



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

ESTUDIO INTEGRAL DE *Acalypha gaumeri* PAX y
K. HOFFM DIRIGIDO A SUS PROPIEDADES
FUNGICIDAS.

Tesis que presenta

ARELY ANAYANSI VARGAS DÍAZ

En opción al título de

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

(Ciencias Biológicas: Opción Biotecnología)

Mérida, Yucatán, México

Noviembre, 2014





RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis titulado Estudio integral de *Acalypha gaumeri* Pax y K. Hoffm. dirigido a sus propiedades fungicidas fue realizado en los laboratorios de la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección de la Dra. María Marcela Gamboa Angulo y el Dr. Jairo Cristóbal Alejo, dentro de la Opción Biotecnología, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente,

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Felipe", is written over a horizontal line.

Dr. Felipe Augusto Vázquez Flota

Director de Docencia

Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Mérida, Yucatán, México; a 15 de octubre del 2014

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos Experimentales, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se registrarán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.

Firma: _____



Nombre: Arely Anayansi Vargas Díaz

AGRADECIMIENTOS

Al CONACYT por la beca otorgada con No. 211999 y por el financiamiento para el proyecto Fomix-Conacyt (No. YUC-2011-C09-168624).

A mis padres, por su apoyo en todo momento.

A mis asesores de tesis, Dra. María Marcela Gamboa Angulo y Dr. Jairo Cristobal Alejo, por sus consejos y conocimiento.

A mi comité revisor: Dra. Beatriz Hernández Carlos, Dra. Cecilia Rodríguez García, Dra. Daisy Pérez Brito, Dra. Patricia Colunga Marin, Dr. Ignacio Islas Flores y el Dr. José María Tun Suárez por sus sugerencias y consejos para enriquecer este documento de tesis.

A la I.Q. Irma Leticia Medina Baizabal y al M.C. Luis W. Torres Tapia por su apoyo técnico en el laboratorio; a Paulino Simá Polanco, Filogonio May y Eduardo Balam Uc por su apoyo en las colectas y la técnica Celene Espadas Manrique y I.Q Silvia Andrade Canto por las fotografías del MEB.

Al Dr. Angel Cruz Estrada por su apoyo técnico en la realización de los bioensayos.

A mis amigos Anita, Angel, Andres, Carlos y Edgar por sus consejos, a Daisy, Dany, Karely, Ana, Tania y Ashanty por acompañarme en este camino.

A la Unidad de Biotecnología por las instalaciones proporcionadas para realizar el trabajo experimental

DEDICATORIA

Con mucho amor

A mi madre, Imelda Díaz Alvarez por su amor

a mi padre, Angel Vargas y a mi familia por su cariño y

a Juan Chale Dzul por su apoyo

Contenido

Contenido	i
Índice de cuadros	xii
Índice de figuras	xiii
RESUMEN	1
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN.....	5
REFERENCIAS	7
 CAPÍTULO I. ANTECEDENTES, HIPÓTESIS, OBJETIVO Y ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	 9
1.1. ANTECEDENTES.....	9
1.1.1. Las plantas como fuente de productos naturales.....	9
1.1.1.1. Metabolitos del género de <i>Acalypha</i>	14
1.1.2. Descripción botánica de la planta de estudio.....	15
1.1.2.1. Características del género <i>Acalypha</i>	15
1.1.2.1.1. <i>Acalypha gaumeri</i> Pax & K. Hoffm.	16
1.1.2.1.1.1. Distribución	16
1.1.2.1.1.2. Descripción	17
1.1.2.1.1.3. Ubicación taxonómica.....	18
1.1.3. Bioensayos antifúngicos.....	18
1.1.3.1. Bioensayo de difusión en disco	19
1.1.3.2. Bioensayo de dilución en agar	19
1.1.3.3. Bioautografía.....	19
1.1.3.4. Bioensayo en microdilución.....	20
1.1.4. Descripción de los fitopatógenos bajo estudio	20
1.1.4.1. <i>Alternaria</i>	20

1.1.4.1.1. <i>Alternaria chrysanthemi</i> Simmons & Crosier	21
1.1.4.2. <i>Colletotrichum</i>	21
1.1.4.2.1. <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (Penz.) Penz. & Sacc.....	22
1.1.4.2.2. <i>Colletotrichum capsici</i> (Syd.).....	22
1.1.4.3. <i>Corynespora</i>	23
1.1.4.3.1. <i>Corynespora cassicola</i>	23
1.1.4.4. <i>Curvularia</i> sp.....	23
1.1.4.5. <i>Helminthosporium</i> sp.....	24
1.1.4.6. <i>Mycosphaerella</i>	24
1.1.4.6.1. <i>Mycosphaerella fijiensis</i> Morelet	24
1.1.5. Estrategias reproductivas en plantas.....	25
1.1.5.1. Auxinas como reguladores de crecimiento en las plantas	26
1.1.6. Impacto de los factores ambientales en el metabolismo secundario en plantas	27
1.2. JUSTIFICACIÓN	31
1.3. OBJETIVOS	33
1.3.1. Objetivo general	33
1.3.2. Objetivo específicos	33
1.4. HIPOTESIS	35
1.5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	37
1.6. BIBLIOGRAFÍA.....	37
CAPÍTULO II. ESPECTRO DE ACCIÓN DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE <i>ACALYPHA GAUMERI</i> -----	53
2.1. INTRODUCCIÓN.....	53
2.2. OBJETIVO ESPECÍFICO	54
2.3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	54
2.3.1. Obtención del extracto etanólico de la raíz de <i>Acalypha gaumeri</i>	54

2.3.2. Evaluación antifúngica.....	54
2.3.2.1. Cepas fitopatógenas	54
2.3.2.2. Bioensayo de dilución en agar	55
2.3.2.3. Bioensayo antifúngico en microdilución.....	55
2.3.2.3.1. Suspensión de esporas	56
2.3.2.3.2. Bioensayo en microdilución	56
2.3.3. Análisis estadísticos	56
2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	57
2.4. CONCLUSIONES	59
2.5. BIBLIOGRAFÍA.....	60
CHAPTER III. ANTIFUNGAL EFFECT OF <i>Acalypha gaumeri</i> ROOT EXTRACTS AND COMPOUNDS ON <i>Mycosphaerella fijiensis</i> . -----	63
3.1. INTRODUCCION.....	63
3.2. RESULTS AND DISCUSSION	64
3.3. EXPERIMENTAL	71
3.3.1. Plant material and preparation of crude extract	71
3.3.2. Bioassay-guided extraction and isolation.....	72
3.3.2.1. Purification of <i>Acalypha gaumeri</i> ethanol extract.....	72
3.3.2.2. Analytical methods.....	72
3.3.3. Strain pathogens	72
3.3.4. Antifungal microdilution assay	72
3.3.5. Data analyses.....	73
3.4. REFERENCES	73
CAPÍTULO IV. ACTIVIDAD ANTIFUNGICA DE TRES POBLACIONES DE <i>Acalypha</i> <i>gaumeri</i> COLECTADAS EN ÉPOCA DE SEQUÍA, LLUVIA E INICIO DE SEQUÍA----	77
4.1. INTRODUCCIÓN.....	77
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	78

4.3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	78
4.3.1. Selección de los sitios	78
4.3.2. Recolección del material vegetal.....	79
4.3.3. Obtención de los extractos de <i>A. gaumeri</i>	80
4.3.3.1. Obtención de los extractos ricos en compuestos nitrogenados	80
4.3.4. Perfil químico de los extractos	81
4.3.4.1. Perfil químico por cromatografía de capa delgada (CCD)	81
4.3.5. Evaluación de la actividad antifúngica mediante el bioensayo en microdilución	81
4.3.6. Análisis estadístico	81
4.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	82
4.4.1. Rendimiento de los extractos etanólicos de la raíz de <i>Acalypha gaumeri</i>	82
4.4.2. Evaluación de la actividad antifúngica	82
4.4.2.1. Actividad antifúngica contra <i>Alternaria chrysanthemi</i>	82
4.4.2.2. Actividad antifúngica contra <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	83
4.4.2.3. Actividad antifúngica contra <i>Mycosphaerella fijiensis</i>	84
4.4.3. Perfil químico por cromatografía de capa delgada (CCD).....	85
4.6. CONCLUSIONES	89
4.7. BIBLIOGRAFÍA.....	89
CAPÍTULO V. PROPAGACIÓN DE <i>Acalypha gaumeri</i> -----	93
5.1. INTRODUCCIÓN.....	93
5.2. OBJETIVO ESPECÍFICO	93
5.3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	93
5.3.1. Propagación vegetativa por esqueje.....	93
5.3.1.1. Colecta de esquejes.....	93
5.3.1.2. Siembra de esquejes.....	94
5.3.2. Propagación sexual o por semillas	94

5.3.2.1. Colecta de semillas	94
5.3.2.2. Siembra de semillas	94
5.3.3. Análisis estadísticos	94
5.4. RESULTADOS Y DISCUSION	95
5.4.1. Propagación por esqueje.....	95
5.4.2. Propagación por semilla	97
5.4.3. Descripción de flores masculinas y semillas	98
5.5. CONCLUSIONES	98
5.6. BLIBIOGRAFÍA.....	99
CAPÍTULO VI. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES GENERALES	101
6.1. DISCUSIÓN GENERAL.....	101
6.2. CONCLUSIONES GENERALES	103
6.3. PERSPECTIVAS	103
ANEXOS	107

Índice de cuadros

Cuadro 1.1. Productos orgánicos de origen vegetal utilizados en la agricultura (Copping y Duke, 2007; Dayan <i>et al.</i> , 2009).-----	10
Cuadro 1.2. Actividad biológica reportada de especies pertenecientes al género <i>Acalypha</i> -----	12
Cuadro 1.3. Metabolitos secundarios reportados en el género <i>Acalypha</i> -----	14
Cuadro 1.4. Algunos factores ambientales que influyen en el metabolismo secundario en plantas (Ncube <i>et al.</i> , 2012). -----	28
Cuadro 2.1. Lista de hongos fitopatógenos evaluados con el extracto etanólico de la raíz de <i>Acalypha gaumeri</i> . -----	54
Cuadro 2.2. Escala numérica de la inhibición del crecimiento en el bioensayo de microdilución en microplaca (NCCLS, 2002). -----	56
Cuadro 2.3. Inhibición del crecimiento micelial (ICM) y concentración inhibitoria 50 y 90 de las diferentes cepas fitopatógenas con el extracto etanólico de <i>Acalypha gaumeri</i> . -----	57
Table 3.1. Antifungal effect of <i>Acalypha gaumeri</i> extracts and fractions on <i>Mycosphaerella fijiensis</i> by microdilution assays (500 µg/mL). -----	65
Table 3.2. Minimal inhibitory concentration and inhibition concentration (IC ₅₀ and IC ₉₅ of compounds 1 and 2 isolated from <i>Acalypha gaumeri</i> against <i>Alternaria chrysanthemi</i> and <i>Mycosphaerella fijiensis</i> .-----	66
Table 3.3. ¹ H and ¹³ C-NMR and 3D spectral data of compound argaumerine in MeOD. -----	70
Cuadro 4.1. Condiciones climáticas y edáficas de los sitios de muestreo (García y Secaira, 2006; Hijmans <i>et al.</i> , 2005).-----	79
Cuadro 4.2. Rendimiento de la extracción etanólica de cada una de las colectas de <i>Acalypha gaumeri</i> realizadas en los tres sitios. -----	82
Cuadro 4.3. Inhibición de la germinación de esporas (IGE) con los extractos etanólicos de <i>Acalypha gaumeri</i> (1000 µg/mL) contra <i>Alternaria chrysanthemi</i> .-----	83

Cuadro 4.4. Porcentaje de inhibición de la germinación de los diferentes extractos etanólicos de *Acalypha gaumeri* (1000 µg/mL) contra *Colletotrichum gloeosporioides*.

----- 83

Cuadro 4.5. Porcentaje de inhibición de la germinación de los diferentes extractos etanólicos de *Acalypha gaumeri* (500 µg/mL) contra *Mycosphaerella fijiensis*. ----- 84

Cuadro 4.6. Concentración mínima inhibitoria (CMI) de los extractos etanólicos de las diferentes colectas contra *Alternaria chrysanthemi*, *Colletotrichum gloeosporioides* y *Mycosphaerella fijiensis*.----- 85

Índice de figuras

Figura 1.1. Distribución de <i>Acalypha gaumeri</i> en la península de Yucatán (Imagen proporcionada por el herbario del CICY). -----	17
Figura 1.2. <i>Acalypha gaumeri</i> , A) flores masculinas, B) semillas, C) frutos y D) flores femeninas con semillas abortadas -----	18
Figura 1.3. Factores principales que pueden influir en el contenido de metabolitos secundarios en plantas (Gobbo-Neto y Lopes, 2007). -----	29
Figura 1.4. Diagrama general a seguir con las raíces de <i>Acalypha gaumeri</i> Pax & Hoffm. -----	37
Figura 2.1. Inhibición del crecimiento micelial del extracto etanólico de <i>Acalypha gaumeri</i> contra las diferentes cepas fitopatógenas y su respectivo control de crecimiento, A: corresponde al crecimiento del hongo en medio con el extracto etanólico y A': corresponde al crecimiento del hongo en medio con DMSO al 5 %. -----	58
Figure 3.1. ¹ H NMR spectrum of argaumerine (1) from <i>Acalypha gaumeri</i> (400 MHz, MeOD). -----	66
Figure 3.2. ¹³ C NMR spectrum of antifungal compound argaumerine (1) of <i>Acalypha gaumeri</i> (400 MHz, MeOD). -----	67
Figure 3.3. ¹ H- ¹ H COSY spectrum of antifungal compound argaumerine (1) of <i>Acalypha gaumeri</i> (400 MHz, MeOD). -----	68
Figure 3.4. The structure and key HBMBC correlations of argaumerine. -----	69
Figure 3.5. The structure and key NOESY correlations of argaumerine -----	69
Figura 4.1. Esquema general de la colecta, procedimiento y análisis de las muestras de <i>Acalypha gaumeri</i> en colectas seriadas, en tres poblaciones. -----	80
Figura 4.2. Perfil químico de los extractos nitrogenados de <i>Acalypha gaumeri</i> en un sistema: <i>n</i> -butanol: ácido acético: agua 7:1:2, A) placa cromatográfica observada a onda corta, B) placa cromatográfica observada a onda larga, C) placa cromatográfica revelada en ácido fosfomolibdico y D) placa cromatográfica revelada con Dragendorff. El corchete de color rojo indica la presencia de estándar argaumerine y el corchete de color amarillo el compuesto semi-puro estándar ACR-3L. -----	86

Figura 5.1. Porcentaje de enraizamiento de esquejes provenientes de la parte media y basal de la planta con tratamiento con y sin auxinas. El asterisco sobre la barra indica diferencia estadística significativa según la prueba de Tukey ----- 95

Figura 5.2. Esquejes de *A. gaumeri* después de 60 días A) Esqueje proveniente de la parte media con auxinas, B) Esqueje proveniente de la parte media sin auxinas, C) Esquejes provenientes de la parte basal con auxinas y D) Esquejes provenientes de la parte basal sin auxinas.----- 96

Figura 5.3. A) flor masculina, B) inflorescencia masculina, C) semilla lado horizontal y D) semillas lado frontal.----- 98

RESUMEN

Acalypha gaumeri es una planta endémica de la península de Yucatán, cuyos extractos obtenidos de sus raíces han mostrado poseer actividad antifúngica contra varios hongos fitopatógenos. En el presente trabajo se evaluó el espectro de acción del extracto etanólico de esta planta contra siete cepas fitopatógenas (*Alternaria* sp., *Colletotrichum capsici*, *C. gloeosporioides*, *Corynespora cassicola*, *Curvularia* sp., *Helminthosporium* sp. y *Mycosphaerella fijiensis*). Los resultados mostraron la capacidad del extracto etanólico de inhibir el crecimiento de todas las cepas patógenas evaluadas (68 – 100 %), indicando su buen espectro de acción.

También se realizó el aislamiento bio-dirigido de los compuestos antifúngicos de *A. gaumeri* contra *M. fijiensis*. Este proceso guió al aislamiento de tres fracciones (ACR-1B, 1E, 2B) y dos compuestos activos (Argaumerine y ACR-3L). Ambos compuestos presentaron una concentración mínima inhibitoria (CMI) = 31 µg/mL sobre la germinación de los conidios de *M. fijiensis* y una menor actividad contra *A. chrysanthemi*. El análisis de los datos espectroscópicos de argaumerina (RMN mono y bidimensionales) indica un nuevo alcaloide pentacíclico benzoquinolínico. Por otra parte, el espectro de protón de ACR-3L demuestra que posee una estructura química similar a la argaumerina.

En la tercera etapa se analizó la actividad y el perfil químico en tres poblaciones de *A. gaumeri* colectadas en diferentes épocas del año. El porcentaje más alto de extracción se obtuvo en el periodo de sequía en todas las poblaciones (2.2 – 3.1 %). La menor CMI contra *A. chrysanthemi*, *C. gloeosporioides* y *M. fijiensis* (500, 1000 y 500 µg/mL, respectivamente) se obtuvo con los extractos obtenidos de la población de Tinum en la época de lluvias. El perfil químico por cromatografía de capa delgada (ccd) de los extractos indicó la presencia de los compuestos argaumerina y ACR-3L en cada uno de ellos. Finalmente, se exploró la propagación de *A. gaumeri* por semilla y esquejes. Los mejores resultados se obtuvieron de la parte media del esqueje con la aplicación de ácido indolbutírico, alcanzando un enraizamiento del 96 %. La propagación de la semilla fue menos eficiente con un 51 ± 3.6 % de germinación.

En general los resultados de esta investigación indican que la especie *A. gaumeri* es una excelente candidata para el desarrollo de un agente antifúngico natural.

ABSTRACT

Acalypha gaumeri is an endemic plant of the Yucatan peninsular region, whose root extracts showed antifungal activity against various fungal phytopathogens. In this work, the action spectrum of the ethanol extract of this plant was evaluated against seven phytopathogenic strains (*Alternaria* sp., *Colletotrichum capsici*, *C. gloeosporioides*, *Corynespora cassiicola*, *Curvularia* sp., *Helminthosporium* sp. and *Mycosphaerella fijiensis*). The results showed the ability of the ethanolic extract to inhibiting the growth of all the targets strains tested (68 – 100 %) indicating its good spectrum.

Also, involved the bioassay -guide isolation of antifungal compounds of *A. gaumeri* against *M. fijiensis*. This process guided the isolation of three fractions (ACR-1B, 1E and 2B) and two active compounds (Argaumerine and ACR-3L). Both compounds showed a minimal inhibitory concentration (MIC) = 31 µg/mL against conidium germination of *M. fijiensis* and lower activity against *A. chrysanthemi*. The analysis of the spectroscopic data of argaumerine (mono and bidimensional RMN spectra) indicate a novel pentacyclic quaternary benzoquinolizinic alkaloid. Moreover, the proton spectrum of ACR-3L shows that it has a similar chemical structure to argaumerine.

