Gamboa-Angulo *et al.*, 2008). El objetivo del presente trabajo fue la evaluación *in vitro* de 24 extractos de plantas yucatecas nativas contra *A. chrysanthemi*, con la finalidad de encontrar alternativas ecológicas para el control del tizón foliar causado por *Alternaria* en el crisantemo, y además explorar el espectro de actividad antifúngica del

chrysanthemi occurs mainly at high temperatures in continuous rainy season conditions, and disease symptoms appear in the foliage, affecting the quality and shelf life of the flowers (Deng *et al.*, 2012; Xu *et al.*, 2010). The main control strategy for *A. chrysanthemi* is the use of synthetic or semisynthetic fungicides, such as the azoxystrobin, benomyl, captan, carbendazim, chlorothalonil and folpet (Villanueva-Couoh *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2010), with their well-known negative impact on human health and the environment. In this sense, natural products derived from plants are currently being screened as new eco-friendly alternatives to manage plant pathogenic fungi (Dayan *et al.*, 2009).

In the last decade, studies on botanical products to control phytopathogenic fungi have notably increased (Dellavalle *et al.*, 2011; Gahukar 2012; Talibi *et al.*, 2012). A number of plant families have been extensively studied for their antifungal properties such as Acanthaceae, Amaryllidaceae, Apocynaceae, Asteraceae, Euphorbiaceae, Lamiaceae and Meliaceae (Gahukar 2012; Ravikumar and Garampalli 2013; Zaker, 2013). Extracts of diverse plants have been screened *in vitro* on *Alternaria* genus; in particular, aqueous and alcoholic extracts have been tested on *Alternaria alternata* (Carvalho *et al.*, 2011), *Alternaria solani* (Yanar *et al.*, 2011; Ravikumar and Garampalli, 2013), and *Alternaria sesami* (Zaker, 2013), where extracts of various plant species have been found promising. Moreover, for the management of *Alternaria* species, a few botanical products are already available on the market, such as extracts of *Reynoutria sachalinensis* (Regalia™) and aqueous extracts of *Macleaya cordata* (Qwel®), which contain a mixture of sanguinarine chloride and chelerythrine chloride and have been successfully used in the field (Copping and Duke, 2007; Newman and Roll, 1999).

The bioprospection for natural products to manage economically important phytopathogenic fungi carried out by our research group has led to the screening of native plants of the Yucatan Peninsula as a source of new biopesticides. In a previous work, we found nine plant species (*Acalypha gaumeri*, *Ambrosia hispida*, *Bonellia flammea*, *Calea urticifolia*, *Croton chichenensis*, *Furcraea cahum*, *Randia obcordata*, *Trichilia minutiflora* and *Vitex gaumeri*) with the potential to inhibit *in vitro* growth of *Alternaria tagetica* (Gamboa-Angulo *et al.*, 2008). The goal of the present research was to evaluate *in vitro* 24 extracts from native yucatecan plants against *A. chrysanthemi*, in order to find ecological alternatives in the control of *Alternaria* leaf spot in chrysanthemum, and furthermore to explore the antifungal activity spectrum of the most active plant extract with other fungal strains.

MATERIALS AND METHODS

Preparation of extracts. All plant material was collected from various locations in the Yucatan peninsula, Mexico; plants were dried under artificial light (50-60 °C, 3 days). A sample of each species was kept in the herbarium of the Natural Resources Unit of the Scientific Research Center of Yucatan (Table 1).

Ethanollic extracts (EE): Dried plant material (40 g)

extracto vegetal más activo con otras cepas de hongos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de los extractos. Todo el material vegetal se obtuvo de varias localidades de la península de Yucatán, México; las plantas se secaron bajo luz artificial (50-60 °C, 3 d). Una muestra de cada especie se mantuvo en el herbario de la Unidad de Recursos Naturales del Centro de Investigación Científica de Yucatán (Cuadro 1).

Extractos etanólicos (EE): El material vegetal seco (40 g) se maceró con etanol (600 mL) tres veces a temperatura ambiente durante 24 h cada uno. Para obtener los extractos crudos orgánicos se filtró el disolvente, se concentró a vacío y se eliminó en un rotavapor a 40 °C (Cristobal-Alejo *et al.*, 2006).

Extractos acuosos de las plantas (EA): El material vegetal seco (12 g) se extrajo en agua hirviendo (70 mL) durante 20 min. El extracto resultante se filtró (papel de filtro Whatman No. 1) y se diluyó para obtener el extracto acuoso (12% p/v). Los extractos se esterilizaron a través de un filtro Millipore de 0.45 µm antes de su uso en los bioensayos.

Partición del extracto etanólico. El extracto etanólico (482 mg) de la raíz de *A. gaumeri* se resuspendió en agua-metanol (2:1) y se particionó con disolventes en polaridad ascendente (hexano y acetato de etilo, 3 ×, 2:1, 1:1, 1:1 cada uno). Los disolventes se eliminaron a presión reducida para obtener fracciones de polaridad baja (ACR-1A, 21%), media (ACR-1B, 5%) y alta (ACR-1C, residuo acuoso). Adicionalmente, se evaluaron dos precipitados (ACR-1D, el 14%; ACR-1E, 0.7%).

El extracto activo y las fracciones ACR-1E de la raíz de *A. gaumeri* se analizaron por cromatografía de capa fina (TLC) sobre placas de gel de sílice 60F, se detectaron con luz UV y se rociaron con ácido fosfomolibdico como agente revelador, seguido de calentamiento.

Cepas fúngicas. Los hongos fueron aislados de plantas del campo utilizando como medio de crecimiento papa dextrosa agar (PDA). La identificación de los hongos fue realizada por sus características morfológicas utilizando claves taxonómicas (Barnett y Hunter, 1972). Los hongos y sus hospederos fueron los siguientes: *Alternaria chrysanthemi* E. G. Simmons & Crosier (CICY004) de *Dendranthema grandiflorum* Ramat; *Alternaria* sp. (ITC02) de *Heliconia* sp.; *Colletotrichum capsici* (CC2) y *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. & Sacc. (CG4) de *Carica papaya* L.; *Corynespora cassiicola* Berk. & M. A. Curtis (ITC03) de *Capsicum annum* L.; *Curvularia* sp. (ITC10) de *Zea mays* L. y *Helminthosporium* sp. (ITC04) de *Veitchia merrillii* Becc. Todos los hongos se mantuvieron en tubos inclinados con PDA dentro de aceite mineral a 4 °C. Antes de su uso, los hongos se cultivaron en cajas de Petri con PDA a 25 ± 2 °C con luz natural durante 5-7 d.

Inhibición del crecimiento (IC) de *Alternaria chrysanthemi* mediante el ensayo de microdilución en caldo. *Alternaria chrysanthemi* fue cultivada en PDA e incubada a 18-20 °C en oscuridad total para inducir la esporulación. Después de seis días se añadió una solución salina estéril (5 mL) sobre la superficie del micelio y se

was macerated with ethanol (600 mL) three times at room temperature for 24 h each. To obtain organic crude extracts, the solvent was filtered, vacuum-concentrated and eliminated in a rotary evaporator at 40 °C (Cristobal-Alejo *et al.*, 2006).

Aqueous plant extracts (AE): Dried plant material (12 g) was extracted in boiling water (70 mL) for 20 min. The resulting extract was filtered (Whatman filter paper No. 1) and diluted to obtain the aqueous extract (12% w/v). Extracts were sterilized by filtration in a Millipore filter of 0.45 µm before use in the bioassays.

Partition of ethanolic extract. Ethanolic extract (482 mg) of *A. gaumeri* root was re-suspended in water-methanol (2:1) and partitioned by solvents of increased polarity (hexane and ethyl acetate, 3×, 2:1, 1:1, 1:1, each). Solvents were eliminated under reduced pressure to obtain fractions of low (ACR-1A, 21%), medium (ACR-1B, 5%) and high polarity (ACR-1C, aqueous residue). In addition, two precipitates (ACR-1D, 14%; ACR-1E, 0.7%) were also tested.

The active extract and fractions ACR-1E of *A. gaumeri* root were analyzed by thin layer chromatography (TLC) on silica gel 60F plates, detection under UV light and by spraying phosphomolybdic acid as revealing agent, followed by heating.

Fungal strains. Fungi were isolated from field plants using potato dextrose agar (PDA) as growth medium. Identification of fungi was carried out by their morphological characteristics using taxonomic keys (Barnett and Hunter, 1972). Fungi and hosts were as follows: *Alternaria chrysanthemi* E. G. Simmons & Crosier (CICY004) from *Dendranthema grandiflorum* Ramat; *Alternaria* sp. (ITC02) from *Heliconia* sp.; *Colletotrichum capsici* (CC2) and *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. & Sacc. (CG4) from *Carica papaya* L.; *Corynespora cassiicola* Berk. & M. A. Curtis (ITC03) from *Capsicum annum* L.; *Curvularia* sp. (ITC10) from *Zea mays* L. and *Helminthosporium* sp. (ITC04) from *Veitchia merrillii* Becc. All fungi were maintained in PDA in slant tubes under mineral oil and kept at 4 °C. Prior to use, fungi were cultured in Petri dishes containing PDA and maintained at 25 ± 2 °C with natural light for 5-7 d.

Growth inhibition of *Alternaria chrysanthemi* by broth microdilution assay. *Alternaria chrysanthemi* was cultured in PDA and incubated at 18-20 °C in complete darkness to induce sporulation. After six days a sterile saline solution (5 mL) was added over the mycelial surface and gently scraped with a sterile slide. The resulting spores/hyphal mixture was filtered through a double-layer sterilized cheesecloth. The spore suspension was adjusted to 5 × 10⁴ conidia/mL with the aid of a hemocytometer (Höller *et al.*, 1999).

Growth inhibition (GI) of *A. chrysanthemi* by the effect of extracts was determined by broth microdilution techniques as described by the National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 2004) with slight modifications. Briefly, all organic extracts and their fractions were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) to 40 µg/µL. They were subsequently mixed with synthetic

rasparon suavemente con un portaobjetos estéril. La mezcla de esporas / hifas resultante se filtró a través de una gasa de doble capa esterilizada. La suspensión de esporas se ajustó a 5×10^4 conidios/mL con la ayuda de un hemocitómetro (Höller *et al.*, 1999).

La inhibición del crecimiento (IC) de *A. chrysanthemi* por el efecto de los extractos se evaluó mediante técnica de microdilución en caldo según lo descrito por el Comité Nacional de Normas de Laboratorios Clínicos (NCCLS, 2004) con ligeras modificaciones. Todos los extractos orgánicos y sus fracciones se disolvieron en dimetil sulfoxido (DMSO) a $40 \mu\text{g}/\mu\text{L}$. Posteriormente se mezclaron con medio sintético Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI-1640) y $100 \mu\text{L}$ de las muestras se transfirieron a una placa de microtitulación de 96 pocillos. Para evaluar el extracto acuoso, este se mezcló directamente con el medio RPMI-1640 y luego se transfirió a la placa como se mencionó anteriormente para los extractos orgánicos. La suspensión de conidios de *A. chrysanthemi* ($100 \mu\text{L}$) se añadió a cada pocillo en la placa a la concentración final de esporas de 2.5×10^4 conidios/mL; concentración final de extractos orgánicos o fracciones a 1, 0.5 y 0.25 mg/mL; y extracto acuoso a 3, 1.5 y 0.75% p/v. La anfotericina B ($4 \mu\text{g}/\text{mL}$) se utilizó como control positivo y el RPMI-1640- 2.5% de DMSO como control negativo. Las pruebas se llevaron a cabo por triplicado. Las placas de microdilución se incubaron a $23 \pm 2^\circ \text{C}$ en la oscuridad durante 96 h y el crecimiento de las hifas (CH) se determinó visualmente con un microscopio ($50 \times$) siguiendo la norma NCCLS. Los datos se convirtieron a porcentajes y los resultados se reportaron como IC aplicando la fórmula de Abbott: $[(\% \text{ CH en el control} - \% \text{ CH en el tratamiento}) / \% \text{ CH en el control} \times 100]$ (Cuadro 1) (Abou-Jawdah *et al.*, 2002).

La concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración fungicida mínima (CMF) se determinó mediante el ensayo de microdilución. La CMI se registró como la concentración donde no se observó crecimiento del micelio en el pozo (valores de IC del 100%), mientras que la CMF se registró como la concentración de los extractos que no permitieron crecimiento del micelio después de que las esporas tratadas se inocularon en PDA libre del extracto e incubadas durante 48 h a $24 \pm 2^\circ \text{C}$. Adicionalmente, se calcularon las concentraciones inhibitorias (CI_{50} y CI_{90}) para las fracciones de *A. gaumeri* (Cuadro 3).

Inhibición del crecimiento micelial (ICM) por el ensayo de dilución en agar. Para evaluar la ICM, el EE de *A. gaumeri* se disolvió en DMSO ($20 \mu\text{g}/\mu\text{L}$) y se añadió directamente al medio de cultivo esterilizado (PDA) cuando se enfrió a aproximadamente 50°C , los extractos acuosos de *A. gaumeri* y *B. flammea* se añadieron directamente al medio. Los medios se mezclaron homogéneamente y se transfirieron a placas de Petri (6 cm). Las concentraciones finales del EE fueron 1.0, 0.5 y 0.25 mg/mL, mientras que para los extractos acuosos fueron 3.0, 1.5 y 0.75% p/v. Para el ensayo, se utilizó un sacabocados para preparar discos de micelio fúngico (5 mm de diámetro) tomados de la zona de cultivo con 5-7 d de crecimiento. Un disco se colocó en el centro de una placa de Petri después de la solidificación

medium Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI-1640) and samples of $100 \mu\text{L}$ were transferred to a 96-microwell plate. To assay the aqueous extract, this was directly mixed with the medium RPMI-1640 and then transferred to the plate as previously mentioned for organic extracts. Conidial suspension of *A. chrysanthemi* ($100 \mu\text{L}$) was then added to each microwell in the plate to a final spore concentration of 2.5×10^4 conidia/mL; final concentration of organic extracts or fractions of 1, 0.5 and 0.25 mg/mL; and aqueous extract of 3, 1.5 and 0.75% w/v. Amphotericin B ($4 \mu\text{g}/\text{mL}$) was used as positive control and RPMI-1640-2.5% DMSO as negative control. Tests were carried out in triplicate. The microdilution plates were incubated at $23 \pm 2^\circ \text{C}$ in the dark for 96 h and hyphal growth (HG) was determined visually with a microscope ($50 \times$) following NCCLS standard. Data were converted to percentages and results were reported as GI applying the Abbott's formula: $[(\% \text{ HG in control} - \% \text{ HG in treatment}) / \% \text{ HG in control} \times 100]$ (Table 1) (Abou-Jawdah *et al.*, 2002).

Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum fungicidal concentration (MFC) were also calculated by microdilution assay. MIC was recorded as the concentration where no mycelial growth was observed (GI values of 100%) in the well, while MFC was recorded as the concentration of extracts that caused no mycelial growth after inoculation on PDA of treated spores and incubation for 48 h at $24 \pm 2^\circ \text{C}$. Inhibitory concentrations (IC_{50} and IC_{90}) were also calculated to *A. gaumeri* fractions (Table 3).

Mycelial growth inhibition (MGI) by agar dilution assay. To evaluate MGI, EE of *A. gaumeri* was dissolved in DMSO ($20 \mu\text{g}/\mu\text{L}$) and added directly to the sterilized culture medium (PDA) when cooled down to approximately 50°C ; the aqueous extracts of *A. gaumeri* and *B. flammea* were added directly to the medium. Media were homogeneously mixed and transferred to Petri dishes (6 cm). The final concentrations for EE were 1.0, 0.5, and 0.25 mg/mL, while for the aqueous extracts; these were 3.0, 1.5, and 0.75% w/v. For the assay, a cork borer was used to prepare mycelial disks (5 mm diameter) taken from the growing area of 5-7 day old cultures of the fungi. One disk was placed at the center of a Petri dish after solidification of the PDA medium. Fungal colonies were also cultured in PDA medium with and without 5% DMSO for negative control and with Prochloraz 45 CE (0.2 mg/mL) for positive control. Fungal cultures were maintained in the dark for 5-7 days at $18 \pm 2^\circ \text{C}$ for *A. chrysanthemi* and at $25 \pm 2^\circ \text{C}$ for the rest of the phytopathogenic fungi. All assays were performed with four replicates. Evaluation of MGI was carried out as described by Saetae and Suntornsuk (2010) (Table 2). Inhibitory Concentrations (IC_{50} and IC_{90}) were also determined (Table 4).

Sporulation inhibition (SI) on *Alternaria chrysanthemi* by agar dilution assay. Saline solution (5 mL) was added to *A. chrysanthemi* colonies treated with extracts. Spores were obtained as described (*vide supra*) and spore concentration (conidia/mL) was counted in a hemocytometer. Results were reported as percentage of sporulation inhibition (SI) following the Abbott's formula (Table 2) (Höller *et al.*, 1999).

del medio PDA. Las colonias de hongos también se cultivaron en medio PDA con y sin 5% de DMSO para el control negativo y con procloraz 45 CE (0.2 mg / mL) para el control positivo. Los cultivos de hongos se mantuvieron en la oscuridad durante 5-7 d a $18 \pm 2^\circ\text{C}$ para *A. chrysanthemi* y a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ para el resto de los hongos fitopatógenos. Todos los ensayos se realizaron con cuatro repeticiones. La evaluación de la ICM se llevó a cabo como se describe en Saetae y Suntornsuk (2010) (Cuadro 2). Las concentraciones inhibitorias (CI_{50} y CI_{90}) también se estimaron (Cuadro 4).

Inhibición de la esporulación de *Alternaria chrysanthemi*. La solución salina (5 mL) se añadió a las colonias de *A. chrysanthemi*. Las esporas se obtuvieron como se describió anteriormente (*vide supra*) y la concentración de esporas (conidios/mL) se contaron con un hemocitómetro. Los resultados se reportaron como porcentaje de inhibición de la esporulación (IS) siguiendo la fórmula Abbott (Cuadro 2) (Höller *et al.*, 1999).

Ensayo en discos de hoja. Discos foliares de crisantemo (1.5 cm^2) se cortaron de plantas establecidas bajo condiciones de invernadero. Las hojas se desinfectaron con 1% NaOCl (1 min) y etanol al 70% (1 min). Los discos foliares se colocaron en placas de múltiples pocillos (formato de 12 pocillos) en agar-agua (2%). La fracción ACR-1E se disolvió en agua:etanol:DMSO:tween 20 (50:47.5:2.5:0.06, v/v) a concentraciones de 8, 4 y 2 mg / mL. Los discos foliares se impregnaron con 16 μL de la fracción de cada concentración (85, 42.5 and 21.2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$); después de la evaporación del disolvente, los discos se inocularon con 16 μL de la suspensión de esporas (2.5×10^4 esporas/mL) de *A. chrysanthemi*. Los discos foliares se incubaron entonces durante siete días a 24°C y luz natural. La actividad antifúngica se registró como se describe en Boehlendorf *et al.* (2004) usando el siguiente escala: 10 = presencia de micelio sin IC, 7 = Buena pero IC micelial incompleta, 3 = ligera IC micelial, y 0 = no se observó IC micelial.

Análisis estadísticos. Los datos de porcentajes (IC, ICM y IS) se transformaron a $y = \arcsin(\arct/100)$. Los datos fueron analizados mediante análisis de varianza y comparación múltiple de medias (Tukey, $P = 0.05$) utilizando el software Sistema de Análisis Estadístico (SAS) versión 9.1.3 para windows. Las concentraciones de inhibición (CI_{50} y CI_{90}) se calcularon por análisis Probit.

RESULTADOS

Actividad antifúngica de extractos de plantas contra *Alternaria chrysanthemi*. De todos los extractos (acuosos y etanólicos) evaluados por el ensayo de microdilución, sólo seis mostraron actividad IC contra *A. chrysanthemi* (Cuadro 1). Los más activos fueron los extractos etanólicos y acuosos de raíces de *A. gaumeri* (75 y 69% IC, respectivamente) y los EA del tallo y hojas de *B. flammea* (63 y 50%, respectivamente) (Cuadro 1).

Estos extractos de plantas también se evaluaron en el ensayo de dilución en agar mediante diluciones en serie. El EE de la raíz de *A. gaumeri* mostro la más alta ICM (78%) y también la más baja CI_{50} y CI_{90} (0.53 y 1.50 mg/ mL,

Leaf disk assay. Leaf-disks of chrysanthemum (1.5 cm^2) were cut from plants established under greenhouse conditions. Leaves were disinfected with 1% NaOCl (1 min) and 70% ethanol (1 min). Leaf disks were placed in multiwell plates (12-well format) onto water agar (2%). ACR-1E fraction was dissolved in water:ethanol:DMSO:tween 20 (50:47.5:2.5:0.06, v/v) to concentrations of 8, 4, and 2 mg/mL. Leaf disks were impregnated with 16 μL of the fraction of each concentration (85, 42.5 and 21.2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$); subsequently, after solvent evaporation, leaf disks were inoculated with 16 μL of the spore suspension (2.5×10^4 spores/mL) of *A. chrysanthemi*. Leaf disks were then incubated for seven days at 24°C and natural light. Antifungal activity was recorded as described by Boehlendorf *et al.*, (2004) using the following rank: 10 = presence of mycelia with no GI, 7 = good but incomplete mycelia GI, 3 = slight mycelia GI, and 0 = no mycelia GI was observed.