The third stage, the activity and chemical profile was analyzed in three different populations of *A. gaumeri* collected in different seasons. The highest percentage of extraction was obtained in the dry seasons in all populations (2.2 – 3.1 %). The lower MIC against *A. chrysanthemi*, *C. gloeosporioides* and *M. fijiensis* (500, 1000 y 500 µg/mL) respectively was obtained with extract obtained from the population of Tinum in the rainy seasons. The chemical profile on thin layer chromatography (TLC) of the extracts indicated the presence of the compounds argaumerine y ACR-3L in each of them. Finally, the propagation of *A. gaumeri* was explored by seed and cuttings. The best results were obtained with propagation by cutting from the middle part of the plant with application of indolbutilic acid with 96 % rooting. The propagation of the seed is less efficient with 51 ± 3.6 % germination.

In general the results of this investigation indicate that the specie *A. gaumeri* is an excellent candidate for development of a natural antifungal agent.

INTRODUCCIÓN

El rápido crecimiento de las poblaciones en el mundo demanda mayor producción de alimentos. Sin embargo, existe un decremento en la producción de muchos cultivos de importancia agrícola causado por enfermedades (Pelegrini, *et al.*, 2009). Las estimaciones indican, que más de las tres cuartas partes de estas enfermedades se deben a las infecciones fúngicas ocasionadas por aproximadamente 8,000 especies diferentes de hongos (Blackwell, 2011).

El uso indiscriminado de agroquímicos sintéticos para el control de los fitopatógenos fúngicos ha inducido la resistencia en ellos, con lo que hay un aumento significativo en los costos de producción, problemas nocivos para la salud tanto humana como animal y los organismos benéficos, así como la contaminación en el ambiente dada su alta residualidad (Bajpai y Kang, 2010).

Ante este panorama, una alternativa viable en el control de las enfermedades fúngicas, es el uso de extractos o compuestos derivados de plantas. Lo anterior, es debido al conocimiento que se tiene de las plantas, ya que ellas mismas se protegen contra el ataque de patógenos, biosintetizando compuestos antimicrobianos constitutivos conocidos como fitoalexinas (Dayan *et al.*, 2009). A nivel mundial, muchas plantas están siendo sometidas a programas de búsqueda de nuevas alternativas para el control de enfermedades. Por otra parte, México es un país con una enorme riqueza vegetal, poco explorada, con aproximadamente 26,000 especies de plantas reportadas, de los cuales, 2,300 se encuentran en la Península de Yucatán (Arellano *et al.*, 2003).

En la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán se han realizado estudios enfocados al control de fitopatógenos mediante extractos originados de plantas. Los resultados de esta exploración mostraron a los extractos etanólico y acuoso de la raíz de *Acalypha gaumeri* como los más activos contra el hongo fitopatógeno *Alternaria chrysanthemi*, con una inhibición del crecimiento micelial del 75 y 68 %, respectivamente. De igual forma, el extracto acuoso se evaluó en campo logrando reducir un 67 % la severidad de la enfermedad causada por este fitopatógeno (Vargas-Díaz, 2009). Asimismo, esta planta ha presentado actividad antifúngica *in vitro* contra otros patógenos como *Alternaria tagetica*, *Colletotrichum gloeosporioides* y *Fusarium oxysporum* (Gamboa-Angulo *et al.*, 2008). Estos antecedentes, hacen de *A. gaumeri* una planta con potencial para continuar siendo estudiada y a futuro ser utilizada como una alternativa natural en el control de hongos fitopatógenos.

La especie *A. gaumeri* es catalogada endémica de la Península de Yucatán y no se conocen reportes de su fitoquímica. De acuerdo a su potencial antifúngico, es importante probar el efecto del extracto contra otros fitopatógenos para conocer mejor su espectro de acción, así como identificar los principios antifúngicos de esta especie. Por otro lado, es importante generar conocimiento sobre el comportamiento de los principios activos de *A. gaumeri* mediante el seguimiento de la actividad y el perfil químico en diferentes poblaciones, bajo distintas condiciones climáticas y edáficas de crecimiento y en diferentes épocas del año durante sequía (Marzo – mayo), lluvias (Junio – octubre) e inicio de sequía (Noviembre – febrero). Con esto, se podrá verificar y validar el potencial antifúngico de *A. gaumeri*. Finalmente, es importante plantear estrategias de propagación, para su conservación y uso sostenible (Silva *et al.*, 2002). Con el presente trabajo se contribuye al desarrollo de nuevas alternativas naturales para el control de fitopatógenos, mediante el estudio integrado de esta especie.

REFERENCIAS

- Arellano, J., J. Flores, J. Tún y M. Cruz (2003). Etnoflora yucatanense nomenclatura, forma de vida, uso, manejo y distribución de las especies vegetales de la Península de Yucatán: CONACYT, UADY, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia; Fascículo 20. 87 p.
- Bajpai, V.K. y S.C. Kang (2010). Antifungal activity of leaf essential oil and extract of *Metasequoia glyptostroboides* Miki ex Hu. Journal of the American oil Chemistry Society, 87:327– 336.
- Blackwell, M. (2011). The fungi: 1, 2, 3...5.1 million species? American Journal of Botany, 98(3), 426 – 438.
- Dayan, F.E., C.L. Cantrell y S.O. Duke (2009). Natural product in crop protection. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 17, 4022 – 4034.
- Gamboa-Angulo, M., J. Cristóbal-Alejo, L. Medina-baizabal, F. Chí-Romero, R. Méndez-González, P. Simá-Polanco y F. May-Pat (2008). Antifungal propiedades of selected plants from the Yucatan península, México. World Journal Microbiology Biotechnology, 24, 1955 – 1959.
- Pelegrini, P.B., L.R. Farias, A.C.M. Saude, F.T. Costa, C. Bloch, L.P. Silva, A.S. Oliveira, C.E.M. Gómes, M.P. Sales y O.L. Franco (2009). A novel antimicrobial ppetide from *Crotalaria pallida* sedes with activity against human and phytopathogens. Currence Microbiology, 59, 400 – 404.
- Silva, G. A., A. T. Lagunes, J. C. Rodríguez y D. L. Rodríguez (2002). Insecticidas vegetales: una vieja y nueva alternativa para el manejo de plagas. Manejo Integrado de Plagas y Agroecología, 66: 4-12.
- Vargas-Díaz, A. A (2009). Alternativas naturales para el control de *Alternaria chrysanthemi* Simmons & Crosier. Tesis de maestría. Centro de Investigación Científica de Yucatán. 102 p.

CAPÍTULO I. ANTECEDENTES, HIPÓTESIS, OBJETIVO Y ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

1.1. ANTECEDENTES

1.1.1. Las plantas como fuente de productos naturales

México es un país con una enorme riqueza vegetal, debido a su amplia variedad de climas y condiciones fisiográficas y se estima que posee poco más de 26,000 especies de plantas (Arellano *et al.*, 2003). Se ha reportado que extractos de especies vegetales tienen una alta actividad antibacteriana, antifúngica y/o insecticida (Mohana y Raveesha, 2007). Existe información de aproximadamente 400 especies de plantas con propiedades fungicidas (Zamora-Natera *et al.*, 2005). Los plaguicidas basados en especies vegetales pueden ser exitosos en el control de fitopatógenos (Okigbo y Ogonnaya, 2006), ya que tienen un mínimo impacto ambiental y ocasionan menor daño o son inocuos en contraste con los productos sintéticos (Mohana y Raveesha, 2007). A diferencia de estos últimos, los plaguicidas naturales poseen generalmente un tiempo de vida corto, ya que los principios activos contenidos en ellos, no tiene sustituyentes halógenos (Cl, F, y Br). Sin embargo, son ricos en carbono, oxígeno y nitrógeno. Asimismo los productos naturales de origen vegetal pueden ser exitosamente utilizados para desarrollar agroquímicos naturales con nuevos y variados modos de acción debido a su alta diversidad estructural (Dayan *et al.*, 2009).

Existen varios aceites esenciales de especies vegetales que ya son utilizados en la agricultura para protección de cultivos agrícolas. Por ejemplo, el aceite de *Simmondsia californica* (E-Rase™), *Rosemarinus officianalis* (Sporan™), extractos hidrofóbicos de *Azadirachta indica* (Trilogy™) y el extracto de *Allium sativum* (Garlic barrier). Sin embargo, muy poco se sabe sobre los principios activos y sus modos de acción contra fitopatógenos (Cuadro 1.1).

Cuadro 1.1. Productos orgánicos de origen vegetal utilizados en la agricultura (Copping y Duke, 2007; Dayan *et al.*, 2009).

Planta	Familia	Principio activo	Fitopatógeno	Nombre comercial
<i>Reynourtria sachalinensis</i>	Polygonaceae	Compuestos fenólicos	<i>Sphaerotheca fuliginea</i> , <i>Leveillula taurica</i> , <i>Botrytis cinerea</i>	Milsana®
<i>Simmondsia californica</i>	Simmondsiaceae	Aceites esenciales		E-Rase™
<i>Rosemarinus officianalis</i>	Lamiaceae	Aceites esenciales	Alternaria	Sporan™
<i>Azadirachta indica</i>	Meliaceae	Aceites esenciales		Trilogy™
<i>Allium sativum</i>	Liliáceas	Alicina	<i>Alternaria</i> , <i>Botrytis</i> , <i>Colletotrichum</i> , <i>Helminthosporium</i> , <i>Cladosporium</i> , <i>Dreschslera</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Monilia</i> , <i>Pyricularia</i> , <i>Pseudoperonospora</i> , <i>Claviceps</i> , <i>Glomerella</i> , <i>Ustilago</i> , <i>Uromyces</i>	Garlic barrier
<i>Cassia tora</i>	Fabaceae	cinnamaldehído	<i>Fusarium moniliforme</i> , <i>Pythium</i> , <i>Rhizoctonia</i> , <i>Sclerotinia homeocarpa</i> y <i>Verticillium fungicola</i>	Vertigo
<i>Macleaya cordata</i>	Papaveraceae	Alcaloides: sanguinarina y cheleritrina		Qwel

Otro extracto comercial es el de *Reynourtria sachalinensis*, utilizado en Europa para el control de enfermedades causadas por un amplio espectro de fitopatógenos, pero principalmente contra *Sphaerotheca fuliginea*, *Leveillula taurica* y *Botrytis cinerea* (Cuadro 1.1). Su modo de acción parece involucrar la acumulación de compuestos fenólicos fungitoxicos, los cuales contribuyen al incremento de la resistencia contra el ataque de patógenos en la planta (Dayan *et al.*, 2009).

El cinnamaldehído es uno de los principales ejemplos de productos naturales derivados de plantas con actividad fungicida y en uso comercial. Este compuesto se aisló de las semillas frescas de *Cassia tora* L. y es usado para controlar enfermedades causadas

por *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans*, especies de *Pythium*, *Rhizoctonia*, *Sclerotinia homeocarpa* y *Verticillium fungicola*. Algunos autores han planteado que su modo de acción es la inhibición de la síntesis de la quitina, componente principal de la pared celular de los hongos (Dayan *et al.*, 2009; Copping y Duke, 2007).

Por otra parte, existen reportes en la literatura de extractos de especies vegetales con actividad antifúngica. Barrera-Necha y Bautista-Baños (2002), evaluaron el efecto de las hojas, frutos y semillas de *Pithecellobium dulce*, en polvo, sobre el crecimiento micelial de *Alternaria* sp., *Botrytis cinerea*, *C. gloeosporioides*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium digitatum*, *Pestalotiopsis* sp y *Rhizopus stolonifer*. Ellos observaron que las semillas en polvo tuvieron la más alta actividad fungistática contra los hongos, en comparación con los de fruto y hoja. Aba (2005) evaluó el extracto etanólico de *Eugenia caryophyllus* contra *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia solani* a una concentración de 5000 µg/mL, logrando una inhibición de 41 y 51 %, respectivamente.

Con la finalidad de contribuir al desarrollo de nuevos productos eco-amigables para control fitosanitario, se seleccionaron, con base en sus antecedentes plaguicidas, 20 especies de la flora nativa de la región de Yucatán, pertenecientes a diferentes géneros. Para ello, se separaron los órganos vegetales hoja, tallo y raíz y se realizaron las extracciones con disolventes orgánicos. Después de una serie de evaluaciones antifúngicas se seleccionó el extracto etanólico de la raíz de *Acalypha gaumeri* por presentar importante actividad contra *Alternaria alternata*, *A. chrysanthemi*, *Colletotrichum gloeosporioides* y *Fusarium oxysporum* (Cuadro 1.2) (Gamboa-Angulo *et al.*, 2008; Vargas-Díaz 2009) Con estos resultados se evaluó en campo el extracto acuoso de *A. gaumeri* contra *A. chrysanthemi* obteniendo una efectividad del 67 % al controlar la enfermedad causada por este patógeno, con respecto al testigo blanco (Vargas-Díaz, 2009). Asimismo, el extracto etanólico de hoja y tallo de *A. gaumeri* han presentado actividad nematocida contra *Meloidogyne incognita* con un porcentaje de mortalidad del 95 % a una concentración de 500 ppm (Cristóbal-Alejo, *et al.*, 2006). Cruz-Estrada *et al.* (2013) reportaron la actividad insecticida contra *Bemisia tabaci*.

Se han reportado otras especies pertenecientes al mismo género con propiedades fungicidas contra dermatofitos como *A. hispida*, *A. indica* y *A. wilkesina* (Cuadro 1.2) (Akinde, 1986; Alade e Irobi, 1993; Adesina *et al.*, 2000; Ikewuchi y Anyadiiegwu, 2008; Jebakumar *et al.*, 2008; Ogundaini, 2005; Oladunmoye, 2006). De igual forma, existen especies que no presentan propiedades antifúngica, como es el caso de *A. hederacea* (Canales, *et al.*, 2008).

Cuadro 1.2. Actividad biológica reportada de especies pertenecientes al género *Acalypha*

Especie	Tipo de compuestos	Actividad	Bianco	Referencia
<i>A. australis</i>		Fungicida	<i>Colletotrichum lagenarium</i>	Inagaki et al., 2008
<i>A. diversifolia</i>	Alcaloides	Bactericida	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Niño et al., 2012.
	Esteroles, saponinas y alcaloides	Fungicida	<i>Fusarium solani</i>	Niño et al., 2012.
<i>Acalypha fruticosa</i>		Bactericida	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Duraipandiyan et al., 2006
	Terpenoides, flavonoides, taninos		<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Micrococcus flavus</i> .	Mothana et al., 2008
	Terpenoides, flavonoides, taninos	Citotóxica	Células FL	Mothana et al., 2008
		Larvicida	<i>Plutella xylostella</i>	Lingathurai et al., 2011
<i>Acalypha gaumeri</i>		Fungicida	<i>Alternaria chrysanthemi</i> <i>Alternaria tagetica</i> <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> <i>Fusarium oxysporum</i>	Vargas-Díaz, 2009 Gamboa-Angulo et al., 2008
		Nematicida	<i>Meloidogyne incognita</i>	Cristóbal-Alejo, et al., 2006
		Insecticida	<i>Bemisia Tabaci</i>	Cruz-Estrada et al., 2013
<i>Acalypha indica</i>		Fungicida	<i>Fusarium oxysporum</i> <i>Candida albicans</i> , <i>Aspergillus niger</i> <i>Candida albicans</i> , <i>Candida tropicalis</i> , <i>Microsporum canis</i> <i>Aspergillus fumigatus</i>	Siva et al., 2008 Jebakumar et al., 2005 Somchit et al., 2010
		Bactericida	<i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella enteritidis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella pneumonia</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Proteus</i> sp.	Somchit et al., 2010 Jebakumar et al., 2005 Durga et al., 2010
		Insecticida	<i>Aedes aegypti</i> L., <i>Culex quinquefasciatus</i> Say	Bagavan et al., 2008
		Insecticida	<i>Anopheles stephensi</i>	Govindarajan et al., 2008

Continuación...				
<i>Acalypha maccafeana</i>		Bactericida	<i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella spp</i> <i>Salmonella spp.</i>	Yusha'u et al., 2008
<i>Acalypha siamensis</i>		Bactericida	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Shigella sonnei</i>	Wiar et al., 2004
<i>Acalypha sp.</i>		Insecticida	<i>Callosobruchus chinensis</i>	Sathyaseelan et al., 2008
	Alcaloides y taninos	Bactericida	<i>Staphylococcus aureus</i>	Niño et al., 2012
	Esteroles, saponinas y alcaloides	Fungicida	<i>Fusarium solani</i>	Niño et al., 2012
<i>Acalypha platyphylla</i>	esteroles	Bactericida	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Escherichia coli</i> ;	Niño et al., 2012
<i>Acalypha wilkesiana</i>	Alcaloides, saponinas, antraquinonas y flavonoides	Taninos, Bactericida	<i>Staphylococcus aureus</i>	Akinyemi et al., 2005
			<i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Escherichia coli</i>	Othman et al., 2011.
<i>Acalypha wilkesiana cv. macafeana</i>	Alcaloides, esteroides, glicosidos y terpenoides		<i>Escherichia coli</i> , <i>Streptococcus pyogenes</i>	Ezekiel et al., 2009
			<i>Staphylococcus aureus</i>	Alade e Irobi, 1993
			<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Yersinia enterocolitica</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella typhi</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Klebsiella aerogenes</i>	Gotep et al., 2010
			<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> <i>Clostridium sporogenes</i> , <i>B. cereus</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i>	Oladunmoye, 2006
		Fungicida	<i>Trichophyton mentagrophytes</i> , <i>Candida albicans</i> <i>Aspergillus flavus</i>	Alade e Irobi, 1993
			<i>Trichophyton interdistale</i> , <i>Aspergillus niger</i> y <i>Fusarium solani</i>	Alade e Irobi, 1993

En otros estudios se ha encontrado que las especies *A. fruticosa*, *A. indica*, *A. wilkesiana*, *A. hispida* y *A. siamensis* poseen propiedades bactericidas (Akinyemi et al., 2005; Akinyemi et al., 2006; Duraipandiyar et al., 2006; Ejechi, 2001; Govindarajan et al., 2008; Monthana et al., 2008; Wiar et al., 2004). Asimismo, existen reportes de especies que han mostrado propiedades larvicidas y ovicidas contra *Anopheles*

stephensi, vector de la malaria, como es el caso de *A. indica* (Govindarajan *et al.*, 2008) (Cuadro 1.2).

1.1.1.1. Metabolitos del género de *Acalypha*

En el género *Acalypha*, se han aislado metabolitos clasificados en diferentes familias químicas, como terpenos, policétidos y flavonoides principalmente (Cuadro 1.3)

Cuadro 1.3. Metabolitos secundarios reportados en el género *Acalypha*

Planta	Autor	Compuestos aislados	Actividad biológica
<i>Acalypha australis</i>	Zhongguo-Zhong, 2008	emodina, β-sitosterol loliolida 2,6-dimetoxi-1,4-benzoquinona ácido nicotínico ácido protocatechuico daucosterol ácido gálico rutina ácido succínico brevifolina	NE
<i>A. communis</i>	Gutierrez-Lugo, <i>et al.</i> , 2002	ácido 16-α-hidroximólico ácido 15-α-hidroximólico ácido 7-β-6-β-dihidroxi-1,23-dideoxijessico	Bactericida
<i>A. fruticosa</i>	Gopalakrishnan <i>et al.</i> , 2010	1, 2 ácido benzenodicarboxílico, ácido <i>n</i> -hexadecanoico, 9, 12 ácido octadecadienoico, α-D-glucopiranosido y eicositriclorosilano.	NE
<i>A. hispida</i>	Amakura, <i>et al.</i> , 1999	acalyfidinas M-1 y M-2, 1-0-galoil-3,6-hexahidroxidifenol-4-0- brevifolincarboxil-β-D glucosa geraniina.	NE
	Reiersen <i>et al.</i> , 2003	cianidina 3-O-(20"-galloil-60"-O-α-rhamnopiranosil-β-galactopiranosido), disacárido robtopiranosido, cianidina 3-O-(20"-galloil-β-galactopiranosido) y cianidina 3-O-β-galactopiranosido.	NE
<i>A. hispida</i> y <i>A. wilkesiana</i>	Adesina, <i>et al.</i> , 2000	ácido gálico corilagina geraniina	Bactericida
<i>A. indica</i>	Ma, <i>et al.</i> , 1997	carboxilato potasico de brevifolina acaindinina 1-0-galoil-β- D-glucosa 1,2,3,6-tetra-0-galoil-β-D-glucosa corilagina geraniina acetoniogeraniina A eufomisina ácido repandusínico A ácido chebulágico quercetina-3-0-β- D-glucósido rutina	NE
	Hiremath, <i>et al.</i> , 1998	crisina galangina	NE

Continuación...