Statistical analyses. Data in percentages (GI, MGI and SI) were transformed to $y = \arcsin(\arct/100)$. Data were analyzed using analysis of variance and multiple means comparison (Tukey, $P = 0.05$) by Statistical Analysis System (SAS) version 9.1.3 for windows. Inhibition concentrations (IC_{50} and IC_{90}) were calculated by Probit analysis.

RESULTS

Antifungal activity of plant extracts against *Alternaria chrysanthemi*. Of all the plant extracts (aqueous and ethanolic) evaluated by microdilution assay, only six showed GI activity against *A. chrysanthemi* (Table 1). The most active were the ethanolic and aqueous extracts of *A. gaumeri* roots (75 and 69% GI, respectively) and AE of *B. flammea* stem and leaf (63 and 50%, respectively) (Table 1).

These plant extracts were also evaluated by agar dilution assay in serial dilutions. The EE of *A. gaumeri* root displayed the highest MGI (78%) and also the lowest IC_{50} and IC_{90} (0.53 and 1.50 mg/mL, respectively) (Table 2, 4). In addition, MIC and MFC values were 2 mg/mL. The aqueous extract of *B. flammea* stem and leaf showed moderate activity (MGI = 57 and 45%, respectively) (Table 2).

Sporulation inhibition was not significantly different (77-82 %) in *A. chrysanthemi* exposed to AE of *B. flammea* stem and leaf (both 9.1×10^3 spores/mL) and EE and AE of *A. gaumeri* roots (1.3×10^4 and 1.2×10^4 , respectively) (Table 2).

Antifungal activity of fractions from ethanolic extract of *Acalypha gaumeri*. The bioassay-guided partition of the EE of *A. gaumeri* root was performed by microdilution assay (Table 3). Antifungal activity was observed in the medium polarity fractions ACR-1B and ACR-1E, where GI values were 50 and 100 %, respectively. In addition, the fraction ACR-1E showed MIC values of 0.25 mg/mL, and IC_{50} and IC_{90} of 0.13 and 0.14 mg/mL, respectively (Table 3).

Leaf disk assay of fraction ACR-1E. The fraction ACR-1E was tested at different concentrations against *A. chrysanthemi* on chrysanthemum leaf disk assay. Data showed no mycelial growth of *A. chrysanthemi* on the treated leaf disks at 8 mg/mL (85 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$), while incomplete

Cuadro 1. Evaluación antifúngica de los extractos de plantas yucatecas contra *Alternaria chrysanthemi* mediante el ensayo de microdilución.

Table 1. Antifungal screening of yucatecan plant extracts against *Alternaria chrysanthemi* by microdilution assay.

Plant species	Family	Voucher	Plant part	GI (%)	
				E	A
<i>Acalypha gaumeri</i>	Euphorbiaceae	PS 2584	R	75 ± 0b	69 ± 12b
<i>Ambrosia hispida</i>	Asteraceae	PS 2579	L	0 ± 0d	0 ± 0d
<i>Bonellia flammea</i>	Theophrastaceae	PS 2782	S/R	6 ± 0d	13 ± 0d
			L	0 ± 0d	50 ± 0bc
			S	0 ± 0d	63 ± 19b
<i>Calea urticifolia</i>	Asteraceae	FM 1721	R	6 ± 0d	38 ± 12c
<i>Croton chichenensis</i>	Euphorbiaceae	PS 2571	S	0 ± 0d	0 ± 0d
			R	0 ± 0d	0 ± 0d
			R	0 ± 0d	0 ± 0d
<i>Furcraea cahum</i>	Agavaceae	PS 2583	R	0 ± 0d	0 ± 0d
<i>Randia obcordata</i>	Rubiaceae	PS 2582	S	0 ± 0d	0 ± 0d
<i>Trichilia minutiflora</i>	Meliaceae	PS 2586	S	0 ± 0d	0 ± 0d
<i>Vitex gaumeri</i>	Verbenaceae	PS 2598	L	0 ± 0d	0 ± 0d
Negative control				0 ± 0d	0 ± 0d
Positive control				100 ± 0a	100 ± 0a

Mean followed by the same letter within the columns are not significantly different (Tukey, P < 0.05).

L: Leaves R: Root S: Stem GI: growth inhibition

E: Ethanol extract (1 mg/mL) A: Aqueous extract (3% w/v)

Negative control: RMPI + 2.5% DMSO + spore suspension of *Alternaria chrysanthemi*

Positive control: Amphotericin B (4 µg/mL)

respectivamente) (Cuadro 2, 4). Además, los valores de CMI y CMF fueron de 2 mg/mL. El extracto acuoso del tallo y las hojas de *B. flammea* mostró una actividad moderada (ICM = 57 y 45%, respectivamente) (Cuadro 2).

Cuadro 2. Efecto de los extractos de plantas sobre el crecimiento micelial y la esporulación de *Alternaria chrysanthemi* en el ensayo de dilución en agar.

Table 2. Effect of plant extracts on the mycelial growth and sporulation of *Alternaria chrysanthemi* by agar dilution assays.

Plant species	Part Plant	Solvent	MGI (%)	SI (%)
<i>Acalypha gaumeri</i>	Root	E	78 ± 1.0b	78 ± 2.0b
		A	51 ± 2.3c	77 ± 2.0b
<i>Bonellia flammea</i>	Leaf	A	45 ± 2.1c	82 ± 2.0b
	Stem	A	57 ± 1.5c	82 ± 5.1b
Negative control			0 ± 0d	0 ± 0c
Positive control			100 ± 0a	100 ± 0a

Mean followed by the same letter within the same column are not significantly different (Tukey, P < 0.05).

MGI: Mycelial growth inhibition SI: Sporulation inhibition

E: Ethanol extract (1 mg/mL) A: Aqueous extract (3% w/v)

Positive control: Prochloraz 45 CE (0.2 mg/mL)

Negative control: PDA + 5% DMSO

inhibition of mycelial growth was observed when 4 mg/mL (42.5 µg/cm²) was applied on the chrysanthemum leaf disks (Figure 1).

Antifungal activity spectrum of *Acalypha gaumeri*. The EE of *A. gaumeri* root was evaluated by agar dilution assay against six common fungi (Table 4). The EE of *A. gaumeri* root inhibited mycelial growth of all tested fungi, the antifungal activity ranged from 68 to 97% at a concentration of 1 mg/mL (Table 4). The calculated IC₅₀ (0.33 mg/mL) and IC₉₀ (1.01 mg/mL) showed that the most sensitive fungal species was *C. cassiicola*. In contrast, the least sensitive was *C. capsici* (IC₅₀ = 0.60 mg/mL and IC₉₀ = 4.60 mg/mL).

DISCUSSION

In the present work, we have searched for natural antifungal products from local flora of the Yucatan Peninsula. We have evaluated ethanol and aqueous extracts from nine selected plant species on *A. chrysanthemi*. Data from *in vitro* antifungal assays (Table 1, 2) showed that both types of extracts of *A. gaumeri* root inhibited mycelial growth and sporulation of *A. chrysanthemi* using concentrations of 1 mg/mL for EE and 3% w/v for AE. In addition, we observed that EE showed lower values for IC₅₀ and IC₉₀ to inhibit the growth of *A. chrysanthemi* compared to those of AE (Table 2). Previous works have also reported greater activity from alcoholic extracts in comparison with that of aqueous extracts of plants on *Alternaria* species (Hassanein *et al.*, 2008; Shirzadian *et al.*, 2009; Zaker,

Cuadro 3. Porcentaje de inhibición del crecimiento de las fracciones de *Acalypha gaumeri* contra *Alternaria chrysanthemi* mediante el ensayo de microdilución y la determinación de su concentración inhibitoria (CI₅₀ y CI₉₀).