	Hungeling <i>et al.</i> , 2009	acalyfina, epiacalyfina, noracalyfina, epinoracalyfina, amida de acalyfina, amida de cicloepicalyfina y seco-acalyfina	NE
	Nahrstedt <i>et al.</i> , 1982	acalyfina	NE
	Nahrstedt <i>et al.</i> , 2005	mauritianina clitorina nicotiflorina biorobina	NE
	Talapatra <i>et al.</i> , 1981	acalyfamida, aurantiamida, succinimida	NE
	Taufiq-Yap <i>et al.</i> , 2000	flindersina	NE
<i>A. macrostachya</i>	Siems, <i>et al.</i> , 1996	18-hidroxi-7-oxo-15,16-epoxifriedoladdano-5,13(16), 14-trieno 3 α -hidroxi-7-oxo-15,16-epoxifriedolabdan-5,13(16), 14 trieno, 7,8- Dihidroxi- α -curcumeno <i>N</i> -tras-feruloiltiramina β -estigmasterona.	NE
<i>A. torta</i>	Onocha y Oloyede, 2011	(E,E,Z)-1,5,9-Cyclododecatrieno (16.58%), Hexiltiglato (9.74%), N-(4-metoxifenil)-nicotinamida (8.86%), Spiro[3,3]heptane-2,6-dione (7.65%), (E)- β -Terpineol (6.72%)	Antioxidante

NE: no evaluado

Al ser *A. gaumeri* una planta endémica de la Península de Yucatán, existen pocos reportes de su actividad antifúngica y ninguno en cuanto a su fitoquímica, por lo que es necesario conocer los principios activos de esta planta.

1.1.2. Descripción botánica de la planta de estudio

1.1.2.1. Características del género *Acalypha*

El género *Acalypha* pertenece a la familia Euphorbiaceae y ocupa el cuarto lugar en esta familia con 462 especies. Éstas se distribuyen principalmente en las regiones tropicales y subtropicales, donde algunas especies son cultivadas como plantas ornamentales (Govaerts *et al.*, 2000).

Las especies de *Acalypha* pueden ser hierbas anuales o perennes, arbustos o árboles pequeños, sin látex; plantas monoicas, algunas veces dioicas; las hojas son alternas, pecioladas, estipuladas, con la lámina entera o dentada. Inflorescencias espigadas, racemosas o paniculadas, axilares o terminales; flores estaminadas muy pequeñas, subsésiles, varias en la axila en pequeñas brácteas, con el cáliz formado por cuatro segmentos, pétalos y discos ausentes, estambres generalmente ocho, libres, anteras

péndulas, vermiformes en la madurez; flores pistiladas 1-3 en la axila de una bráctea, lóbulos del cáliz con 3-5 pétalos y discos ausentes; ovario 1-3-locular, un óvulo por lóculos, ramas de cada estilo generalmente disecadas en segmentos filiformes; la flor pistilada distal a veces diferente de las otras, un esquizocarpo profundamente lobulado o indehiscente (Méndez, 2003). El fruto es una cápsula de pequeño tamaño, que suele mantener los caracteres del ovario. Las semillas son ovoides o a veces piriformes, generalmente con carúncula muy reducida; la superficie puede ser casi lisa o, más comúnmente estar cubierta de diminutas foveolas (Cardiel, 1994).

El continente americano alberga aproximadamente dos tercios de las especies conocidas de *Acalypha*. Estas se concentran en América tropical y subtropical, aunque algunas especies se extienden por zonas templadas de Norteamérica. Sólo en Canadá y Chile no hay representantes del género. Entre ellas, dominan las arbustivas y arbóreas en el trópico y, a medida que se aleja a latitudes templadas, son más frecuentes las especies herbáceas. Los especialistas sugieren que existen dos centros de mayor diversidad del género, el principal situado en México con 126 especies y otro secundario entre Bolivia y Perú (Cardiel, 1994; Martínez-Gordillo *et al.*, 2002; Steinmann, 2002).

En el estado de Yucatán se encuentran distribuidas 12 especies de *Acalypha* entre las que se puede mencionar *Acalypha alopecuroides*, *A. arvensis*, *A. ferdinandii*, *A. gaumeri*, *A. hispida*, *A. leptopoda*, *A. poirotti*, *A. polystachya*, *A. setosa*, *A. vagans*, *A. villosa* y *A. wilkesiana* (Reinhard, 1924).

1.1.2.1.1. *Acalypha gaumeri* Pax & K. Hoffm.

La especie *A. gaumeri* es conocida como sak ch'ilib tuux en Maya y pertenece a la familia Euphorbiaceae. Es una planta nativa de la Península de Yucatán, que hasta hace poco sólo era conocida como melifera. Sin embargo, en estudios recientes ha demostrado tener una importante actividad en el control de patógenos de cultivos agrícolas, insectos y nematodos (Cristóbal-Alejo *et al.*, 2006; Cruz-Estrada *et al.*, 2013; Gamboa-Angulo *et al.*, 2008; Vargas-Díaz, 2009).

1.1.2.1.1.1. Distribución

La planta es catalogada endémica de la región peninsular, comprendiendo Campeche, Yucatán y Quintana Roo. Habita en la selva baja caducifolia, selva mediana subperennifolia y en la selva mediana subcaducifolia (Figura 1.1).



Figura 1.1. Distribución de *Acalypha gaumeri* en la península de Yucatán (Imagen proporcionada por el herbario del CICY).

1.1.2.1.2. Descripción

La planta *A. gaumeri* es un arbusto, bajo y muy ramificado que puede llegar a medir hasta 2.5 m de altura con ramas y brotes en su mayoría dimórficos. Hojas con estípulas persistentes, elípticas, de 7–18 mm de largo y 4–10 mm de ancho, base obtusa, con márgenes serrados y ápices obtusos agudos con pedúnculos de 0-5 mm. La región floral mide de 2–3 mm, presenta flores pistiladas individuales con pedúnculos de 1–1.5 mm y con 8–11 brácteas. Los frutos se encuentran entre los brotes laterales de las hojas encerrados en brácteas. Es una especie dioica, la descripción de esta planta se basó en dos colectas de individuos femeninos. El individuo masculino; cuenta con ramas leñosas, espigas axilares densas, de hasta 8 mm de largo y 1.5 mm de ancho, con pelos cortos, brácteas deltoideas, ciliadas (Figura 1.2) (Reinhard, 1924).

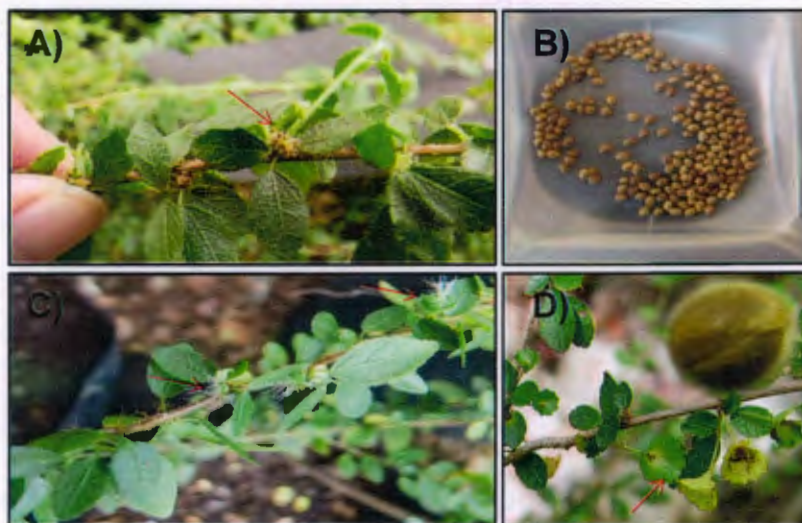


Figura 1.2. *Acalypha gaumeri*, A) flores masculinas, B) semillas, C) frutos y D) flores femeninas con semillas abortadas

1.1.2.1.1.3. Ubicación taxonómica

Reino: Plantae

Filo: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Malpighiales

Familia: Euphorbiaceae

Subfamilia: *Acalyphinae*

Género: *Acalypha*

Especie: *Acalypha gaumeri* Pax & K. Hoffm.

1.1.3. Bioensayos antifúngicos

Los bioensayos antifúngicos, son herramientas empleadas para detectar la acción fungicida o fungistática de un producto sintético, semisintético o natural. Asimismo, se puede determinar la concentración a la cual es capaz de inhibir de manera visible, el crecimiento de un microorganismo después de un período de incubación. Este parámetro es conocido como Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) o MIC, por sus siglas en inglés. Este parámetro permite determinar la susceptibilidad de un patógeno hacia un fungicida y se utiliza en los laboratorios principalmente para confirmar la

resistencia, pero más frecuentemente es una herramienta para determinar la actividad *in vitro* de nuevos fungicidas (Andrews, 2001).

Diferentes técnicas han sido reportadas para detectar productos antifúngicos, entre ellas se pueden mencionar la de disco, dilución en agar, bioautografía y microdilución.

1.1.3.1. Bioensayo de difusión en disco

Técnica utilizada para detectar agentes inhibitorios del crecimiento micelial de un microorganismo. La muestra se absorbe en discos de papel filtro y éste se deposita en la superficie del medio de cultivo, al cual previamente se ha inoculado con el patógeno a evaluar. El diámetro de la zona de inhibición se determina midiendo el halo de inhibición del patógeno. El tamaño del inóculo, las condiciones de incubación así como los criterios de lectura e interpretación de los resultados varían para cada patógeno. Por lo que se consideran los criterios establecidos por el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 2004).

1.1.3.2. Bioensayo de dilución en agar

Diseñado para determinar la capacidad inhibitoria de un agente fungicida o fungistático y simultáneamente la concentración mínima inhibitoria (CMI). Para esto se preparan una serie de tubos con cantidades decrecientes de un fungicida, para conseguir una serie doble progresiva de concentraciones. Estas diluciones se incorporan en agar fundido. Ya solidificadas se les adiciona el inóculo y se incuban a las condiciones óptimas para cada patógeno. Se mide el diámetro del crecimiento micelial y se sigue la fórmula de Abbott (Andrews, 2001; Wenqiang *et al.*, 2006).

1.1.3.3. Bioautografía

Técnica usualmente usada para detectar la actividad antifúngica en procesos de purificación biodirigida y requiere mínimas cantidades de la muestra a evaluar. La muestra a evaluar se aplica en placas cromatográficas y se eluye con un sistema de disolventes. Posteriormente se observan bajo luz ultravioleta, se marcan las zonas de adsorción de los compuestos y a continuación en la superficie de las placas de gel se vierte suavemente agar inoculado con el patógeno a una concentración conocida. Trascurrido el tiempo de incubación, según el patógeno la placa es revelada. El R_f de las zonas de inhibición se compara con las R_f de las placas de referencia. Adicionalmente, esta técnica permite determinar si hay uno o varios metabolitos responsables de la actividad antifúngica (Nostro *et al.*, 2000).

1.1.3.4. Bioensayo en microdilución

La técnica de microdilución es una técnica de dilución en caldo, que utiliza placas de poliestireno con micropocillos en lugar de tubos de ensayo. Posee muchas ventajas, entre ellas que son rápidas de realizar, se analizan muchas muestras simultáneamente y las cantidades de muestra requeridas son en microgramos (Volúmenes finales menores de 100 ó 200 μ l). La búsqueda de actividad en productos naturales mediante la microdilución es atractiva, generalmente porque las cantidades de los compuestos representan un factor limitante en los bioensayos. Muchas veces los productos naturales son termolábiles; las temperaturas altas son inevitables al incorporar los compuestos al medio fundido, sin embargo en esta técnica se emplea el medio líquido (RMPI 1640), por lo que se reduce el riesgo de descomposición de los compuestos. Otra ventaja, es que los efectos de respuesta-concentración pueden estudiarse fácilmente por análisis de regresión para obtener la CI_{50} y CI_{90} , ya que las diluciones son de manera automatizada (Hadacek y Greger, 2000; NCCLS, 2002). La metodología se describe en el capítulo II.

1.1.4. Descripción de los fitopatógenos bajo estudio

Las plantas están constantemente expuestas a una gran variedad de microorganismos patógenos presentes en el ambiente (Bajpai y Kang, 2010). Las enfermedades causadas por hongos fitopatógenos constituyen una de las principales limitantes en agricultura, ocasionando grandes pérdidas económicas (Navarrete-Mapen, 2010). Muchos de estos fitopatógenos incluyen a los géneros de *Alternaria*, *Colletotrichum*, *Corynespora*, *Curvularia* y *Helminthosporium*.

1.1.4.1. *Alternaria*

Las especies de *Alternaria* son saprofitos comúnmente encontrados en suelos o en tejidos muertos. Algunas especies son oportunistas, patógenos de plantas causantes de enfermedades en una gran variedad de cultivos como cereales, ornamentales, vegetales como coliflor, brócoli, zanahoria, papa, tomate y frutos como los cítricos y manzana (Thomma 2003; Tylkowska *et al.*, 2008). Este género posee 44 especies y los daños se observan como lesiones necróticas en el centro y se encuentran rodeadas por un halo clorótico, síntoma común en los procesos de infección en las especies de *Alternaria*; esta zona es creada por la difusión de metabolitos tóxicos hacia la planta y que causan la destrucción de los tejidos del hospedero a través de la reducción del potencial fotosintético (Rotem, 1997; Thomma, 2003).

1.1.4.1.1. *Alternaria chrysanthemi* Simmons & Crosier

Las colonias se observan de color olivo pálido, café a negro al reverso de la caja Petri oscureciéndose con la edad y el micelio llega a medir un diámetro de 4–8 μm . Los conidióforos se originan solamente de una fasícula; se pueden distinguir las cicatrices anulares (lugar de donde se separó el conidio), son erectos y suelen medir hasta 110 μm de largo por 6–11 μm de ancho. Los conidios son oscuros, frecuentemente cilíndricos y algunas veces obclavados, solitarios o en cadenas cortas. Las esporas se encuentran constreñidas a nivel del septo, éstas miden entre 25–130 μm (70 μm) de largo y entre 10–26 μm (17 μm) de ancho, presentan entre 5 a 17 septas transversales y entre cero a seis longitudinales, el septo del conidio pueden tener una dimensión <12 μm (Ellis, 1993; Rao, 1969; Cabrera *et al.*, 2004).

Patógeno causante de la mancha foliar en crisantemo, las primeras lesiones aparecen como manchas de color café claro, las cuales crecen rápidamente adoptando una forma de círculos irregulares, de color café a café oscuro o negro y puede eventualmente llegar a medir 30 mm de diámetro antes de afectar cloróticamente toda la hoja (Sobers, 1965). En los tallos, las lesiones son al principio superficiales, pero después penetran profundamente causando un ahorcamiento y por consiguiente, la deshidratación de los tejidos infectados, y muerte de la planta. En las áreas muertas, el hongo fructifica abundantemente, formando una costra negra de conidióforos y conidios que cubren la superficie epidérmica (Camargo *et al.*, 2000). Los principales fungicidas utilizados para el control de la enfermedad causada por este patógeno son azoxystrobin, folpet, clorotalonil y captan (Villanueva-Couoh *et al.*, 2005).

1.1.4.2. *Colletotrichum*

Colletotrichum es uno de los géneros más agresivos y reconocidos como agentes causales de la antracnosis en climas templados, subtropicales y tropicales. Este género posee un amplio espectro de hospederos, incluyendo vegetales, cultivos de forraje, árboles frutales y ornamentales. Posee además 688 especies, que son patógenos de frutas, pero también son capaces de infectar otras partes de la planta hospedera en cualquier etapa de crecimiento; sin embargo, las lesiones del fruto son las más comunes y las que generan mayores pérdidas económicas (Hyde *et al.*, 2009; Tapia-Tussell *et al.*, 2008).

1.1.4.2.1. *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc.

Las colonias de *C. gloeosporioides* se presentan de color blanco grisáceo a gris oscuro al reverso de la caja Petri, oscureciéndose con la edad, incluso naranja cuando se ha formado el acérvulo maduro y algunas veces pueden observarse colonias de color rosa. Los conidios son hialinos, cilíndricos, ovoides elípticos, falcados, o encorvados, con ápices redondeados, unicelulares, su tamaño varía de 7–20 µm de largo y de 2.5–5 µm de ancho. Los conidios se forman en cuerpos fructíferos llamados acérvulos, las masas de conidios son de color salmón, rosa o naranja. Los acérvulos son subepidérmicos y brotan a través de la superficie de los tejidos vegetales, tienen forma de disco o cojín, son cerosos y se ubican en áreas necróticas o lesiones claramente definidas sobre cualquier parte del hospedante, de forma redondeada, alargada o irregular, pueden ser de 500 µm de diámetro, además pueden poseer espinas o setas largas y oscuras o hifas estériles en forma de filamento, variables en longitud, raramente mayores de 200 µm de largo y 4–8 µm de ancho (Becerra, 1997; Acosta, 2002).

Patógeno de un amplio espectro de especies vegetales en el mundo (Zhu y Oudemans, 2000), está asociado con más de 470 hospederos de diferentes géneros. *C. gloeosporioides* prevalece en los trópicos, pero también se encuentra en un amplio rango de temperaturas y hábitats subtropicales. Causa problemas en frutos de post-cosecha; en cultivos como las Agavaceas, aguacate, cítricos, café, fresa, mango, manzana, olivo, papa y papaya entre otros (Adaskaveg y Förster, 2000; Afanador- Kafuri *et al.*, 2003; Carvalho *et al.*, 2000; Farr *et al.*, 2006; Freeman *et al.*, 2000; Hyde *et al.*, 2009; Mignouna *et al.*, 2002; Ramos *et al.*, 2006; Waller y Bridge, 2000; Xiao *et al.*, 2004). Los fungicidas más utilizados para su control son el azoxystrobin, captan, benomilo, y bitertanol (Diccionario de especialidades agropecuarias, 2004).

1.1.4.2.2. *Colletotrichum capsici* (Syd.)

Las colonias se pueden observar de color blanco a grisáceo, originalmente descrito como *Vermicularia capsici* Syd. en India y se caracteriza por presentar acérvulos elípticos o circulares, de 85–245 µm de diámetro distribuidos alrededor de la lesión, subepidérmicos, con masas de esporas de color gris. Los conidios alcanzan tamaños de 17–26 µm de longitud por 3–4 µm de ancho, son hialinos y falcados con ápices con forma de flecha (Shenoy *et al.*, 2007).