Table 3. Percentage of growth inhibition of *Acalypha gaumeri* fractions against *Alternaria chrysanthemi* by microdilution assay and determination of their inhibitory concentration (IC₅₀ and IC₉₀).

<i>Acalypha gaumeri</i> Fractions	Solvent	mg/mL		
		GI (%) 0.5 mg/mL	IC ₅₀	IC ₉₀
ACR-1A	<i>n</i> -hexane	0 ± 0c	ND	ND
ACR-1B	Ethyl acetate	50 ± 0b	0.5	0.57
ACR-1C	Aqueous residue	0 ± 0c	ND	ND
ACR-1D	Ethanol pp	0 ± 0c	ND	ND
ACR-1E	Ethyl acetate pp	100 ± 0a	0.13	0.14
Positive control: Amphotericin B: 4 µg/mL		100 ± 0a	0.001	0.003
Negative control: 2.5% DMSO		0 ± 0c		

Mean followed by the same letter within the same column are not significantly different (Tukey, P < 0.05).

GI: growth inhibition of *A. chrysanthemi*

IC: Inhibitory concentration at 50 and 90

ND: not determined

La inhibición de la esporulación no fue significativamente diferente (77- 82%) en *A. chrysanthemi* expuesta al EA del tallo y hojas de *B. flammea* (ambos a 9.1×10^3 esporas /mL) ni el EE y EA de las raíces de *A. gaumeri* (1.3×10^4 y 1.2×10^4 , respectivamente) (Cuadro 2).

Actividad antifúngica de las fracciones del extracto etanólico de *Acalypha gaumeri*. La partición guiada por bioensayo del EE de la raíz de *A. gaumeri* se realizó mediante el ensayo de microdilución (Cuadro 3). La actividad antifúngica se observó en las fracciones de polaridad media ACR-1B y ACR-1E, donde los valores de IC fueron 50 y 100%, respectivamente. Además, la fracción ACR-1E mostró valores de CMI de 0.25 mg/ mL, y la CI₅₀ y CI₉₀ de 0.13 y 0.14 mg/ mL, respectivamente (Cuadro 3).

Ensayo de disco de hoja de la fracción de ACR-1E. La fracción ACR-1E se evaluó a diferentes concentraciones contra *A. chrysanthemi* en ensayo de disco de hoja de crisantemo. Los datos no mostraron ningún crecimiento del micelio de *A. chrysanthemi* en los discos tratados a 8 mg/ mL ($85 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), mientras que se observó una inhibición incompleta de crecimiento micelial cuando se aplicaron 4 mg/ mL ($42.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) en los discos de hoja de crisantemo (Figura 1).

Espectro de actividad antifúngica de *Acalypha gaumeri*. El EE de la raíz de *A. gaumeri* se evaluó mediante el ensayo de dilución en agar contra seis hongos comunes (Cuadro 4). El EE de la raíz de *A. gaumeri* inhibió el crecimiento micelial de todos los hongos evaluados, la actividad antifúngica varió de 68 hasta 97% a una concentración de 1 mg/ mL (Cuadro 4). La CI₅₀ calculada (0.33 mg/ mL) y la CI₉₀ (1.01 mg/ mL) mostraron que la

2013). The effectiveness of *A. gaumeri* extracts was within the range reported for other species of *Alternaria* when exposed to other plant extracts (Ammar *et al.*, 2013; Wenqiang *et al.*, 2006).

To follow the antifungal activity produced by *A. gaumeri* on *A. chrysanthemi*, the EE was subjected to preliminary separation by partition with solvents of increasing polarity. Fractions and precipitates obtained were then tested against *A. chrysanthemi*, where fractions of medium polarity (ACR-1B and ACR-1E) were the most active. Both fractions displayed lower values of IC₅₀ and IC₉₀ than those of the EE (Table 3). In addition, the fraction ACR-1E was *in vitro* evaluated on chrysanthemum by leaf disk assay. Results showed full inhibition of hyphal growth of *A. chrysanthemi* at concentrations of 8 mg/mL (Figure 1). Lower concentrations of the extracts allowed mycelial growth in the medium, at the leaf disk border. This indicates that EE of *A. gaumeri* might affect the penetration or establishment of *A. chrysanthemi* on the foliar tissue of chrysanthemum leaves. Lin *et al.*, (2011) reported that crude extracts of *Solanum nigrum* effectively inhibited the development of symptoms of cabbage black leaf spot caused by *A. brassicicola* at a concentration of 5 mg/mL.

The species *A. gaumeri* (Euphorbiaceae) is an endemic herbaceous plant of the Yucatan Peninsula (Fernández-Concha *et al.*, 2010). With the exception of our studies (Cristóbal-Alejo *et al.*, 2006; Cruz-Estrada *et al.*, 2013; Gamboa-Angulo *et al.*, 2008) no reports have been documented on its biological properties or chemical composition. The *Acalypha* genus includes 462 species, and a search in literature yielded various reports on the potential

Cuadro 4. Espectro antifúngico de *Acalypha gaumeri* contra hongos fitopatógenos por el ensayo de dilución en agar.
Table 4. Antifungal spectrum of *Acalypha gaumeri* against phytopathogens by the agar dilution assay.

Phytopathogens	MGI (1 mg/mL)	mg/mL	
		IC ₅₀	IC ₉₀
<i>Alternaria chrysanthemi</i> (CICY004)	78 ± 1.0d	0.53 (0.48 - 0.58)	1.50 (1.28 - 1.89)
<i>Alternaria</i> sp. (ITC02)	91 ± 1.8b	0.48 (0.45 - 0.51)	1.26 (1.14 - 1.42)
<i>Colletotrichum capsici</i> (CC2)	68 ± 1.0e	0.60 (0.45 - 0.67)	4.60 (3.22 - 7.68)
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (CG4)	86 ± 1.9c	0.41 (0.38 - 0.44)	1.43 (1.25 - 1.70)
<i>Corynespora cassiicola</i> (ITC03)	97 ± 0.6a	0.33 (0.31 - 0.36)	1.01 (0.91 - 1.15)
<i>Curvularia</i> sp. (ITC10)	83 ± 1.5d	0.46 (0.43 - 0.49)	1.59 (1.38 - 1.90)
<i>Helminthosporium</i> sp. (ITC04)	87 ± 1.0c	0.41 (0.38 - 0.44)	1.35 (1.19 - 1.57)

MGI: Mycelial growth inhibition IC: inhibitory concentration
Median between column columns is statistically equal (Tukey P = 0.05).

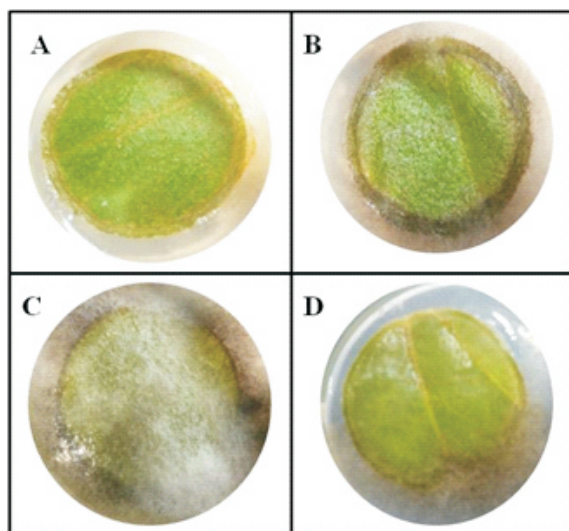


Figura 1. Efectos de la fracción ACR-1E en la inhibición de *Alternaria chrysanthemi* mediante el ensayo de disco de hoja después de siete días de incubación. A. 85 µg/cm² B. 42.5 µg/cm². C. EtOH:H₂O 1:2 D. Mirage 45 CE (2 µg/cm²).
Figure 1. Effects of the fraction ACR-1E on *Alternaria chrysanthemi* inhibition in leaf disk assay after seven days of incubation. A. 85 µg/cm² B. 42.5 µg/cm². C. EtOH:H₂O 1:2 D. Mirage 45 CE (2 µg/cm²).

especie fúngica más sensible fue la *C. cassiicola*. En contraste, la menos sensible fue *C. capsici* (CI₅₀ = 0.60 mg/mL y la CI₉₀ = 4.60 mg/mL).

DISCUSIÓN

En el presente trabajo, se buscaron productos antifúngicos naturales provenientes de la flora local de la

of *Acalypha* species on plant pathogenic fungi, for example, *Acalypha australis* against *Colletotrichum lagenarium* (Inagaki *et al.*, 2008); *Acalypha indica* against *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Fusarium oxysporum*, and *Microsporium canis* (Siva *et al.*, 2008; Jebakumar *et al.*, 2005; Somchit *et al.*, 2010), and *Acalypha wilkesiana* against *Aspergillus flavus*, *C. albicans*, *F. solani*, *Trichophyton interdistale*, and *T. mentagrophytes* (Alade and Irobi, 1993). Phytochemical studies on various *Acalypha* species showed the presence of metabolites such as flavonoids, polyketides, and terpenes (Adesina *et al.*, 2000; Gutierrez-Lugo *et al.*, 2002) alkaloids (Hungeling *et al.*, 2009) and an amide (Siems *et al.*, 1996). Chemical studies to identify the metabolites responsible for the antifungal effects of *A. gaumeri* are now in progress.

Previous works have also found that *A. gaumeri* was active on other fungi, such as *Colletotrichum* and *Fusarium* (Gamboa-Angulo *et al.*, 2008). Therefore, the EE was tested on several fungi (Table 4). Data showed that EE of *A. gaumeri* suppressed mycelial growth of all evaluated fungi; these included three strains of *Alternaria*, two species of *Colletotrichum* (*C. gloeosporioides* and *C. capsici*), *Corynespora cassiicola*, *Curvularia* sp. (ITC10), *Fusarium oxysporum*, and *Helminthosporium* sp. (ITC04). In particular, the inhibition (GI) of *Alternaria* species, ranged from 78% to 94% against *A. tagetica*, *Alternaria* sp. (ITC02), and *A. chrysanthemi*.

Another plant with significant effect against *A. chrysanthemi* was *B. flammea* (Theophrastaceae, before *Jacquinia flammea* Millsp.) leaf and stem, an endemic tree from the Yucatan peninsula. It is used in Mayan traditional medicine for treating fever. The methanol extract of the roots of this species has been reported with antifungal activity against dermatophytes (García-Sosa *et al.*, 2011) and against HeLa and RAW 264.7 human cancer cell lines. This

Península de Yucatán. Se evaluaron extractos etanólicos y acuosos de nueve especies de plantas contra *A. chrysanthemi*. Los datos de los ensayos *in vitro* antifúngicos (Cuadro 1, 2) mostraron que ambos tipos de extractos de raíz de *A. gaumeri* inhibieron el crecimiento micelial y la esporulación de *A. chrysanthemi* usando concentraciones de 1 mg/mL para el EE y 3% p/v para el EA. Además, se observó que el EE mostró valores más bajos de CI_{50} y CI_{90} para inhibir el crecimiento de *A. chrysanthemi* en comparación con el EA (Cuadro 2). Algunos trabajos anteriores también han reportado una mayor actividad de los extractos alcohólicos en comparación con los extractos acuosos contra las especies de *Alternaria* (Hassanein *et al.*, 2008; Shirzadian *et al.*, 2009; Zaker, 2013). La eficacia de los extractos de *A. gaumeri* estuvo dentro del rango reportado para otras especies de *Alternaria* cuando se expusieron a otros extractos de plantas (Ammar *et al.*, 2013; Wenqiang *et al.*, 2006).

Para monitorear la actividad antifúngica de *A. gaumeri* en *A. chrysanthemi*, el EE se sometió a separación preliminar por partición con disolventes de polaridad creciente. Las fracciones y los precipitados obtenidos se evaluaron contra *A. chrysanthemi*, donde las fracciones de polaridad media (ACR-1B y ACR-1E) fueron las más activas. Ambas fracciones mostraron valores menores de CI_{50} y CI_{90} que las del EE (Cuadro 3). Además, la fracción ACR-1E fue evaluada *in vitro* en crisantemo mediante el ensayo de disco de hoja. Los resultados mostraron una inhibición completa de crecimiento de hifas de *A. chrysanthemi* a concentraciones de 8 mg/mL (Figura 1). Concentraciones menores de los extractos permitieron el crecimiento del micelio en el medio de cultivo y en el bode del disco de hoja. Esto indica que el EE de *A. gaumeri* podría afectar a la penetración o el establecimiento de *A. chrysanthemi* en el tejido foliar de las hojas de crisantemo. Lin *et al.*, (2011) reportaron que los extractos crudos de *Solanum nigrum* inhibieron de manera eficiente el desarrollo de los síntomas de mancha de la hoja en col negra causada por *A. brassicicola* a una concentración de 5 mg/mL.

La especie *A. gaumeri* (Euphorbiaceae) es una planta endémica herbácea de la Península de Yucatán (Fernández-Concha *et al.*, 2010). Con la excepción de nuestros estudios (Cristóbal-Alejo *et al.*, 2006; Cruz-Estrada *et al.*, 2013; Gamboa-Angulo *et al.*, 2008) no hay reportes anteriores sobre sus propiedades biológicas o composición química. El género *Acalypha* incluye 462 especies, y una búsqueda en la literatura produjo varios informes sobre el potencial de las especies de *Acalypha* contra hongos patógenos de plantas, por ejemplo, *Acalypha australis* contra *Colletotrichum lagenarium* (Inagaki *et al.*, 2008); *Acalypha indica* contra *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Fusarium oxysporum*, y *Microsporium canis* (Siva *et al.*, 2008; Jebakumar *et al.*, 2005; Somchit *et al.*, 2010), y *Acalypha wilkesiana* contra *Aspergillus flavus*, *C. albicans*, *F. solani*, *Trichophyton interdistale*, y *T. mentagrophytes* (Alade and Irobi, 1993). Estudios fitoquímicos en varias especies de *Acalypha* mostraron la presencia de metabolitos tales como

plant produces vanillic acid 4-*O*-neohesperidoside and sakurososaponin. Last compound is one of the responsible principles of antifungal effect of *B. flammea* (Sánchez-Medina *et al.*, 2009).