Los síntomas de *C. capsici* están asociados con necrosis en el envés de las hojas y pudriciones en varias plantas (Hyde, *et al.*, 2009; Shenoy *et al.*, 2007). Causante de la

antracnosis en chile (*Capsicum annuum* y *C. frutescens*), sin embargo, está reportado que puede ser patógeno de un amplio rango de plantas (121 géneros en 45 familias de plantas) (Farr *et al.*, 2007), incluyendo algodón, tomate y una gran variedad de leguminosas (Shenoy *et al.*, 2007), también es capaz de infectar flores como crisantemo (Roberts *et al.*, 2001). Los fungicidas más utilizados para su control son benomil, carbendazim, captan y maneb (Suthin y John, 2009).

1.1.4.3. *Corynespora*

Es encontrado en los trópicos y subtropicos, son considerados como saprotróficos, necrotróficos y biotróficos. Como parásitos biotróficos son capaces de infectar diferentes partes de la planta, particularmente afectan las hojas (Kumar *et al.*, 2012). Este género contiene 71 especies descritas en el mundo (Srivastava, 2013).

1.1.4.3.1. *Corynespora cassicola*

Las colonias son efusas de color gris o marrones oliváceos. Micelio sin estroma, presenta conidióforos de color marrón, derechos o curvos, de 110–850 µm de largo y de 4–11 µm de ancho. Conidios solitarios o muy variables en forma, obclavados o cilíndricos, rectos o curvos, de color olivo, gris con 4–20 pseudoseptas con 40–220 µm de largo y 9–22 µm de ancho y 4–8 µm de ancho en la base (Ellis, 1993).

La enfermedad se presenta con manchas en las hojas en formas de punto, elípticas o irregulares de color café en el centro, produciendo una necrosis extensiva en haz y en el envés, generalmente en los bordes de las hojas, con halos cloróticos frecuentemente alrededor de las lesiones. Los síntomas más frecuentes son observados en hojas, sin embargo también afecta a tallos y frutos. Es una especie cosmopolita, especialmente abundante en trópicos, puede atacar a más de 530 especies vegetales pertenecientes a 380 géneros. Entre sus hospederos se encuentran la soya, gramíneas, chile, pepino, tomate, papaya, melón, sandía, sorgo y una gran variedad de cultivos de los trópicos y subtrópicos (Jayasuriya y Thennakoon, 2007; Kurt, 2005; Shimomoto *et al.*, 2008). Los principales fungicidas utilizados para su control son el azoxistrobin, carbendazim, clorotalonil y mancozeb (Diccionario de especialidades agropecuarias, 2004).

1.1.4.4. *Curvularia* sp.

Colonias de color marrón, grises o negras, algodonosas o aterciopeladas. Estroma frecuentemente largo, erecto, negro, cilíndrico y algunas veces ramificado. Conidioforos mononematosos o macronematosos, derechos o curvos, frecuentemente geniculados, algunas veces nodosos y lisos de color marrón. Conidios solitarios, simples y

acropleurógenos, frecuentemente de forma curvada, claviforme, fusiforme, obovoide o piriforme, con 3 o más septas trasversales de color marrón oscuro (Ellis, 1993).

La enfermedad se observa con manchas de color marrón rojizo con clorosis en los bordes, las cuales arruinan y cubren toda la hoja (Kim *et al.*, 2000). El género es causante de manchas foliares en maíz, trigo y en diversas gramíneas. Se presentan con manchas en las hojas ocasionando serios daños (Iken y Amusa, 2004).

1.1.4.5. *Helminthosporium* sp.

Colonias oscuras y pilosas; estromas usualmente presentes, oscuros y frecuentemente largos. Conidióforos mononematosos o macronematosos, no ramificado, derechos o curvos, cilíndricos de color marrón oscuro, algodonosos o verrugoso, con poros pequeños en el ápice y septas laterales. Conidios solitarios, acropleurógenos, de forma obclavada, de color marrón y pseudoseptados (Ellis, 1993).

La enfermedad se puede observar con lesiones en forma manchas circulares de color marrón. En frutos las lesiones pueden ser ovals, acuosas de color verde oliva, con halos cloróticos. Entre sus principales hospederos están *Oryza sativa* L., *Heliconia* L., *Chrysalidocarpus lutescens*, *Solanum tuberosum* y algunas especies son patógenos de *Zea mays* (Cardona y González, 2008; Hofmann, 2009; Jegathambigai *et al.*, 2009).

1.1.4.6. *Mycosphaerella*

Es uno de los más grandes géneros dentro de los ascomicetos, muchas especies son patógenos de importancia agrícola causantes de manchas foliares y chancros. Algunas especies son saprofitas como endófitas, incluyen cerca de 2000 especies que se distinguen por sus hospederos (Crous *et al.*, 2000). Son patógenos de ornamentales, frutales y arboles forestales entre otros (Sivanesan y Shivas, 2002).

1.1.4.6.1. *Mycosphaerella fijiensis* Morelet

Mycosphaerella fijiensis Morelet (anamorfo: *Paracercospora fijiensis* (Morelet) Deighton) durante su ciclo biológico produce dos tipos de fructificaciones: conidios en esporodoquios durante la fase asexual o imperfecta y ascosporas provenientes de ascas producidas en peritecios durante la fase sexual o perfecta (Vázquez *et al.*, 2005). Los conidios y ascosporas constituyen una de las principales formas de propagación del fitopatógeno, los cuales pueden diseminarse con la lluvia, el rocío de agua, el hombre y por el viento (Marín *et al.*, 2003). Los conidios son hialinos miden de 17–114 µm de largo por 1–8 µm de ancho, rectos o ligeramente curvos, presentan de 6–9 septos, son

delgados en el ápice y más anchos en la base. Los conidióforos están solitarios, curvados presentando de 3–5 septas con un largo de 14–230 μm y 17–114 μm de ancho. Por otra parte, en su fase asexual las ascas son estructuras oblongas, que contienen ocho esporas llamadas ascosporas, las cuales son hialinas, fusiformes, poseen un septo y una ligera constricción a nivel del mismo (Meredith y Lawrence, 1969).

Es el causante de la Sigatoka negra o raya negra de la hoja en banano y plátano, causando pérdidas económicas importantes en todo el mundo (Sepúlveda *et al.*, 2009). Esta enfermedad daña a las hojas del banano ocasionando numerosas manchas cloróticas y necróticas que destruyen el área foliar, afectando por lo tanto, el proceso fotosintético de la planta y su desarrollo fisiológico, además de acelerar el procesos de maduración de la fruta, lo que genera grandes pérdidas económicas en la fase de comercialización (Marín *et al.*, 2003). De acuerdo a Fouré (1985), se han identificado seis estadios de progreso de los síntomas de la enfermedad; los síntomas aparecen a los 7, 14 o 22 días después de la infección. Entre los fungicidas utilizados para el control de la sigatoka negra se encuentran el azoxystrobin, bitertanol, bromuconazol, clorotalonil, dietilditiocarbamato, propiconazol y tridemorf (Martínez-Bolaños *et al.*, 2012, FRAC, 2012).

1.1.5. Estrategias reproductivas en plantas

En plantas existen dos tipos de reproducción: sexual y asexual.

La reproducción sexual implica la unión de los gametos que conlleva a la segregación y recombinación de las características parentales. Una de las ventajas de la reproducción sexual es que produce un aumento en la variación genética y el avance evolutivo de la especie (Richards, 1997).

La reproducción asexual se produce por procesos mitóticos en las células, que pueden desarrollar individuos sin la fusión de los gametos, de tal manera que no se forman genotipos nuevos. La reproducción asexual presenta dos modalidades, la agamospermia y la propagación vegetativa (Richards, 1997).

La agamospermia definida como la producción de semillas fértiles sin la fusión entre los gametos (Richards, 1997) puede ocurrir por tres vías: cuando un embrión adventicio se desarrolla directamente de una célula esporofítica fuera del saco embrionario; cuando la célula madre de la megaspora pasa por alto o no completa la meiosis y se divide para formar un saco embrionario sin reducción cromosómica, o cuando el saco embrionario

sin reducción cromosómica se desarrolla de una célula esporfítica que se diferencia a partir de la nucela (Spielman *et al.*, 2003; Estrada-Luna *et al.*, 2002).

La propagación vegetativa consiste en la formación de nuevos individuos (llamados ramets) a partir de un meristemo (estolones, bulbos, rizomas, raíces, etc) o por la fragmentación de las partes de la planta progenitora (esquejes). Todos los individuos originados a partir de la propagación vegetativa poseen el mismo genotipo, también llamados clones, que en su conjunto conforman un genotipo (Hudson *et al.*, 1997).

En el género *Acalypha* se ha documentado la propagación vegetativa por esquejes utilizando diferentes sustratos orgánicos (Baratta y Magalhães, 2010; Da Silva *et al.*, 2006). Baratta y Magalhães (2010) evaluaron diferentes sustratos tanto orgánicos como comerciales en *Acalypha amentacea* sobre el peso seco de raíces y el peso seco de la parte aérea. Da Silva *et al.* (2006), observó que los sustratos con fibra de coco presentaron mayor enraizamiento en *Acalypha wilkesiana*. Sin embargo, en ningún caso se observó diferencias significativas entre los diferentes sustratos. Por lo tanto, se deduce que el sustrato no es un factor de importancia en el enraizamiento en el género de *Acalypha*.

Existen reportes que indican que el tipo de esquejes es otro factor de importancia en los procesos de propagación, ya que los esquejes leñosos tienen menor enraizamiento que los esquejes semileñosos (De Aguiar *et al.*, 2005; Betanin y Nienow, 2010). Tavares *et al.* (1995) indicó que los esquejes con menor grado de lignificación responden mejor al enraizamiento.

De igual forma, la aplicación exógena de reguladores de crecimiento es una de las técnicas más utilizadas para aumentar el porcentaje de enraizamiento. Entre estos reguladores se encuentran las auxinas, las cuales proporcionan mayor porcentaje, velocidad, calidad y uniformidad de enraizamiento (De Aguiar *et al.*, 2005; Hudson *et al.*, 1997).

1.1.5.1. Auxinas como reguladores de crecimiento en las plantas

El crecimiento y desarrollo en las plantas es estimulado por varios reguladores de crecimiento, también llamados hormonas de plantas o fitohormonas. Este grupo incluye a las auxinas, giberelinas, ácido abscísico, etileno, brasinoesteroides y el ácido jasmonico (Gray, 2004).

Las auxinas juegan un papel importante en la vida de las plantas ya que influyen en la división celular, elongación celular y diferenciación celular y tienen gran impacto en la

formación de raíz en estacas o esquejes en plantas superiores (Hudson *et al.*, 1997; Ljung, 2013). En 1983 se identificó la primera auxina de origen natural, conocida como ácido indol-3-acético (AIA). Subsecuentemente, en 1935, se demostró que los ácidos indolbutírico (AIB) y naftalenacético (NAA) de origen sintético, eran aún más efectivos para fomentar el crecimiento de raíces, cambiando la historia de la propagación en las plantas. Actualmente la auxina AIB es la más utilizada en la propagación vegetativa, principalmente porque no es tóxica en una amplia gama de concentraciones, y es efectiva para un gran número de especies. Asimismo, es una sustancia fotoestable, de acción localizada y menos sensible a la degradación biológica en comparación a las demás auxinas sintéticas (Fachinello *et al.*, 1995).

Por mencionar algunos ejemplos, De Aguiar *et al.* (2005) reportaron un aumento en el enraizamiento de los esquejes de *Prunus persica* cuando se aplicó la auxina AIB a una concentración de 2000 mg/L. Asimismo, se registró un aumento en el enraizamiento en *Physalis peruviana* con la aplicación de 600 y 800 mg/L de AIB (Moreno *et al.*, 2009).

1.1.6. Impacto de los factores ambientales en el metabolismo secundario en plantas

Las plantas al interactuar constantemente con las condiciones ambientales por ser organismos que carecen de movilidad producen una gran variedad de metabolitos secundarios que les permiten adaptarse y sobrevivir a los cambios de su entorno (Ncube *et al.*, 2012). Por lo tanto, los metabolitos secundarios representan una interface química entre las plantas y el ambiente, cuya síntesis es frecuentemente influenciada por diversos factores ambientales (Chaves *et al.*, 2013). Entre estos factores se puede mencionar a los climáticos como temperatura, luz, humedad, el índice pluviométrico y el ozono (Cuadro 1.4) (Ncube *et al.*, 2012).

Cuadro 1.4. Algunos factores ambientales que influyen en el metabolismo secundario en plantas (Ncube *et al.*, 2012).

Factores ambientales	Especies de plantas	Metabolitos secundarios
Luz / radiación solar	<i>Betula</i> spp., <i>Pinus taeda</i> , <i>Salix myrsinifolia</i> , <i>Arabidopsis thaliana</i> , <i>Secale cereal</i> , <i>Artemisia annua</i> , <i>Sambucus nigra</i> , <i>Comus sanguinea</i> , <i>Prunus serotina</i> , <i>Frangula alnus</i> , <i>Corylus avellana</i> , <i>Pteridium arachnoideum</i> , <i>Solanum tuberosum</i> , <i>Diplacus</i> spp. y <i>Marchantia polymorpha</i>	Terpenoides, alcaloides, flavonoides, flavonoles, glicosilados, ácido hidroxicinámico, taninos, artemisinina, ácidos fenólicos, fitosteroles; glicoalcaloides, luteolina y apigenina
Humedad	<i>Pteridium arachnoideum</i> , <i>Artemisia annua</i> , <i>Pachypodium saundersii</i> y <i>Achnatherum inebrians</i>	Compuestos fenólicos, resinas lipofílicas, artemisinina, taninos, isoprenos, antocianinas y alcaloides
Temperatura	<i>Arnica montana</i> , <i>Hypericum perforatum</i> , <i>Achnatherum inebrians</i> , <i>Quercus</i> spp., <i>Pachypodium saundersii</i> y <i>Petunia hybrida</i>	Compuestos fenólicos, antocianinas, alcaloides, flavonoides y taninos
Ozono	<i>Pinus taeda</i> , <i>Ginkgo biloba</i> , <i>Betula pendula</i> y <i>Petroselinum crispum</i>	Taninos, ácidos fenólicos, compuestos fenólicos

La radiación solar es uno de los factores más importantes, ya que es vital para el crecimiento y desarrollo de las plantas. Pero, la exposición prolongada a elevadas dosis de radiación UV causa graves daños en ellas. Los derivados de fenilpropanoides son uno de los metabolitos secundarios implicados en la resistencia a la radiación UV. Entre estos se incluyen ácidos hidroxicinamidas, flavonoides, lignanos poliméricos y taninos (Laakso *et al.*, 2000; Lavola *et al.*, 1997; Winkel-Shirley, 2002). Hrazdina (1992), reportó una alta acumulación de antocianinas y flavonoles glicosilados en las hojas de *Pisum sativum* cv. *argenteum* cuando se expusieron directamente a la radiación UV.

El estrés por temperatura generalmente induce la producción de especies reactivas de oxígeno causando múltiples cambios fisiológicos, bioquímicos y moleculares en el metabolismo de las plantas, sobre todo se observa un incremento en una gran variedad de compuestos volátiles al aumentar la temperatura (Ncube *et al.*, 2012; Sharkey y Loreto, 1993; Sharkey e Yeh, 2001). El estrés por bajas temperaturas en invierno puede estimular la producción de compuestos fenólicos como antocianinas (Christie *et al.*, 1994; Ncube *et al.*, 2011).

Los eventos de sequía y disponibilidad de agua (humedad) son factores que influyen de manera directa en la sobrevivencia, ya que se reduce la fotosíntesis en la planta. Se ha reportado el aumento en la producción de compuestos fenólicos en plantas cuando existe una reducción en la disponibilidad de agua y altas temperaturas (Alonso-Amelot *et al.*, 2007; Glynn *et al.*, 2004). Ncube *et al.* (2011) reportaron un aumento en la producción de compuestos fenólicos en todas las especies estudiadas durante el invierno, cuando se expuso a un estrés por humedad o agua.

Otros factores son la altitud, las condiciones edáficas, los nutrientes en el suelo, la variación estacional y el ritmo circadiano (Figura 1.3) (Gobbo-Neto y Lopes, 2007; Lago *et al.*, 2009; Ncube *et al.*, 2012). Asimismo, la variabilidad genética, el ciclo fenológico y los factores bióticos como el ataque de patógenos y la herbivoría son de gran importancia al momento de realizar la colecta de la planta (Elgorashi *et al.*, 2002; Gobbo-Neto y Lopes, 2007).

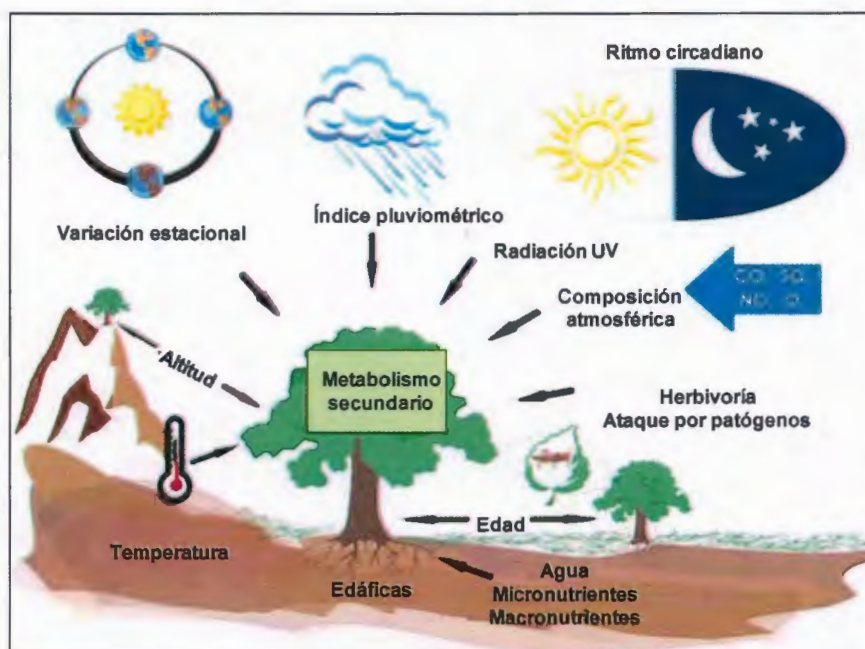


Figura 1.3. Factores principales que pueden influir en el contenido de metabolitos secundarios en plantas (Gobbo-Neto y Lopes, 2007).

Las plantas usadas en estudios fitoquímicos son generalmente colectadas en sus poblaciones silvestres, sin tomar en cuenta los factores bióticos y abióticos. Por lo que la calidad de los metabolitos secundarios es determinada por la disponibilidad natural de los mismos. Sin embargo, para asegurar la síntesis de los principios activos es

necesario conocer cuales son los que influyen en la producción de los metabolitos de interés, donde la manipulación de estos puede guiar a incrementar la producción de metabolitos bioactivos en muchas plantas (Ncube *et al.*, 2012).

1.2. JUSTIFICACIÓN

Los hongos fitopatógenos constituyen una de las principales limitantes en la agricultura, ocasionando pérdidas económicas en muchos cultivos de importancia agrícola. El principal método utilizado para su control es el uso de fungicidas de origen sintético. Sin embargo, estos causan graves problemas de contaminación ambiental y toxicidad a mamíferos. Una alternativa a esta problemática es la búsqueda de productos naturales más amigables con el ambiente. Las plantas producen una gran variedad de metabolitos secundarios para defenderse, los cuales generalmente contienen compuestos ricos en carbono, hidrógeno y oxígeno y nulos halógenados, por lo tanto, son menos persistentes e inocuos que los productos sintéticos utilizados en la agricultura.