CONCLUSIONS

The EE of *A. gaumeri* root EA showed *in vitro* the highest antifungal activity against *A. chrysanthemi*, followed only by AE of *B. flammea* stem and leaves. Results of the chrysanthemum leaf disk assay could have a high effectiveness in greenhouse assays and in the field. Moreover, the spectrum of antifungal action of *A. gaumeri* will increase when other pathogens are tested. The results presented in this study suggest that extracts of *A. gaumeri* have the potential to be developed as a natural fungicide. In addition, this is the first report of an antifungal screening of *A. chrysanthemi* using microdilution assay. This assay could be used in programs where a large number of extracts are evaluated in the search for natural antifungal products. Finally, this search corroborates the valuable potential of our regional flora for developing eco-friendly fungicides in the near future.

Acknowledgements. The authors thank Eduardo Balam, Paulino Simá-Polanco, Filogonio May-Pat and Sergio Pérez for their valuable technical assistance. This research was supported by Fomix-Conacyt (Project YUC-2011-C09-168624). A.A.V.D. thanks to Conacyt for the provision of a graduate student fellowship (No. 211999).

LITERATURA CITADA

- Abou-Jawdah Y, Sobh H, and Salameh A. 2002. Antimycotic activities of selected plant flora, growing wild in Lebanon, against phytopathogenic fungi. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50:3208-3213.
- Adesina SK, Idowu O, Ogundaini AO, Oladimeji H, Olugbade TA, Onawunmi GO, and Pais M. 2000. Antimicrobial constituents of the leaves of *Acalypha wilkesiana* and *Acalypha hispida*. *Phytotherapy Research* 14:371-374.
- Alade PI, and Irobi ON. 1993. Antimicrobial activities of crude leaf extracts of *Acalypha wilkesiana*. *Journal Ethnopharmacology* 39:171-174.
- Ammar MI, Nenaah GE, and Mohamed AHH. 2013. Antifungal activity of prenylated flavonoids isolated from *Tephrosia apollinea* L. against four phytopathogenic fungi. *Crop Protection* 49:21-25.
- Anderson NO. 2007. Chrysanthemum (*Dendranthema × grandiflora* Tzvelv.). pp 389 - 437. In: Anderson, N.O. (Ed.), *Flower Breeding and Genetics*, Springer-Verlag, Netherlands. 815 p.
- Barnett HL, and Hunter BB. 1972. *Illustrated genera of imperfect fungi*. Burgess Publishing Minneapolis, MN, USA. 241p.
- Boehlandorf B, Neff S, Shuez TC, Molleyres LP, Winkler T, Dobler M, and Huang Y. 2004. Patent GB 2396349. Compounds obtained from a fungal microorganism and derivatives thereof. 44p.
- Carvalho DDC, Alves E, Camargos RB, Oliveira DF,

flavonoides, policétidos, y los terpenos (Adesina *et al.*, 2000; Gutierrez-Lugo *et al.*, 2002) alcaloides (Hungeling *et al.*, 2009) y una amida (Siems *et al.*, 1996). Actualmente se están llevando a cabo estudios químicos para identificar los metabolitos responsables de los efectos antifúngicos de *A. gaumeri*.

Algunos trabajos anteriores también reportan que *A. gaumeri* fue activo en otros hongos, tales como *Colletotrichum* y *Fusarium* (Gamboa-Angulo *et al.*, 2008). Por lo tanto, el EE fue probado en varios hongos (Tabla 4). Los resultados mostraron que el EE de *A. gaumeri* suprimió el crecimiento micelial de todos los hongos evaluados; éstos incluyen tres cepas de *Alternaria*, dos especies de *Colletotrichum* (*C. gloeosporioides* y *C. capsici*), *Corynespora cassiicola*, *Curvularia* sp. (ITC10), *Fusarium oxysporum*, y *Helminthosporium* sp. (ITC04). En particular, la inhibición (IC) de las especies de *Alternaria*, varió del 78% al 94% contra *A. tagetica*, *Alternaria* sp. (ITC02) y *A. chrysanthemi*.

Otra planta con efecto significativo contra *A. chrysanthemi* fue *B. flammea*, hojas y tallos (Theophrastaceae, antes *Jacquinia flammea* Mill sp.), y el cual es un árbol endémico de la península de Yucatán. Se utiliza en medicina tradicional maya para tratar la fiebre. El extracto metanólico de las raíces de esta especie ha sido reportado con actividad antifúngica contra dermatofitos (García-Sosa *et al.*, 2011) y contra las líneas HeLa y RAW 264.7 de células cancerosas humanas. Esta planta produce ácido vanílico 4-0-neohesperidósido y sakurososaponina. Este último compuesto es uno de los responsables del efecto antifúngico de la *B. flammea* (Sánchez-Medina *et al.*, 2009).

CONCLUSIONES

El EE de la raíz de *A. gaumeri* en estudios *in vitro* mostró la más alta actividad antifúngica contra *A. chrysanthemi*, seguida sólo por el EA del tallo y hojas de la *B. flammea*. Los resultados del ensayo de disco foliar de crisantemo fueron altamente eficientes, por lo que, podrían ser efectivos en ensayos en invernadero y en el campo. Además, el espectro de actividad antifúngica de *A. gaumeri* aumentará cuando se evalúen otros patógenos. Los resultados presentados en este estudio sugieren que los extractos de *A. gaumeri* tienen el potencial de actuar como fungicidas naturales. Además, este es el primer reporte donde se evalúa la actividad antifúngica de *A. chrysanthemi* utilizando el ensayo de microdilución. Este ensayo podría ser utilizado en programas donde se evalúe un gran número de extractos en la búsqueda de productos antifúngicos naturales. Y para finalizar, esta búsqueda corrobora el valioso potencial de nuestra flora regional para el desarrollo de fungicidas ecológicos en un futuro próximo.

Agradecimientos. Los autores agradecen a Eduardo Balam, Paulino Simá-Polanco, Filogonio May-Pat y a Sergio Pérez por su valiosa asistencia técnica. Esta investigación fue apoyada económicamente por Fomix-Conacyt (Proyecto YUC-2011-C09-168624). A.A.V.D. agradece a CONACYT por la beca de estudiante de doctorado (N° 211999).

- Scolforo JRS, de Carvalho DA, and Batista TRS. 2011. Plant extracts to control *Alternaria alternata* in Murcott tanger fruits. *Revista Iberoamericana de Micología* 28:173-178.
- Copping LG, and Duke SO. 2007. Natural products that have been used commercially as crop protection agents. *Pest Management Science* 63:524-554.
- Cristóbal-Alejo J, Tun-Suárez JM, Moguel-Catzín S, Marbán-Mendoza N, Medina-Baizabal L, Simá-Polanco P, Peraza-Sánchez SR, and Gamboa-Angulo MM. 2006. *In vitro* sensitivity of *Meloidogyne incognita* to extracts from native Yucatecan plants. *Nematropica* 36:89-97.
- Cruz-Estrada A, Gamboa-Angulo M, Borges-Argáez R, and Ruiz-Sánchez E. 2013. Insecticidal effects of plant extracts on immature whitefly *Bemisia tabaci* Genn. (Hemiptera: Aleyroideae). *Electronic Journal of Biotechnology* 16:1-9.
- Dayan FE, Cantrell CL, and Duke SO. 2009. Natural products in crop protection. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 17:4022-4034.
- Deng Y, Chen S, Chang Q, Wang H, and Chen F. 2012. The chrysanthemum × *Artemisia vulgaris* intergeneric hybrid has better rooting ability and higher resistance to *Alternaria* leaf spot than its chrysanthemum parent. *Scientia Horticulturae-Amsterdam* 134:185-190.
- Dellavalle PD, Cabrera A, Alem D, Larrañaga P, Ferreira F, and Rizza MD. 2011. Antifungal activity of medicinal plant extracts against phytopathogenic fungus *Alternaria* spp. *Chilean Journal of Agricultural Research* 71:231-239.
- Fernández-Concha GC, Tapia-Muñoz JL, Duno-de Stefano R, y Ramírez-Morillo IM. 2010. Flora ilustrada de la península de Yucatán. Lista florística. pp 311 - 312. Centro de Investigación Científica de Yucatán, México. 326p.
- Gahukar RT. 2012. Evaluation of plant-derived products against pests and diseases of medicinal plants: A review. *Crop Protection* 42:202-209.
- Gamboa-Angulo MM, Cristóbal-Alejo J, Medina-Baizabal IL, Chí-Romero F, Méndez-González R, Simá-Polanco P, and May-Pat F. 2008. Antifungal properties of selected plants from the Yucatán peninsula, Mexico. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 24:1955-1959.
- García-Sosa K, Sánchez-Medina A, Álvarez SL, Zacchino S, Veitch NCP, Simá-Polanco P, and Peña-Rodríguez LM. 2011. Antifungal activity of sakurasosaponin from the root extract of *Jacquinia flammea*. *Natural Product Research* 25:1185-1189.
- Gutierrez-Lugo MT, Singh MP, Maiese WM, and Timmermann BN. 2002. New antimicrobial cycloartane triterpenes from *Acalypha communis*. *Journal of Natural Product* 65:872-875.
- Hassanein NM, Abou ZMA, Youssef IF, and Mahmoud DA. 2008. Efficacy of leaf extracts of neem (*Azadirachta indica*) and chinaberry (*Melia azedarach*) against early blight and wilt diseases of tomato. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences* 2:763-772.
- Höller U, Köng M, and Wright AD. 1999. Three new

- metabolites from marine-derived fungi of the genera *Coniothyrium* and *Microsphaeropsis*. *Journal of Natural Product* 62:114-118.
- Hungeling M, Lechtenberg M, Fronczek FR, and Nahrstedt A. 2009. Cyanogenic and non-cyanogenic pyridone glucosides from *Acalypha indica* (Euphorbiaceae). *Phytochemistry* 70:270-277.
- Inagaki H, Yamaguchi A, Kato K, Kageyama C, Iyozumi H, and Oki Y. 2008. Screening of weed extracts for antifungal properties against *Colletotrichum lagenarium*, the causal agent of anthracnose in cucumber. *Weed Biology and Management* 8:276-283.
- Jebakumar RDS, Kallidass S, and Vimalan J. 2005. Isolation, identification and study of antimicrobial property of a bioactive compound in an Indian medicinal plant *Acalypha indica* (Indian-nettle). *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 21:1231-1236.
- Lin TC, Fan MC, Wang SY, and Huang JW. 2011. Identification of the *Solanum nigrum* extract component involved in controlling cabbage black leaf spot disease. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59:1667-1672.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2004. Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts. Approved guidance. Document M44-A. Wayne, PA: NCCL. 29 p.
- Newman SE, and Roll MJ. 1999. A naturally occurring compound for controlling powdery mildew of greenhouse roses. *Hortscience* 34:686-689.
- Ravikumar MC, and Garampalli RH. 2013. Antifungal activity of plants extracts against *Alternaria solani*, the causal agent of early blight of tomato. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 46:1897-1903.
- Saetae D, and Suntornsuk W. 2010. Antifungal activities of ethanolic extract from *Jatropha curcas* seed cake. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 20:319-324.
- Sánchez-Medina A, Peña-Rodríguez LM, May-Pat F, Karagianis G, Waterman PG, Mallet AI, and Habtemariam S. 2009. Identification of sakurasosaponin as a cytotoxic principle from *Jacquinia flammea*. *Natural Product Communications* 4:1-6.
- Shirzadian S, Azad HA, and Khalghani J. 2009. Introductory study of antifungal activities of bryophyte extracts. *Applied Entomology and Phytopathology* 77:1-22.
- Siems K, Jakupovic J, Castro V, and Poveda, L. 1996. Constituents of two *Acalypha* species. *Phytochemistry* 41:851-853.
- Siva N, Ganesan S, Banumathy N, and Muthuchelian. 2008. Antifungal effect of leaf extract of some medicinal plants against *Fusarium oxysporum* causing wilt disease of *Solanum melongena* L. *Ethnobotanic Leaflets* 12:156-63.
- Somchit MN, Rashid RA, Abdullah A, Zuraini A, Zakaria ZA, Sulaiman MR, Arifah AK, and Mutalib AR. 2010. *In vitro* antimicrobial activity of leaves of *Acalypha indica* Linn. (Euphorbiaceae). *African Journal of Microbiology Research* 4:2133-2136.
- Talibi I, Askarne L, Boubaker H, Boudyach EH, Msanda F, Saadi B, and Aoumar AAB. 2012. Antifungal activity of some Moroccan plants against *Geotrichum candidum*, the causal agent of postharvest citrus sour rot. *Crop Protection* 35:41-46.
- Villanueva-Couoh E, Sánchez-Briceño MA, Cristóbal-Alejo J, y Tún-Suárez J. 2005. Diagnóstico y alternativas de manejo químico del tizón foliar (*Alternaria chrysanthemi* Simmons y Crosier) del crisantemo (*Chrysanthemum morifolium* Ramant.) Kitamura en Yucatán, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 23:49-56.
- Wenqiang G, Shufen L, Ruixiang Y, and Yanfeng H. 2006. Comparison of composition and antifungal activity of *Artemisia argyi* Lévl. et Vant inflorescence essential oil extracted by hydrodistillation and supercritical carbon dioxide. *Natural Product Research* 20:992-998.
- Xu G, Chen S, and Chen F. 2010. Transgenic chrysanthemum plants expressing a harpin_{soo} gene demonstrate induced resistance to *Alternaria* leaf spot and accelerated development. *Russ. Journal of Plant Physiology* 57: 548-553.
- Yanar Y, Gökçe A, Kadioglu I, Çam H, and Whalon M. 2011. *In vitro* antifungal evaluation of various plant extracts against early blight disease (*Alternaria solani*) of potato. *African Journal of Biotechnology* 10:8291-8295.
- Zaker M. 2013. Screening some medicinal plant extracts against *Alternaria sesame*, the causal agent of *Alternaria* leaf spot of sesame. *Journal of Ornamental and Horticultural Plants* 3:1-8.