Acalypha gaumeri es una planta endémica de la península de Yucatán cuyo extracto etanólico ha demostrado importantes actividades antifúngicas contra fitopatógenos. Dichas características, la hacen candidata a ser estudiada fitoquímica y biológicamente contra diversos fitopatógenos. Esta especie se encuentra ubicada en diferentes zonas de la península, por lo tanto, es importante determinar si las condiciones climáticas, edáficas y la época del año en que se colectan las plantas (sequía, lluvia e inicio de sequía) influyen en el metabolismo secundario y por lo tanto, en la actividad antifúngica. Adicionalmente, la raíz es la parte de la planta que presenta esta propiedad biológica, por lo tanto, es importante plantear estrategias de propagación de la especie tanto por semilla como por esqueje (mediante el uso reguladores de crecimiento en la propagación por esqueje), con el propósito de la conservación y uso sostenible de este recurso.

1.3. OBJETIVOS

1.3.1. Objetivo general

Validar las propiedades antifúngicas del extracto etanólico de la raíz de *Acalypha gaumeri* obtenido bajo condiciones naturales de crecimiento y evaluar sus posibilidades de propagación a nivel vivero.

1.3.2. Objetivo específicos

1. Evaluar el espectro de acción del extracto etanólico de la raíz de *Acalypha gaumeri* contra diferentes géneros taxonómicos de hongos fitopatógenos.
2. Aislar los principios fungicidas de *Acalypha gaumeri* mediante una purificación biodirigida empleando diversas técnicas de purificación cromatográfica.
3. Analizar las propiedades fungicidas de los extractos etanólicos de la raíz de *Acalypha gaumeri*, de tres poblaciones con condiciones climáticas y edáficas diferentes durante la época de sequía, lluvia e inicio de sequía contra tres fitopatógenos.
4. Determinar la variación cualitativa de dos metabolitos antifúngicos del extracto etanólico de *Acalypha gaumeri* colectada en las tres poblaciones durante la época de sequía, lluvia e inicio de sequía
5. Evaluar las posibilidades de propagación de *A. gaumeri* mediante semillas o esquejes a nivel vivero.

1.4. HIPOTESIS

1. El extracto etanólico de la raíz de *Acalypha gaumeri* posee metabolitos secundarios que inhiben el crecimiento de hongos fitopatógenos, sin embargo, esta actividad antifúngica y el perfil químico de dicho extracto varía con el sitio y época en que se colecta la planta.
2. La propagación de *Acalypha gaumeri* es altamente viable por semilla, y por esqueje cuando se aplica ácido indolbutírico en las partes basal y media de la planta.

1.5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

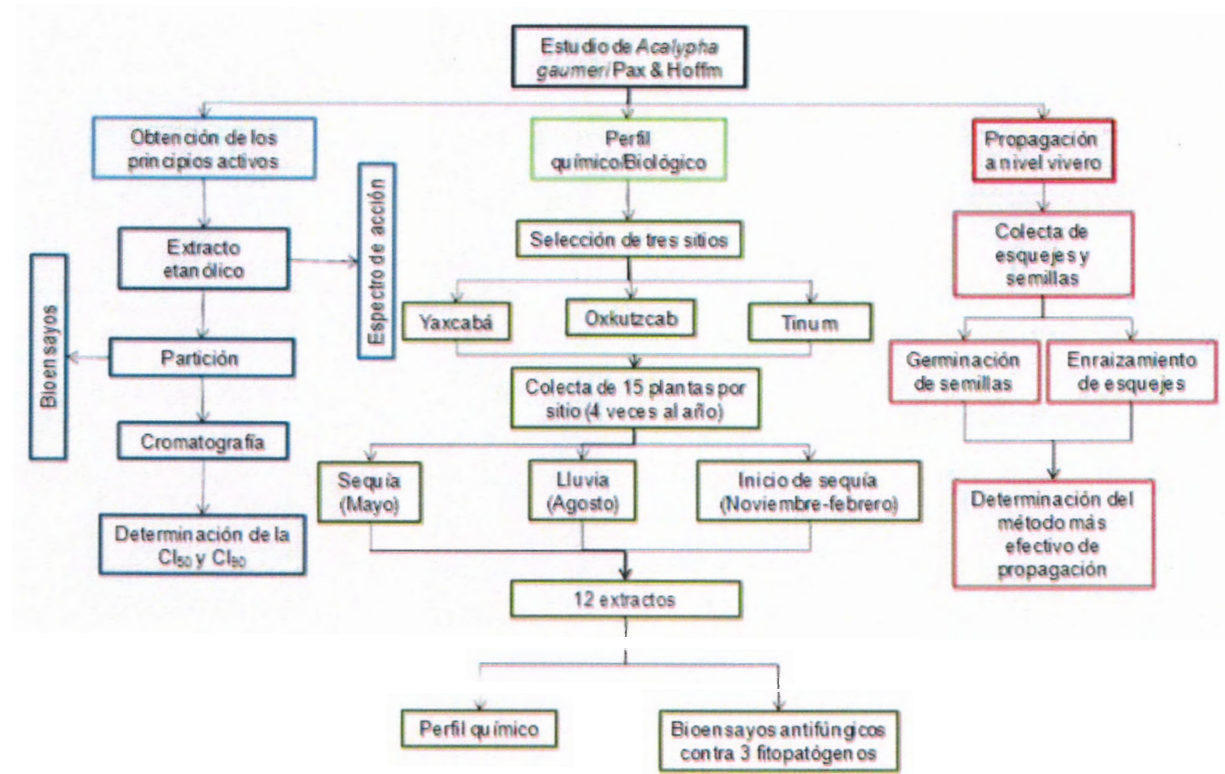


Figura 1.4. Diagrama general a seguir con las raíces de *Acalypha gaumeri* Pax & Hoffm.

1.6. BIBLIOGRAFÍA

- Aba, A.A. (2005). Antifungal activity of some extracts against some plant pathogenic fungi. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 8(3), 413 – 417.
- Acosta, M. (2002). La antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz.) del mango (*Mangifera indica* L) cv. Haden, patogenicidad, control químico, manejo y epidemiología. Tesis de doctorado. Colegio de posgraduados. 79 p.
- Adaskaveg, J.E. y H. Förster (2000). Occurrence and management of anthracnose epidemics caused by *Colletotrichum* species on tree fruit crops in California. In: *Colletotrichum. Host Specificity Pathology and Host-Pathogen Interaction* (eds. D. Prusky, S. Freeman and M.B. Dickman). APS Press, St Paul, Minnesota: pp 317-336.
- Adesina, S.K., O. Idowu, A.O. Ogundaini, H. Oladimeji, T.A. Olugbade, G.O. Onawunmi y M. Pais, (2000). Antimicrobial constituents of the leaves of *Acalypha wilkesiana* and *Acalypha hispida*. *Phytotherapy Research*, 14(8), 371 – 374.
- Afanador-Kafari, L., D. Minz, M. Maymon y S. Freeman (2003). Characterization of *Colletotrichum* isolates from tamarillo, Passiflora and mango in Colombia and identification of a unique species from the genus. *Phytopathology*, 93, 579 – 587.
- Akinde, B.E. (1986). Phytochemical and microbiological evaluation of the oils from the Leaves of *Acalypha wilkesiana*. In: Sofowora A, editor. *The State of Medicinal Plant Research in Nigeria*. University of Ibadan Press, Nigeria. pp. 362 – 363.
- Akinyemi, K., O. Oladapo, C. Okwara, C. Ibe y K. Fasura (2005). Screening of crude extracts of six medicinal plants used in South-West Nigerian unorthodox medicine for anti-methicillin resistant *Staphylococcus aureus* activity. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 5, 6 – 8.
- Akinyemi, K.O., O.K. Oluwa y E.O. Omomigbehin (2006). Antimicrobial activity of crude extracts of three medicinal plants used in south-west nigerian folk medicine on some food borne bacterial pathogens. *African Journal Traditional, Complementary and Alternative Medicine*, 3 (4), 13 – 22.
- Alade, P.I. y O.N. Irobi (1993). Antimicrobial activities of crude leaf extracts of *Acalypha wilkesiana*. *Journal of Ethnopharmacology*, 39(3), 171 – 174.
- Alonso-Amelot, M.E., A. Oliveros-Bastidas y M.P. Calcagno-Pisarelli (2007). Phenolics and condensed tannins of high altitude *Pteridium arachnoideum* in relation to

- sunlight exposure, elevation and rain regime. *Biochemical Systematics and Ecology*, 35, 1 – 10.
- Amakura, Y., M. Miyake, H. Itoh, A. Murakaku, Y. Itoh, C.F. Lu, L.L. Yang, K.Y. Yen, T. Okuda y T. Yoshida (1999). Tannins and related polyphenols of euphorbiaceous plants- Part 16-Acalyphidins M-1,M-2 and D-1, ellagitannis from *Acalypha hispida*. *Phytochemistry*, 50 (4), 667 – 675.
- Andrews, J. (2001). Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48, 5 – 16.
- Arellano, J., J. Flores, J. Tún y M. Cruz (2003). Etnoflora yucatanense Nomenclatura, forma de vida, uso, manejo y distribución de las especies vegetales de la Península de Yucatán: CONACYT, UADY, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia; Fascículo 20. 87 p.
- Bagavan, A., A.A. Rahuman, C. Kamaraj y K. Geetha (2008). Larvicidal activity of saponin from *Achyranthes aspera* against *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Parasitology Research*, 103, 223 – 229.
- Bajpai, V.K. y S.C. Kang (2010). Antifungal Activity of Leaf Essential Oil and Extract of *Metasequoia glyptostroboides* Miki ex Hu. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 87, 327 – 336.
- Baratta, J. A. P. y L. S. Magalhães (2010). Produção de mudas por estaquia, de Acalifa e tumbérgia, utilizando compostagem, preparada a partir de resíduos da poda da arborização urbana. *REVSBAU*, Piracicaba, 5(3), 113 – 148.
- Barrera-Necha, L. y S., Bautista-Baños (2002). Influence of Leaf, Fruit and Seed powders and extracts of *Pithecellobium dulce* (Roxb) Benth. (Fabaceae) on the in vitro vegetative growth of seven postharvest Fungi. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 20, 66 – 71.
- Becerra, L.E.N. (1997). Enfermedades del papayo (*Carica papaya* L.) En: Simposio de plagas de cultivos tropicales. Cecilio Mendoza Z. (ed). Departamento de Parasitología Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo. Texcoco, México. pp. 149-157.
- Betanin, L. y A.A. Nienow (2010). Vegetative propagation of the Brazilian coral (*Erythrina falcata* Benth.) by stem and foliar cutting. *Ciencias Agrárias*, Londrina, 31(4), 871 – 880.

- Cabrera, M.G., R.E. Alvarez, N.T. Sosa de Castro y L.A. Sosa (2004). Pátogenos de *Chrysanthemum* sp. en cultivos de Corrientes y Chaco, Argentina. Universidad Nacional del Nordeste. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas. Resumen A028.
- Camargo, S., V. García y R. Muciño (2000). ¿Qué es la Fitopatología? Hongos entomopatógenos del crisantemo [*Dendranthema morifolium* (Ramat.) Tzvelev], un estudio de caso. Departamento de Biología, Div. C. B. S. U A M-I.
- Canales, M.M., D.T. Hernández, M.M. Rodríguez, H.J. Ramírez, O.N. Trejo, P.R. Serrano, A.G. Avila y B.A. García (2008). Efecto antimicrobiano de *Acalypha* hederacea. Revista Latinoamericana de Química. Suplemento especial. Quinta Reunión Nacional de Investigación en productos Naturales, Guadalajara, Jalisco. 90 p.
- Cardiel, J.M. (1994). Revisión taxonómica del género *Acalypha* L. (Euphorbiaceae) en Colombia. Tesis para obtener el grado de doctor en Biología Vegetal. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Ciencias Biológicas. 245 p.
- Cardona, R. y M.S. González (2008). Caracterización y patogenicidad de hongos del complejo *Helminthosporium* asociados al cultivo del arroz en Venezuela. *Bioagro*, 20(2), 141 – 145.
- Carvalho, F.M.S., R.P., Leite Junior y B. Ueno (2000). Pathogenic characterization of *Colletotrichum* spp. associated with apple diseases in southern Brazil. *Fitopatologia Brasileira*, 25, 72 – 78.
- Chaves, T.P., C.P. Santana, G. Vêras, D.O. Brandão, D.C. Felismino, A.C.D. Medeiros y D.M.B.M. Trovão (2013). Seasonal variation in the production of secondary metabolites and antimicrobial activity of two plant species used in Brazilian traditional medicine. *African Journal of Biotechnology*, 12(8), 847 – 853.
- Christie, R.J., M.R. Alfenito y V. Walbot (1994). Impact of low temperature stress on general phenylpropanoid and anthocyanin pathways: enhancement of transcript abundance and anthocyanin pigmentation in maize seedlings. *Planta*, 194, 541 – 549.
- Copping, L.G. y S.O. Duke (2007). Natural products that have been used commercially as crop protection agents. *Pest Management Science*, 63, 524 – 554.

- Cristóbal-Alejo, J., J.M. Tun-Suarez, S. Moguer-Catzin, N. Marbán-Mendoza, L. Medina-Baizabal, P. Simá-Polanco, S.R. Peraza-Sánchez y M.M. Angulo-Gamboa (2006). In vitro sensitivity of *Meloidogyne incognita* to extracts from natives yucatecan plants. *Nematropica*, 36(1), 89 – 97.
- Crous, P.W., A. Aptroot, K. King-Chuan, U. Braun y M.J. Wingfield (2000). The genus *Mycosphaerella* and its anamorphs. *Studies in Mycology*, 45, 107 – 121.
- Cruz-Estrada, A., M. Gamboa-Angulo, R. Borges-Argáez y E. Ruiz-Sánchez (2013). Insecticidal effects of plant extracts on immature whitefly *Bemisia tabaci* Genn. (Hemiptera: Aleyroideae). *Electronic Journal of Biotechnology*, DOI: 10.2225/vol16-issue1-fulltext-6.
- Da Silva, C. S., M. C. Alves y R. M. Monteiro (2006). Avaliação de substrato no enraizamento de estacas de acalifa (*Acalypha wilkesiana*). *Revista Biociencia Taubate*, 12, 8 – 15.
- Dayan F.E., C.L. Cantrell y S.O. Duke (2009). Natural products in crop protection. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 17, 4022 – 4034.
- De Aguiar, R.S, C.E. Dos Santos, C. Zietemann, A.M. De Assis, V. Junqueira de Moraes, S.R. Ruffo (2005). Enraizamiento de estacas semilenhosas do pessegueiro “Okinawa” submetidas a diferentes dosagens de ácido indolbutírico. *Acta Scientiarum Biological Sciences*, 27(3), 461 – 466.
- Diccionario de especialidades agroquímicas (2004). Edición 14, México. Thomson, PLM.
- Duraipandiyan, V., M. Ayyanar y S. Ignacimuthu (2006). Antimicrobial activity of some ethnomedicinal plants used by Paliyar tribe from Tamil Nadu, India. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 6(35), 1 – 7.
- Durga, R.K., S. Karthikumar y K. Jegatheesan (2010). Isolation of potential antibacterial and antioxidant compounds from *Acalypha indica* and *Ocimum basilicum*. *African Journal of plant Science*, 4(5), 163 – 166.
- Ejechi, B.O. (2001). Wood biodeterioration control potential of *Acalypha hispida* leaf phenolic extract in combination with *Trichoderma viride* culture filtrate. *World Journal of Microbiology and biotechnology*, 17, 561 – 565.
- Elgorashi, E.E., S.E. Drewes y J.V. Staden (2002). Organ-toorgan and seasonal variation in alkaloids from *Crinum macowanii*. *Fitoterapia*, 73, 490 – 495.

- Ellis, M.B. (1993). Dematiaceous Hyphomycetes. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England. CAB INTERNATIONAL. 465 p
- Estrada-Luna, A. A., W. Huanca-Mamani, G. Acosta-gracia, G. León-Martínez, A. Becerra-Flora, R. Pérez-Ruiz y J.P. Vielle-Calzada (2002). Beyond promiscuity: from sexuality to apomixis in flowering plants. *In vitro cellular and developmental Biology-plant*. 38, 146 – 151.
- Ezekiel, C.N., C.P. Anokwuru, E. Nsofor, O.A. Odusanya y O. Adebajo (2009). Antimicrobial activity of the methanolic and crude alkaloid extracts of *Acalypha wilkesiana* cv. Macafeeana copper leaf. *Research Journal of Microbiology*, 4 (7), 269 – 277.
- Fachinello, J. C., A. Hoffmann, J. C. Nachtigal, E. Kersten y G. R. Fortes (1995). *Propagacao de plantas frutiferas de clima temperado*. 2a ed. Ufpel, Pelotas, Brasil.
- Farr, D.F., M.C. Aime, A.Y. Rossman y M.E., Palm (2006). Species of *Colletotrichum* on Agavaceae. *Mycological Research*, 110, 1395 – 1408.
- Fouré, E. (1985). Black leaf streak disease of bananas and plantains (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) study of the symptoms and satages of the disease in Gabon. IRFA, Paris, Frace.
- Freeman, S., D. Minz, E. Jurkevitch, M. Maymon y E. Shabi (2000). Molecular analyses of *Colletotrichum* species from almond and other fruits. *Phytopathology*, 90, 608 – 614.
- Fungicide resistance Action Committee, (2010). Summary of FRAC guidelines for banana in 2012 online. Disponible en: <http://www.frac.info/frac/index.htm> [Consulta 20 de marzo de 2012].
- Gamboa-Angulo, M., J. Cristóbal-Alejo, I.L. Medina-Baizabal, F. Chi-Romero, R. Méndez-González, P. Sima-Polanco y F. May-Pat (2008). Antigungal properties of selected plants from the Yucatán peninsula, Mexico. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24, 1955 – 1959.
- Glynn, C., A.C. Ronnberg-Wastljung, R. Julkunen-Tiitto y M. Weih (2004). Willow genotype, but not drought treatment, affects foliar phenolic concentrations and leaf-beetle resistance. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 113, 1 – 14.

- Gobbo-Neto, L. y N.P. Lopes (2007). Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Química Nova*, 30(2), 374 – 381.
- Gopalakrishnan, S., K Saroja y D.E. Jeyaseelan (2010). Chemical investigation of aerial parts of *Acalypha fruticosa* forssk. *Der Pharma Chemica*, 2(5), 383 – 389.
- Gotep, J.G., G.O.A. Agada, D.S. Gbise y S. Chollom (2010). Antibacterial activity of ethanolic extract of *Acalypha wilkesiana* leaves growing in Jos, Plateau State, Nigeria. *Malaysian Journal of Microbiology*, 6(2), 69 – 74.
- Govaerts, R., D.G. Frodin y A. Radcliffe-Smith (2000). World Checklist and Bibliography of Euphorbiaceae (with Pandaceae). Richmond, Surrey: Royal Botanic Gardens, Kew. 320 p.
- Govindarajan M, A. Jebanesan, D. Reetha, R. Amsath, T. Pushpanathan y K. Samidurai (2008). Antibacterial activity of *Acalypha indica* L. *European Review for Medical Pharmacological Sciences*, 12(5), 299 – 302.
- Govindarajan, M., A. Jebanesan, T. Pushpanathan y K. Samidurai (2008). Studies on effect of *Acalypha indica* L. (Euphorbiaceae) leaf extracts on the malarial vector, *Anopheles stephensi* Liston (Diptera: Culicidae). *Parasitology Research*, 103, 691 – 695.
- Gray, M.W. (2004). Hormonal regulation of plant growth and development. *Plos Biology*, 2(9), 1270 – 1273.
- Gutierrez-Lugo, M.T., M.P. Sigh, W.M. Maiese y B.N. Timmermann (2002). New antimicrobial cycloartane triterpenes from *Acalypha communis*. *Journal of Natural Products*, 65(6), 872 – 875.
- Hadacek, F. y H. Greger (2000). Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice. *Phytochemical Analysis*, 11, 137 – 147.
- Hiremath, S.P., K. Rudresh y S. Badami (1998). Flavonoids of *Acalypha indica* Linn. *Indian Journal of Heterocyclic Chemistry*, 8(2), 163 – 164.
- Hofmann, L. M. (2009). La sarna plateada (*Helminthosporium solani* Dur. & Mont.), una enfermedad de creciente importancia en papa. *Agronomía mesoamericana*, 20(2), 417 – 431.

- Hrazdina, G. (1992). Compartmentation in aromatic metabolism. In: Stafford, H.E., Ibrahim, R.K. (Eds.), Phenolic Metabolism in Plants. Plenum Press, New York.
- Hudson, T. H., D.E. Kester, F.T. Davies y R.L. Geneve (1997). Plant propagation: principles and practices. 6th Ed. Prentice-Hall, Inc. Upper Saddle River, New Jersey, U.S.A. 770 p.
- Hungeling, M., M. Lechtenberg, F.R. Fronczek y A. Nahrstedt (2009). Cyanogenic and non-cyanogenic pyridone glucosides from *Acalypha indica* (Euphorbiaceae). *Phytochemistry*, 70, 270 – 277.
- Hyde, K.D., L. Cai, P.F. Cannon, J.A. Crouch, P.W. Crous, U. Damm, P.H. Goodwin, H. Chen, P.R. Johnston, E.B.G. Jones, Z.Y. Liu, E.H.C. McKenzie, J. Moriwaki, P. Noireung, S.R. Pennycook, L.H. Pfenning, H., Prihastuti, T. Sato, R.G. Shivas, Y.P., Tan, P.W.J. Taylor, B.S. Weir, Y.L. Yang y J.Z. Zhang (2009). *Colletotrichum* –names in current use. *Fungal Diversity*, 39, 147 – 182.
- Iken, J.E. y N.A. Amusa (2004). Maize research and production in Nigeria. *African Journal of Biotechnology*, 3(6), 302 – 307.
- Ikewuchi, J.C. y A. Anyadiegwu (2008). Effect of *Acalypha wilkesiana* Muell Arg on plasma sodium and potassium concentration of normal rabbits. *Pakistan Journal of Nutrition*, 7(1), 130 – 132.
- Inagaki, H., A. Yamaguchi K. Ikato, C. Kageyama, H. Iyozumi y Y. Oki (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.
- Jayasuriya, K.E. y B.I. Thennakoon (2007). First report of *Corynespora cassiicola* on *Codiaeum variegatum* (croton) in sri lanka. *Ceylon Journal of Science*, 36 (2), 138 – 141.
- Jebakumar, R.D.S., S. Kallidass y J. Vimalan (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.
- Jegathambigai, V., R.S.W. Wijeratnam y R.L.C Wijesundera (2009). *Trichoderma* as a seed treatment to control *Helminthosporium* leaf spot disease of *Chrysalidocarpus lutescens*. *World Journal of Agricultural Sciences* 5 (6): 720-

728. Kim, J.K., G.J. Choi y H.T. Kim (2000). Pathogenicity and Pyrenocine Production of *Curvularia inaequalis* Isolated from *Zoysia* Grass. *Plant Disease*, 84(6), 684 – 688.
- Kumar, S., R. Singh, D.K. Gond y D.C. Saini (2012). Two new species of *Corynespora* from Uttar Pradesh, India. *Mycosphere*, 3(5), 864 – 869.
- Kurt, S. (2005). Genetic variation in *Corynespora cassiicola*, the target leaf spot pathogen. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 8(4), 618 – 621.
- Laakso, K., J.H. Sullivan y S. Huttunen (2000). The effects of UV-B radiation on epidermal anatomy in loblolly pine (*Pinus taeda* L.) and Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). *Plant, Cell and Environment*, 23, 461 – 472.
- Lago, J.H.G., O. A. Fávero y P. Romoff (2009). Chemical composition and seasonal variation of the volatile oils from leaves of *Michelia champaca* L., Magnoliaceae. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 19(4), 880 – 882.
- Lavola, A., R. Julkunen-Tiitto, P. Aphalo, T. de la Rosa y T. Lehto (1997). The effect of UV-B radiation on UV-absorbing secondary metabolites in birch seedlings grown under simulated forest soil conditions. *New Phytologist*, 137, 617 – 621.
- Lingathurai, S., S.E. Vendan, M.G. Paulraj y S. Ignacimuthu (2011). Antifeedant and larvicidal activities of *Acalypha fruticosa* Forssk. (Euphorbiaceae) against *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Yponomeutidae) larvae. *Journal of King Saud University*, 23, 11– 16.
- Ljung, K. (2013). Auxin metabolism and homeostasis during plant development. *Development*, 140, 943 – 950.
- Ma, Y.T., J.I. Chiang, J.H. Lin y F.L. Hsu (1997). Phenolics from *Acalypha indica*. *Journal of the Chinese Chemical Society*, 44 (5), 449 – 502.
- Marín, D., R. Romero, M. Guzmán y T. Sutton (2003) Black Sigatoka: an increasing threat to banana cultivation. *Plant Disease*, 87, 208 – 222.
- Martínez-Bolaños, L., D. Téliz-Ortiz, J.C., Rodríguez-Maciel, J.A. Mora-Aguilera, D. Nieto-Ángel, J.I. Cortés-Flores, D. Mejía-Sánchez, C. Nava-Díaz y G., Silva-Aguayo (2012). Fungicides resistance on *Mycosphaerella fijiensis* populations of southeastern Mexico. *Agrociencia*, 40: 707 – 717.

- Martínez-Gordillo, M., J. Jiménez-Ramírez, R. Cruz-Durán, E. Juárez-Arriaga, R. García, A. Cervantes y R. Mejía-Hernández (2002). Los géneros de la familia Euphorbiaceae en México. *Serie Botánica*, 73(2), 155 – 281.
- Meredith, D.S. y J.S. Lawrence (1969). Black leaf streak disease of bananas (*Mycosphaerella fijiensis*), symptoms of disease in Hawaii and notes on the conidial state of the causal fungus. *Transactions of the British Mycological Society*, 52(3), 459 – 476.
- Méndez, G.R. (2003). Sensibilidad a bencimidazoles y propiedades fungicidas de plantas nativas de la península de Yucatán en *Colletotrichum gloeosporioides* penz. Tesis de Maestría. Instituto Tecnológico de Conkal. pp. 88-93-61.
- Mignouna, H.D., M.M., Abang, A. Onasanya y R., Asiedu (2002). Identification and application of RAPD markers for anthracnose resistance in water yam (*Dioscorea alata*). *Annals of Applied Biology*, 141, 61 – 66.
- Mohana, D.C. y K.A. Raveesha (2007). Anti-fungal evaluation of some plant extracts against some plant pathogenic field and storage fungi. *Journal of Agricultural Technology*, 4(1), 119 – 137.
- Moreno, N. H., J. G. Álvarez-Herrera, H. E. Balaguera-López y G. Fischer (2009). Asexual propagation of cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.) using different substrates and auxin levels. *Agronomía Colombiana* 27(3), 341-348.
- Mothana, Ramzi A., A. Salah, A.A. Abdo, S. Hasson, M. Faisal, N. Althawab, A. Sama Z. Alaghbari y U. Lindequist (2008). Antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activities and phytochemical screening of some yemeni medicinal plants. *The African Journal of Traditional, Complementary and Alternative medicines*, 28(2), 1 – 8.
- Nahrstedt, A., J.D. Kant y V. Wray (1982). Acalyphin, a cyanogenic glucoside from *Acalypha indica*. *Phytochemistry*, 21, 101 – 105.
- Nahrstedt, A., M. Hungeling y F. Petereit (2005). Flavonoids from *Acalypha indica*. *Fitoterapia*, 77(6), 484 – 486.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. (2002). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing for yeasts. Proposed standard M38-P. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa.

- National Committee for Clinical Laboratory Standards. (2004). Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts. Approved guidance. Document M44-A. Wayne, PA: NCCL.
- Navarrete-Mapen., R.Z. (2010). Efectividad in vitro de los extractos acuosos y etánicos de *Bonellia flammea* contra diez hongos fitopatogenos. Tesis de maestría. Instituto Tecnológico de Conkal, Yucatán. 95 p.
- Ncube, B., J.F. Finnie y J. Van Staden (2011). Seasonal variation in antimicrobial and phytochemical properties of frequently used medicinal bulbous plants from South Africa. *South African Journal of Botany*, 77, 387 – 396.
- Ncube, B., J.F. Finnie y J.V. Staden (2012). Quality from the field: The impact of environmental factors as quality determinants in medicinal plants. *South African Journal of Botany*, 82, 11– 10.
- Niño, J. O.M. Mosquera y Y.M. Correa (2012). Antibacterial and antifungal activities of crude plant extracts from Colombian biodiversity. *Revista de Biología Tropical*, 60(4), 1535 – 1542.
- Nostro, A., M.P. Germanó, V.D. Angelo, A. Marino y M.A. Cannatelli (2000). Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity. *Letters in Applied Microbiology*, 30, 379 – 384.
- Ogundaini, A.O. (2005). From greens into medicine: taking a lead from nature. An inaugural lecture delivered at Oduduwa Hall, Obafemi Awolowo University, Ile-Ife, Nigeria. Inaugural Lecture Series 176. OAU Press Limited, Ile-Ife, Nigeria, pp. 12-15.
- Okigbo, R.N y U.O. Ogbonnaya (2006). Antifungal effects of two tropical plant leaf extracts (*Ocimum gratissimum* and *Aframomum melegueta*) on postharvest yam (*Dioscorea* spp.) rot. *African Journal of Biotechnology*, 5 (9), 727 – 731.
- Oladunmoye, M.K. (2006). Comparative evaluation of antimicrobial activities and phytochemical screening of two varieties of *Acalypha wilkesiana*. *Trends in Applied Sciences Research*, 1, 538 – 541.
- Onocha, P.A. y G.K. Oloyede (2011). Chemical Composition And Free Radical Scavenging activity of leaf essential oils of *Acalypha Torta*. *Advances in Environmental Biology*, 5(9), 2626 – 2630.

- Othman, M., S. Genapathy, P.S. Liew, Q.T. Ch'ng, H.S. Loh, T.J. Khoo, C. Wiat y K.N. Ting (2011). Search for antibacterial agents from Malaysian rainforest and tropical plants. *Natural Product Research*, 25(19), 1857 – 1864.
- Pelegri, P.B., L.R. Farias, A.C. M. Saude, F.T. Costa, C. Bloch Jr, L.P. Silva, A.S. Oliveira, C.E.M. Gomes, M.P. Sales y O.L. Franco (2009). A novel antimicrobial peptide from *Crotalaria pallida* seeds with activity against human and phytopathogens. *Current Microbiology*, 59, 400 – 404.
- Ramos, A.P., M.Z., Talhinas, P.S., Sreenivasaprasad y H. Oliveira (2006). Molecular and morphological characterisation of *Colletotrichum* species involved in citrus anthracnose in Portugal. *Bulletin OILB/SROP* 29: 317-326.
- Rao, V.G. (1969). The Genus *Alternaria*-from India. *Nova Hedwigia*, 17, 219 – 258.
- Reiersen, B., B.T. Kiremire, R. Byamukama y O.M. Andersen (2003). Anthocyanins acylated with gallic acid from chenille plant, *Acalypha hispida*. *Phytochemistry* 64, 867 – 871.
- Reinhard, K. (1924). Paxton and Hoffman 'title includes *Acalypha gaumeri*. *Dioscoreaceae*, 147 (16), 173 – 179.
- Richards, A. J. (1997). *Plant breeding systems*. Chapman and Hall, United Kindom. 529 p.
- Roberts, P.D., K., Pernezny, K.y T.A., Kucharek (2001). Anthracnose caused by *Colletotrichum* sp. on pepper. *Journal of University of Florida/Institute of Food and Agricultural Sciences*. 2001 (Available from: <http://edis.ifas.ufl.edu/PP104>). (Acceso 25/05/2010).
- Rotem, J. (1997). *The Genus Alternaria, Biology, Epidemiology, and Pathogenicity*. Ed. APS Press. Minnesota, USA. 83 p.
- Sathyaseelan, V., V. Baskaran y S. Mohan (2008). Efficacy of some indigenous pesticidal plants against pulse beetle *Callosobruchus chinensis* (L.) on green gram. *Journal of Entomology*, 5(2), 128 – 132.
- Sepúlveda L., L.E. Vásquez, C.I. Paniagua., D. Echeverry, C.A. Hernández, E. Rodríguez, L.F. Restrepo y R. Arango (2009). The presence and spectrum of light influences the in vitro conidia production of *Mycosphaerella fijiensis* causal agent of black Sigatoka. *Australasian Plant Pathology*, 38, 514 – 517.

- Sharkey, T.D. y F. Loreto (1993). Water-stress, temperature, and light effects on the capacity for isoprene emission and photosynthesis of Kudzu leaves. *Oecologia*, 95, 328 – 333.
- Sharkey, T.D. y S.S. Yeh (2001). Isoprene emission from plants. Annual review in plant physiology. *Plant Molecular Biology*, 52, 407 – 436.
- Shenoy, B.D., R. Jeewon, W.H. Lam, D.J. Bhat, P.P. Than, P.W.J. Taylor y K.D. Hyde (2007). Morphomolecular characterisation and epitypification of *Colletotrichum capsici*, causal agent of anthracnose in chilli. *Fungal Diversity*, 27, 197 – 211.
- Shimomoto, Y., R. Adachi, Y. Morita, K. Yano, A. Kiba y Y. Hikichi (2008). *Corynespora* blight of sweet pepper (*Capsicum annum*) caused by *Corynespora cassiicola* (Berk. & Curt) Wei. *Journal of General Plant*, 74, 335 – 337.
- Siems, K., J. Jakupovic, V. Castro y L. Poveda (1996). Constituents of two *Acalypha* species. *Phytochemistry*, 41(3): 851-853.
- Siva, N., S. Ganesan, N. Banumathy y Muthuchelian (2008). Antifungal Effect of Leaf Extract of Some Medicinal Plants Against *Fusarium oxysporum* Causing Wilt Disease of *Solanum melogena* L. *Ethnobotanical Leaflets*, 12, 156 – 163.
- Sivanesan, A. y R.G. Shivas (2002). Studies on *Mycosphaerella* species in Queensland, Australia. *Mycology Research*, 106(3), 355 – 364.
- Sobers, E.K. (1965). *Alternaria chrysanthemi* in Florida. Annual meeting of the Florida State Horticultural Society, 78, 419 – 422.
- Somchit, M.N., R. Abdul Rashid, A. Abdullah, A. Zuraini, Z.A. Zakaria, M.R. Sulaiman, A.K. Arifah y A.R. Mutalib (2010). In vitro antimicrobial activity of leaves of *Acalypha indica* Linn. (Euphorbiaceae). *African Journal of Microbiology Research*, 4(20), 2133 – 2136.
- Spielman, M., R. Vinkenoog y R.J. Scott (2003). Genetic mechanisms of apomixes. *Philosophical Transactions: Biological Sciences*, 358, 1095 – 1103.
- Srivastava, D.K. (2013). Study on hyphomycetes genus *Corynespora crotonicola* causing leaf spot disease from forest flora of north Uttar Pradesh. *Indian Journal of Science*, 2(2), 107 – 108.
- Steinmann, V.W. (2002). Diversidad y endemismo de la familia Euphorbiaceae en México. *Acta Botánica Mexicana*, 61, 61 – 93.

- Suthin, R.T y C.D. John (2009). Effect of bio-control agents and fungicides against *Colletotrichum capsici* causing fruit rot of chilli. *Annals of plant protection sciences*, 17(1), 143 – 145.
- Talapatra, B., S. Goswami, y S.K. Talapatra (1981). Acalyphamide, a new amide and other chemical constituents of *Acalypha indica* Linn. *Indian Journal Chemistry*, 20, 974 – 977.
- Tapia-Tussell, R., A. Quijano-Ramayo, A. Cortes-Velazquez, P. Lappe, A. Larque-Saavedra y D. Perez-Brito (2008). PCR-Based Detection and Characterization of the Fungal Pathogens *Colletotrichum gloeosporioides* and *Colletotrichum capsici* causing Anthracnose in Papaya (*Carica papaya* L.) in the Yucatan Peninsula. *Molecular Biotechnology*, 40, 293 – 298.
- Taufiq-Yap, Y.H., T.H. Peh, G.C.L Ee y M. Rahmani (2000). Chemical investigation of *Acalypha indica* (Euphorbiaceae). *Oriental Journal Chemistry*, 16, 249 – 251.
- Tavares, M.S.W., E. Kersten y F. Siewerdt (1995). Efeitos do ácido indolbutírico e da época de coleta no enraizamiento de estacas de goiabeira (*Psidium guajava* L.). *Science of Agriculture*, Piracicaba, 52(2), 310 – 317.
- Thomma, B.P.H.J. (2003). *Alternaria* spp.: from general saprophyte to specific parasite. *Molecular Plant Pathology*, 4(4), 225–236.
- Tylkowska, K., A. Bagniewska-Zadworna, J. Grabarkiewicz-Szczęśna, D. Szopińska, H. Dorna y E. Zenkteler (2008). Histopathology of *Daucus carota* L. root cells treated with toxic metabolites produced by *Alternaria radicina* and *Alternaria alternata*. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, 50(1), 27 – 34.
- Vargas-Díaz A. A. (2009). Alternativas naturales para el control de *Alternaria chrysanthemi* Simmons & Crosier. Tesis de maestría. Centro de investigación Científica de Yucatán. 120 p.
- Vazquez, R., A. Romero, J. Figuero y D. Munro (2005). Paquete tecnológico para el cultivo del platano. Gobierno del estado de Colima. URL: <http://seder.col.gob.mx/Paquetes/PLATANO.pdf>.
- Villanueva-Couoh, E., M. de los A. Sánchez-Briceño, J. Cristóbal-Alejo, E. Ruiz-Sánchez y J.M. Tún-Suárez (2005) Diagnostico y alternativas de manejo químico de tizon foliar (*Alternaria chrysanthemi* Simmos y Crosier) del crisantemo

- (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.) kitamura en Yucatán, México. Revista Mexicana de Fitopatología, 23 (001), 49 – 59.
- Waller, J.M. y P.D. Bridge (2000). Recent advantages in understanding *Colletotrichum* diseases of some tropical perennial crops. In: *Colletotrichum*. Host Specificity, Pathology and Host-Pathogen Interaction (eds. D. Prusky, S. Freeman and M.B. Dickman). APS Press, St Paul, Minnesota. pp 337 – 345.
- Wenqiang, G., L. Shufen, Y. Ruixiang y H. Yanfeng (2006). Compararison of composition and antifungal activity of *Artemisia argyi* Lévl. et Vant inflorescence essential oil extracted by hidrodistillation and supercritical carbon dioxide. Natural Product Research, 20(11), 992 – 998.
- Wiar, C., A. Hannah, M. Yassim, H. Hamimah y M. Sulaiman. (2004). Antimicrobial activity of *Acalypha siamensis* Oliv. ex Gage. Journal of Ethnopharmacology, 95, 285 – 286.
- Winkel-Shirley, B. (2002). Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. Current Opinion in Plant Biology, 5, 218 – 223.
- Xiao, C.L., S.J. MacKenzie y D.E. Legard (2004). Genetic and pathogenic analyses of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates from strawberry and noncultivated hosts. Phytopathology, 94, 446 – 453.
- Yusha'u, M., S.O. Olonitola y B.S. Aliyu (2008). Sensitivity of extended-spectrum β - lactamases producing enterobacteriaceae to *Acalypha maccafeana* extracts. Bayero Journal of Pure and Applied Sciences, 1(1), 1 – 5.
- Zamora-Natera, J.F., A. Bernal-Alcocer y M. Ruiz-López (2005). Perfil de alcaloides de semillas de *Lupinus exaltatus* Zucc (Fabaceae) y la evalaucion antifúngica del extracto alcaloideo y lupanina contra fitopatógenos. Revista Mexicana de Fitopatología, 23(2), 124 – 129.
- Zhongguo-Zhong, Y.Z. (2008). Chemical constituents of aerial part of *Acalypha australis*. Journal of Stored Products Research, 33(12), 1415 – 1417.
- Zhu, P. y P.V. Oudemans (2000). A long terminal repeat retrotransposon Cgret from the phytopathogenic fungus *Colletotrichum gloeosporoides* on cramberry. Current Genetics, 38, 241 – 24.

CAPÍTULO II. ESPECTRO DE ACCIÓN DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *ACALYPHA GAUMERI*

2.1. INTRODUCCIÓN

La diversidad química de los metabolitos biosintetizados en una población de plantas, puede impedir la evolución de patógenos capaces de atacar a otras plantas, a su vez, la variabilidad genética en un patógeno puede producir genotipos tolerantes a un grupo de compuestos (Montes-Belmont, 2009). Por lo tanto, las propiedades de los metabolitos no se conocen en forma amplia, ya que algunos pueden actuar de manera individual contra una o varias especies de hongos; y otros como la alicina del ajo, pueden tener un amplio espectro de acción, no sólo contra especies de hongos, sino también afectar a bacterias, nematodos e insectos (Isman, 2000). Para ello, es importante determinar la capacidad tóxica que tiene el compuesto o el extracto en el crecimiento de uno o varios hongos fitopatógenos, propiedad conocida como espectro de acción y éste se puede calcular, ya sea con un grupo de organismos o bien con varios de ellos (Bacterias, hongos, insectos, nematodos y animales) (González-Rodríguez *et al.*, 2005; Mohana y Raveesha, 2007).

En general, un extracto es considerado con un amplio espectro de acción antifúngico cuando es capaz de inhibir el crecimiento de por lo menos cinco fitopatógenos pertenecientes a géneros diferentes o siete especies (Mohana y Raveesha, 2007; Kishore y Pande, 2007) y puede considerarse como candidato potencial para utilizarse en la agricultura, dentro de los productos eco-amigables.

En estudios recientes, el extracto etanólico (EE) de la raíz de *A. gaumeri* ha demostrado una buena actividad antifúngica contra varias cepas fitopatógenas, entre las que se incluyen: *Alternaria tagetica*, *A. chrysanthemi*, *Colletotrichum gloeosporioides* y *Fusarium oxysporum* (Gamboa-Angulo *et al.*, 2008; Vargas-Díaz, 2009). Con la finalidad de conocer el potencial antifúngico de *A. gaumeri*, en el presente estudio se evaluaron siete cepas de hongos fitopatógenos, no expuestos previamente al extracto de esta planta. Estas cepas corresponden a cepas aisladas de campo: *Alternaria* sp. (ITC02), *Colletotrichum gloeosporioides* (CG4), *Colletotrichum capsici* (CC2), *Corynespora cassiicola* (ITC03), *Curvularia* sp. (ITC10), *Helminthosporium* sp. (ITC04) y *Mycosphaerella fijiensis* (C1233), las cuales mostraron sensibilidad al extracto de *A. gaumeri* y se les determinó su concentración inhibitoria 50 y 90 (CI₅₀ y CI₉₀).

2.2. OBJETIVO ESPECÍFICO

1. Evaluar el espectro de acción del extracto etanólico de la raíz de *A. gaumeri* contra diferentes géneros taxonómicos de hongos fitopatógenos.

2.3. MATERIALES Y MÉTODOS

2.3.1. Obtención del extracto etanólico de la raíz de *Acalypha gaumeri*

Las raíces se colectaron en noviembre de 2011 en Yaxcabá, Yucatán. Las raíces secas y molidas (50 g) de *A. gaumeri* se maceraron con etanol destilado (100 ml) a temperatura ambiente (3 veces). El disolvente se evaporó a presión reducida en un rotavapor (marca Büchi modelo 451), equipado con un baño de agua a 40 °C, hasta obtener el extracto etanólico crudo seco (EE) (Gamboa-Angulo *et al.*, 2008).

2.3.2. Evaluación antifúngica

2.3.2.1. Cepas fitopatógenas

Las cepas fúngicas utilizadas se obtuvieron de diferentes fuentes: GeMBio, el Instituto Tecnológico de Conkal y el cepario de la unidad de Biotecnología (Cuadro 2.1).

Cuadro 2.1. Lista de hongos fitopatógenos evaluados con el extracto etanólico de la raíz de *Acalypha gaumeri*.

Cepa	Clave	Hospedero	Medio	Condiciones de crecimiento	Control positivo
<i>Alternaria</i> sp.	ITC-02	<i>Heliconia magnifica</i>	EM	18 ± 2 °C, oscuridad	Procloraz
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	CG4	<i>Carica papaya</i>	PDA	23 ± 2 °C, 12/12 fotoperiodo	Procloraz
<i>Colletotrichum capsici</i>	CC2	<i>Capsicum</i> sp.	PDA	23 ± 2 °C 12/12 fotoperiodo	Procloraz
<i>Corynespora cassicola.</i>	ITC-03	<i>Capsicum anuum</i>	EM	23 ± 2°C, 12/12 fotoperiodo	Procloraz
<i>Curvularia</i> sp.	ITC-10	<i>Zea maíz</i>	EM	23 ± 2 °C, 12/12 fotoperiodo	Procloraz
<i>Helminthosporium</i> sp.	ITC-04	<i>Veitchia merrillii</i>	EM	23 ± 2 °C, 12/12 fotoperiodo	Procloraz
<i>Mycosphaerella fijiensis</i>	C1233	<i>Musa acuminata</i>	V8	20 ± 2 °C, 12/12 fotoperiodo	Anfotericina B

Medios utilizados para el crecimiento: EM: extracto de malta, PDA: papa dextrosa agar, V8: jugo V8 más carbonato de calcio y agar. Controles Positivos: utilizado Mirage 45 CE (Procloraz) a 200 µg/ml (Dilución en agar) y Fungizone (Anfotericina B) a 8 µg/ml.

2.3.2.2. Bioensayo de dilución en agar

El EE de *A. gaumeri* se disolvió en DMSO y se adicionó al medio de cultivo PDA o EM (según las condiciones de crecimiento de cada patógeno) estéril (Aprox. a 50°C) en agitación constante, a concentraciones de 1000, 500 y 250 µg/ml. Un volumen de aproximadamente 10 ml de la mezcla se transfirió a las cajas Petri (6 cm). Posteriormente, se dejaron en observación por 48 horas para comprobar su esterilidad. Trascurrido este periodo, las cajas se inocularon con un disco invertido (5 mm de diámetro) del fitopatógeno en agar y se incubaron a 23 ó 18 ± 2°C. El diámetro del crecimiento micelial (CM) se midió diariamente en direcciones perpendiculares (Wenqiang *et al.*, 2006), hasta que el control negativo (fitopatógeno en DMSO/medio) cubrió toda la superficie de la caja Petri. Cada tratamiento se realizó por cuadruplicado. Como control positivo de inhibición de crecimiento micelial se utilizó el fungicida Mirage 45 CE (Procloraz) a 200 µg/ml para todos los fitopatógenos.

Los resultados se reportaron como porcentaje de inhibición del crecimiento micelial (ICM). Para obtenerlo, al diámetro total de crecimiento de cada muestra se restó el diámetro del disco de inoculación inicial (5 mm). Posteriormente, al diámetro de crecimiento del control negativo (considerado como un 100 %) se le restó el diámetro de la muestra y se aplicó la fórmula de Abbott (Saetae y Suntornsuk, 2010):

$$\% \text{ ICM} = \frac{\text{Control negativo} - \text{crecimiento de la muestra}}{\text{Control negativo}} \times 100$$

Control negativo = Crecimiento micelial total del patógeno en medio PDA/DMSO (0.5%) menos el diámetro del disco inicial (5 mm).

2.3.2.3. Bioensayo antifúngico en microdilución

La cepa de *Mycosphaerella fijiensis* (C1233) es de lento crecimiento en medio sólido, por lo que se evaluó en el bioensayo en microdilución, previamente establecido en el grupo de trabajo. En este ensayo se utilizó el medio líquido sintético rico en nutrientes RPMI por sus siglas en inglés (Roswell Park Memorial Institute Medium) (20 mM HEPES y L-glutamina, sin NaHCO₃).

2.3.2.3.1. Suspensión de esporas

La suspensión de esporas de *M. fijiensis* C1233 a una concentración de 5×10^4 esporas/mL se obtuvo de acuerdo a la metodología descrita previamente (Peraza-Echeverría *et al.*, 2008).

2.3.2.3.2. Bioensayo en microdilución

El EE de *A. gaumeri* se disolvió con dimetilsulfóxido (DMSO) a una concentración de 40 µg/µL. Posteriormente, cada extracto o fracción (10 µl) se transfirió a una placa de 96 pozos, donde el primer pozo contenía 190 µl de medio RMPI 1640. Estos se mezclaron homogéneamente y se transfirieron 100 µl al segundo pozo (conteniendo 100 µl de medio RMPI), y así sucesivamente para obtener diluciones seriadas progresivas y por último se desechan los 100 µl. Finalmente, se adicionaron 100 µl de la suspensión de esporas del hongo fitopatógeno en cada uno de los pozos obteniendo un volumen total de 200 µl, con una concentración final de 1000, 500 y 250 µg/ml del extracto orgánico y una carga de 2.5×10^5 esporas/ml. Como control positivo se utilizó Fungizone (Anfotericina B) a una concentración de 8 µg/ml. La lectura para cada fitopatógeno se realizó a las 96 horas, de manera visual mediante la escala numérica establecida por el Comité Nacional para Estándares de Laboratorio Clínico (NCCLS) (Cuadro 2.2).

El porcentaje de inhibición de la germinación se determinó mediante la fórmula de Abbott (Abou-Jawdah *et al.*, 2002), con los valores obtenidos de la germinación mediante la escala establecida por el NCCLS (Cuadro 2.2).

Cuadro 2.2. Escala numérica de la inhibición del crecimiento en el bioensayo de microdilución en microplaca (NCCLS, 2002).

PARÁMETRO DE MEDIDAS	ESCALA
Crecimiento normal del patógeno	4
Ligera reducción del crecimiento o que contiene un 75% de crecimiento comparada con el control negativo	3
Prominente reducción del crecimiento o un 50% comparada con el control negativo	2
Poco crecimiento o tan solo el 25% del crecimiento del control negativo	1
Inhibición total, comparando con el control negativo	0

2.3.3. Análisis estadísticos

Los datos obtenidos se analizaron mediante el paquete computacional SAS para Windows versión 8.11. Para esto se realizó un análisis de varianza y prueba de

comparación de medias (Tukey $\alpha = 0.05$). Asimismo, a cada cepa se le determinó la concentración inhibitoria 50 y 90 (CI_{50} y CI_{90}) mediante un análisis probit.

2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El EE de la raíz de *A. gaumeri* se evaluó contra siete cepas fitopatógenas: *Alternaria* sp., *Colletotrichum gloeosporioides*, *C. capsici*, *Corynespora cassiicola*, *Curvularia* sp., *Helminthosporium* sp. y *Mycosphaerella fijiensis* presentando una buena actividad contra todos los fitopatógenos.

Los resultados del bioensayo en dilución en agar mostraron que el EE de *A. gaumeri* es capaz de afectar significativamente el crecimiento micelial de todas las cepas fitopatógenas evaluadas. La actividad antifúngica del extracto se detectó entre un rango del 68 al 97 % de ICM a una concentración de 1000 $\mu\text{g/ml}$ (Cuadro 2.3). Al realizar el análisis de varianza en el porcentaje de ICM del extracto de *A. gaumeri* contra los seis hongos fitopatógenos se observaron diferencias altamente significativas ($p < 0.05$). Este análisis demostró que la cepa más susceptible correspondió a *Corynespora cassiicola* (ITC03) con un porcentaje de ICM del 97 %, seguida por la cepa de *Alternaria* sp. (ITC02) con un 90 % de inhibición (Cuadro 2.3). Asimismo, la cepa de *C. capsici* (CC2) se catalogó como la más resistente por presentar 68% de ICM, el más bajo obtenido en este trabajo (Figura 2.1).

Cuadro 2.3. Inhibición del crecimiento micelial (ICM) y concentración inhibitoria 50 y 90 (CI_{50} y CI_{90}) de las diferentes cepas fitopatógenas con el extracto etanólico de *Acalypha gaumeri*.

Fitopatógeno	ICM	CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	CI_{90} ($\mu\text{g/mL}$)
<i>Alternaria</i> sp. (ITC02)	91 $\pm$ 1.8b	480 (455 – 506)	1262 (1141 – 1424)
<i>Colletotrichum capsici</i> (CC2)	68 $\pm$ 1.0e	595 (536 – 668)	4568 (3198 – 2621)
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> Penz. & Sacc. (CG4)	86 $\pm$ 1.9c	408 (380 – 436)	1438(1254 – 1705)
<i>Corynespora cassiicola</i> Berk. & M. A. Curtis (ITC03)	97 $\pm$ 0.6a	314 (290 – 337)	989 (888 – 1130)
<i>Curvularia</i> sp. (ITC10)	83 $\pm$ 1.5d	458 (428 – 489)	1584 (1375 – 1887)
<i>Helminthosporium</i> sp. (ITC04)	87 $\pm$ 1.0c	411 (385 – 439)	1359 (1197 – 1589)

ICM: inhibición del crecimiento micelial, CI: Concentración inhibitoria 50 y 90 (CI_{50} y CI_{90}) * medias con la misma letra entre columnas son estadísticamente iguales.

Asimismo, se determinó la concentración inhibitoria 50 y 90 (CI_{50} y CI_{90}) del EE de *A. gaumeri* con cada cepa fitopatógena (Cuadro 2.3). Los cálculos de la CI_{50} (314 $\mu\text{g/mL}$) y CI_{90} (989 $\mu\text{g/mL}$) demostraron nuevamente que la cepa más susceptible al extracto correspondió a *C. cassicola* (Cuadro 2.3). En contraste, la cepa más resistente correspondió a *C. capsici* ya que se requiere mayor concentración de extracto para inhibir su crecimiento micelial (CI_{50} = 595 $\mu\text{g/mL}$ y CI_{90} 4568 $\mu\text{g/mL}$).

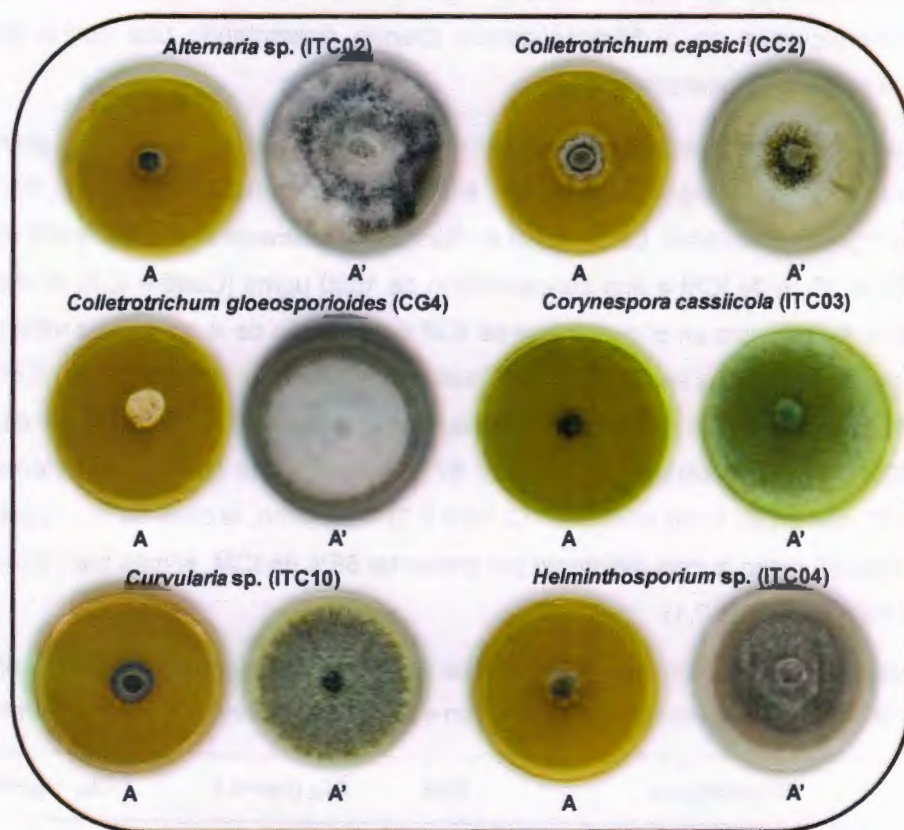


Figura 2.1. Inhibición del crecimiento micelial del extracto etanólico de *Acalypha gaumeri* contra las diferentes cepas fitopatógenas y su respectivo control de crecimiento, A: corresponde al crecimiento del hongo en medio con el extracto etanólico y A': corresponde al crecimiento del hongo en medio con DMSO al 5 %.

El EE de *A. gaumeri* también es capaz de inhibir el 100 % de la germinación de los conidios de *M. fijiensis* mediante el bioensayo de microdilución a una concentración de 1000 $\mu\text{g/mL}$. Con este mismo bioensayo se determinó que la concentración mínima requerida del EE de *A. gaumeri* para inhibir a *M. fijiensis* es de 500 $\mu\text{g/mL}$. Este valor es conocido como la concentración mínima inhibitoria (MIC, por sus siglas en inglés).

Finalmente, al transferir una muestra de este ensayo a una nueva caja de medio no se observó crecimiento alguno, indicando un efecto fungicida del EE sobre esta cepa.

Trabajos previos reportan la evaluación de extractos vegetales contra cepas pertenecientes a algunos de los géneros o especies evaluados en este estudio, demostrando que la efectividad del EE de *A. gaumeri* es comparable a ellos e incluso mejor que los reportados. Tal es el caso del extracto de *Artemisia argyi* que a 1000 µg/mL muestra una ICM del 60 % en *Alternaria alternata* (Wenqiang *et al.* 2006). Asimismo, Bajpai y Kang, (2010), evaluaron los aceites esenciales de *Metasequoia glyptostroboides* a una concentración de 1500 µg/mL sobre el crecimiento micelial de *C. capsici* obteniendo un 20 % de inhibición. En otro trabajo, el extracto de hojas de *Pachyrhizus erosus* inhibió un 36 % a *C. gloeosporioides* a una concentración de 5000 µg/mL (Barrera-Necha *et al.* 2004).

En resumen, hasta el momento el EE de la raíz de *A. gaumeri* es capaz de inhibir a 10 hongos fitopatógenos, tres cepas de *Alternaria* (*Alternaria* sp., *A. tagetica* y *A. chrysanthemi*) (Gamboa-Angulo *et al.*, 2008; Vargas-Díaz, 2009), dos cepas de *Colletotrichum* (*Colletotrichum gloeosporioides* y *C. capsici*), una cepa de *Corynespora cassicola*, *Curvularia* sp., *Helminthosporium* sp., *Fusarium oxysporum* (Gamboa-Angulo *et al.*, 2008) y *Mycosphaerella fijiensis*. Estos resultados permitieron detectar el buen espectro de acción del EE de la raíz de *A. gaumeri*, comparables con los de *Allium sativum*, *Anagallis arvensis* L y *Ricinus communis* (Rai *et al.*, 2003), también es importante mencionar que el espectro de acción de *A. gaumeri*, puede ir en aumento conforme más cepas sean evaluadas. Por lo que es importante seguir estudiando este extracto con la finalidad de determinar los principios activos responsables de la actividad antifúngica.

2.4. CONCLUSIONES

El extracto etanólico de la raíz de *A. gaumeri* posee un amplio espectro de acción ya que inhibió significativamente (68 – 100% a 1000 µg/mL) a las siete cepas fitopatógenas evaluadas, pertenecientes a seis géneros diferentes. Por lo tanto, el EE de *A. gaumeri* es un excelente candidato para continuar siendo estudiado para el desarrollo de un fungicida ecológico.

2.5. BIBLIOGRAFÍA

- Abou-Jawdah Y., H. Sobh y A. Salameh (2002). Antimycotic activities of selected plant flora, growing wild in Lebanon, against phytopathogenic fungi. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 3208 – 3213.
- Bajpai, V.K. y S.C. Kang (2010). Antifungal activity of leaf essential oil and extract of *Metasequoia glyptostroboides* Miki ex Hu. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 87, 327 – 336.
- Barrera-Necha, L.L., S. Bautista-Baños, L. Bravo-Luna y F.J.L. García-Suárez (2004). Antifungal activity of seed powders, extracts, and secondary metabolites of *Pachyrhizus erosus* (L.) Urban (Fabaceae) against three postharvest fungi. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 22 (3), 356 – 361.
- Gamboa-Angulo, M., J. Cristóbal-Alejo, I.L. Medina-Baizabal, F. Chi-Romero, R. Méndez-González, P. Sima-Polanco y F. May-Pat (2008). Antifungal properties of selected plants from the Yucatán peninsula, Mexico. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24, 1955 – 1959.
- González-Rodríguez, M.C.A., H.V. Silva-Rojas y J.O. Mascorro-Gallardo (2005). Ensayo *in vitro* del péptido antimicrobiano melitina contra diferentes bacterias fitopatógenas. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 23(002), 176 – 182.
- Isman, M. B. (2000). Plant essential oils for pest and disease management. *Crop Protection*, 19, 603 – 608.
- Kishore, G.K. y S. Pande (2007). Evaluation of essential oils and their components for broad-spectrum antifungal activity and control of late leaf spot and crown rot diseases in peanut. *Plant Disease*, 91(4), 375 – 379.
- Mohana, D.C. y K.A. Raveesha (2007). Anti-fungal evaluation of some plant extracts against some plant pathogenic field and storage fungi. *Journal of Agricultural Technology*, 4(1), 119 – 137.
- Montes-Belmont, R (2009). Diversidad de compuestos químicos producidos por las plantas contra hongos fitopatógenos. *Revista Mexicana de Micología*, 29, 71 – 82.
- Peraza-Echeverría, L., C.M. Rodríguez-García y D.M. Zapata-Salazar (2008). A rapid, effective method for profuse *in vitro* conidial production of *Mycosphaerella fijiensis*. *Australasian Plant Pathology*, 37, 460 – 463.

- Rai, M., D. Acharya y P. Wadegaonkar (2003). Plant-derived antimycotics: potential of Asteraceous plants. In: Rai, M., D. Mares, (eds.). *Plantderived antimycotics*. Current trends and future prospects. Hartworth Press. N. Y. pp. 165 – 195.
- Saetae D, y W. Suntornsuk (2010). Antifungal activities of ethanolic extract from *Jatropha curcas* seed cake. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20, 319-324.
- Vargas-Díaz, A.A. (2009). Alternativas naturales para el control de *Alternaria chrysanthemi* Simmons & Crosier. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica de Yucatán. 120 p.
- Wenqiang, G., L. Shufen, Y. Ruixiang y H. Yanfeng (2006). Compararison of composition and antifungal activity of *Artemisia argyi* Lévl. et Vant inflorescence essential oil extracted by hidrodistillation and supercritical carbon dioxide. *Natural Product Research*, 20(11), 992 – 998.

CHAPTER III. ANTIFUNGAL EFFECT OF *Acalypha gaumeri* ROOT EXTRACTS AND COMPOUNDS ON *Mycosphaerella fijiensis*.

ABSTRACT

Acalypha gaumeri ethanol extract (AGE) showed good inhibitory effect on *Mycosphaerella fijiensis* (MIC = 500 µg/mL), the causal agent of black Sigatoka in banana plants. Subsequent bioassay-guide fractionation of this extract led to the isolation of active fractions (ACR-1B, 1E, 2B) and compounds Argamerine (1) and ACR-3L (2). Both compounds presented fungicide activity against *M. fijiensis*, with MIC values of 31 µg/mL, and low IC₅₀ values of 8-9 µg/mL. These active compounds also displayed an inhibitory effect on *Alternaria chrysanthemi*; however, the ACR-1E fraction showed lower CI₅₀ (127 µg/mL) compared to 1 and 2. These results suggest that the compounds isolated are the main fungicides of AGE on *M. fijiensis*, but are ineffective on *A. chrysanthemi*. Finally, compound 1 was identified, according to its spectroscopic data, as a novel quaternary isoquinoline alkaloid.

Key words: *Acalypha gaumeri*, *Alternaria chrysanthemi*, antifungal, ethanol extract, *Mycosphaerella fijiensis*

3.1. INTRODUCCION

Mycosphaerella fijiensis Morelet is recognized as the causal agent of black Sigatoka, the most destructive and devastating disease of bananas and plantains in almost all producing regions of the world (Carlier *et al.*, 2003). This pathogen causes reddish-brown streaks running parallel to the leaf veins and forms a water-soaked border with a yellow halo. These eventually merge to cause extensive leaf necrosis causing a reduction in the quantity and quality of the fruit and inducing the premature ripening of fruit harvested from infected plants (Churchill, 2011).

The fungus is controlled mainly by fungicide applications with an annual cost of about 350 million dollars in Central and South America (Peláez *et al.*, 2006). Currently, the consequences deriving from the application of fungicides to control crop diseases have had a negative impact due to their indiscriminate use and high application frequency, which has led to problems and constraints in the control of these diseases through loss of efficiency, increased resistance to active ingredients, ecological damage and a serious negative impact on human health (Alvindia, 2012). For this reason, research has been carried out to develop new antifungal products, as well as methods and strategies for disease control.

Plants are widely recognized as valuable sources of novel antifungal compounds (Meng *et al.*, 2009). Currently, there are a number of reports on plant species with effects against *M. fijiensis*, such as *Lycianthes acutifolia* (Solanaceae), *Nectandra acutifolia* (Lauraceae), *Ocotea paulii* (Lauraceae) and *Piper pesaresanum* (Piperaceae) which inhibited ascospore germination (100 %) at 1000 mg/L; furthermore, rice husk, wood and bamboo extracts completely inhibited the mycelial growth of *M. fijiensis* at concentrations of 5 % (Abiala *et al.*, 2011; Nino *et al.* 2011).

Acalypha gaumeri is an endemic herbaceae plant of the Yucatan peninsula (Fernández-Concha *et al.*, 2010). In previous screening programs, our group detected antifungal activity against several fungi in *A. gaumeri* root extracts. These fungi included *Alternaria tagetica*, *Alternaria chrysanthemi*, and *Fusarium oxysporum*, (Gamboa-Angulo *et al.*, 2008; Vargas-Diaz *et al.*, 2014) and more recently, *M. fijiensis* (MIC 500 µg/mL). No phytochemical studies have been conducted on *A. gaumeri*, and to date, only a few *Acalypha* species have been explored. Compounds reported from this genus included mainly amides, phenols, and terpenoids (Gutierrez-Lugo *et al.*, 2002; Hungeling *et al.*, 2009; Ju-Di *et al.*, 2012). Most of these chemical studies were focused on the identification of the metabolites, ignoring their activity or ineffectiveness.

In the ongoing search for botanical fungicides, the aim of the present work was bioassay-guided isolation of antifungal compounds from *A. gaumeri* extract (AGE) against *M. fijiensis*. Results included isolation and identification of two active major compounds. The IC₅₀ of both antifungal metabolites were calculated on *M. fijiensis*, as well as previously assessed *Alternaria chrysanthemi*, another important fungal phytopathogen, previously reported as being sensitive to AGE.

3.2. RESULTS AND DISCUSSION

In the search for natural products to control fungal pathogens in tropical crops *A. gaumeri* ethanol extract (AGE) was tested *in vitro* on *M. fijiensis*, supported with microdilution assay. In the first step, the conditions of the assay were established for our pathogen strain, as mentioned in the experimental part. Ethanol extract of *A. gaumeri* was able to cause a high inhibitory effect on *M. fijiensis* (MIC values of 500 µg/mL), being more sensitive than *A. chrysanthemi* (MIC values of 2000 µg/mL), a pathogen previously reported (Vargas-Diaz *et al.*, 2014). Therefore, directed-isolation of AGE was guided by microdilution assay on *M. fijiensis*, starting with a partition with solvents in increased polarity. This process facilitated a medium polarity precipitate (ACR-1E) as the most

CHAPTER III. ANTIFUNGAL EFFECT OF *Acalypha gaumeri* ROOT EXTRACTS AND COMPOUNDS ON *Mycosphaerella fijiensis*.

ABSTRACT

Acalypha gaumeri ethanol extract (AGE) showed good inhibitory effect on *Mycosphaerella fijiensis* (MIC = 500 µg/mL), the causal agent of black Sigatoka in banana plants. Subsequent bioassay-guide fractionation of this extract led to the isolation of active fractions (ACR-1B, 1E, 2B) and compounds Argamerine (**1**) and ACR-3L (**2**). Both compounds presented fungicide activity against *M. fijiensis*, with MIC values of 31 µg/mL, and low IC₅₀ values of 8-9 µg/mL. These active compounds also displayed an inhibitory effect on *Alternaria chrysanthemi*; however, the ACR-1E fraction showed lower CI₅₀ (127 µg/mL) compared to **1** and **2**. These results suggest that the compounds isolated are the main fungicides of AGE on *M. fijiensis*, but are ineffective on *A. chrysanthemi*. Finally, compound **1** was identified, according to its spectroscopic data, as a novel quaternary isoquinoline alkaloid.

Key words: *Acalypha gaumeri*, *Alternaria chrysanthemi*, antifungal, ethanol extract, *Mycosphaerella fijiensis*

3.1. INTRODUCCION

Mycosphaerella fijiensis Morelet is recognized as the causal agent of black Sigatoka, the most destructive and devastating disease of bananas and plantains in almost all producing regions of the world (Carlier *et al.*, 2003). This pathogen causes reddish-brown streaks running parallel to the leaf veins and forms a water-soaked border with a yellow halo. These eventually merge to cause extensive leaf necrosis causing a reduction in the quantity and quality of the fruit and inducing the premature ripening of fruit harvested from infected plants (Churchill, 2011).

The fungus is controlled mainly by fungicide applications with an annual cost of about 350 million dollars in Central and South America (Peláez *et al.*, 2006). Currently, the consequences deriving from the application of fungicides to control crop diseases have had a negative impact due to their indiscriminate use and high application frequency, which has led to problems and constraints in the control of these diseases through loss of efficiency, increased resistance to active ingredients, ecological damage and a serious negative impact on human health (Alvindhia, 2012). For this reason, research has been carried out to develop new antifungal products, as well as methods and strategies for disease control.

Plants are widely recognized as valuable sources of novel antifungal compounds (Meng *et al.*, 2009). Currently, there are a number of reports on plant species with effects against *M. fijiensis*, such as *Lycianthes acutifolia* (Solanaceae), *Nectandra acutifolia* (Lauraceae), *Ocotea paulii* (Lauraceae) and *Piper pesaesanum* (Piperaceae) which inhibited ascospore germination (100 %) at 1000 mg/L; furthermore, rice husk, wood and bamboo extracts completely inhibited the mycelial growth of *M. fijiensis* at concentrations of 5 % (Abiala *et al.*, 2011; Nino *et al.* 2011).

Acalypha gaumeri is an endemic herbaceae plant of the Yucatan peninsula (Fernández-Concha *et al.*, 2010). In previous screening programs, our group detected antifungal activity against several fungi in *A. gaumeri* root extracts. These fungi included *Alternaria tagetica*, *Alternaria chrysanthemi*, and *Fusarium oxysporum*, (Gamboa-Angulo *et al.*, 2008; Vargas-Díaz *et al.*, 2014) and more recently, *M. fijiensis* (MIC 500 µg/mL). No phytochemical studies have been conducted on *A. gaumeri*, and to date, only a few *Acalypha* species have been explored. Compounds reported from this genus included mainly amides, phenols, and terpenoids (Gutiérrez-Lugo *et al.*, 2002; Hungeling *et al.*, 2009; Ju-Di *et al.*, 2012). Most of these chemical studies were focused on the identification of the metabolites, ignoring their activity or ineffectiveness.

In the ongoing search for botanical fungicides, the aim of the present work was bioassay-guided isolation of antifungal compounds from *A. gaumeri* extract (AGE) against *M. fijiensis*. Results included isolation and identification of two active major compounds. The IC₅₀ of both antifungal metabolites were calculated on *M. fijiensis*, as well as previously assessed *Alternaria chrysanthemi*, another important fungal phytopathogen, previously reported as being sensitive to AGE.

3.2. RESULTS AND DISCUSSION

In the search for natural products to control fungal pathogens in tropical crops *A. gaumeri* ethanol extract (AGE) was tested *in vitro* on *M. fijiensis*, supported with microdilution assay. In the first step, the conditions of the assay were established for our pathogen strain, as mentioned in the experimental part. Ethanol extract of *A. gaumeri* was able to cause a high inhibitory effect on *M. fijiensis* (MIC values of 500 µg/mL), being more sensitive than *A. chrysanthemi* (MIC values of 2000 µg/mL), a pathogen previously reported (Vargas-Díaz *et al.*, 2014). Therefore, directed-isolation of AGE was guided by microdilution assay on *M. fijiensis*, starting with a partition with solvents in increased polarity. This process facilitated a medium polarity precipitate (ACR-1E) as the most

Finalmente, al transferir una muestra de este ensayo a una nueva caja de medio no se observó crecimiento alguno, indicando un efecto fungicida del EE sobre esta cepa.

Trabajos previos reportan la evaluación de extractos vegetales contra cepas pertenecientes a algunos de los géneros o especies evaluados en este estudio, demostrando que la efectividad del EE de *A. gaumeri* es comparable a ellos e incluso mejor que los reportados. Tal es el caso del extracto de *Artemisia argyi* que a 1000 µg/mL muestra una ICM del 60 % en *Alternaria alternata* (Wenqiang *et al.* 2006). Asimismo, Bajpai y Kang, (2010), evaluaron los aceites esenciales de *Metasequoia glyptostroboides* a una concentración de 1500 µg/mL sobre el crecimiento micelial de *C. capsici* obteniendo un 20 % de inhibición. En otro trabajo, el extracto de hojas de *Pachyrhizus erosus* inhibió un 36 % a *C. gloeosporioides* a una concentración de 5000 µg/mL (Barrera-Necha *et al.* 2004).

En resumen, hasta el momento el EE de la raíz de *A. gaumeri* es capaz de inhibir a 10 hongos fitopatógenos, tres cepas de *Alternaria* (*Alternaria* sp., *A. tagetica* y *A. chrysanthemi*) (Gamboa-Angulo *et al.*, 2008; Vargas-Díaz, 2009), dos cepas de *Colletotrichum* (*Colletotrichum gloeosporioides* y *C. capsici*), una cepa de *Corynespora cassicola*, *Curvularia* sp., *Helminthosporium* sp., *Fusarium oxysporum* (Gamboa-Angulo *et al.*, 2008) y *Mycosphaerella fijiensis*. Estos resultados permitieron detectar el buen espectro de acción del EE de la raíz de *A. gaumeri*, comparables con los de *Allium sativum*, *Anagallis arvensis* L y *Ricinus communis* (Rai *et al.*, 2003), también es importante mencionar que el espectro de acción de *A. gaumeri*, puede ir en aumento conforme más cepas sean evaluadas. Por lo que es importante seguir estudiando este extracto con la finalidad de determinar los principios activos responsables de la actividad antifúngica.

2.4. CONCLUSIONES

El extracto etanólico de la raíz de *A. gaumeri* posee un amplio espectro de acción ya que inhibió significativamente (68 – 100% a 1000 µg/mL) a las siete cepas fitopatógenas evaluadas, pertenecientes a seis géneros diferentes. Por lo tanto, el EE de *A. gaumeri* es un excelente candidato para continuar siendo estudiado para el desarrollo de un fungicida ecológico.

2.5. BIBLIOGRAFÍA

- Abou-Jawdah Y., H. Sobh y A. Salameh (2002). Antimycotic activities of selected plant flora, growing wild in Lebanon, against phytopathogenic fungi. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 3208 – 3213.
- Bajpai, V.K. y S.C. Kang (2010). Antifungal ctivity of leaf essential oil and extract of *Metasequoia glyptostroboides* Miki ex Hu. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 87, 327 – 336.
- Barrera-Necha, L.L., S. Bautista-Baños, L. Bravo-Luna y F.J.L. García-Suárez (2004). Antifungal activity of seed powders, extracts, and secondary matabolites of *Pachyrhizus erosus* (L.) Urban (Fabaceae) against three postharvest fungi. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 22 (3), 356 – 361.
- Gamboa-Angulo, M., J. Cristóbal-Alejo, I.L. Medina-Baizabal, F. Chi-Romero, R. Méndez-González, P. Sima-Polanco y F. May-Pat (2008). Antigungal properties of selected plants from the Yucatán peninsula, Mexico. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24, 1955 – 1959.
- González-Rodríguez, M.C.A., H.V. Silva-Rojas y J.O. Mascorro-Gallardo (2005). Ensayo *in vitro* del péptido antimicrobiano melitina contra diferentes bacterias fitopatógenicas. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 23(002), 176 – 182.
- Isman, M. B. (2000). Plant essential oils for pest and disease management. *Crop Protection*, 19, 603 – 608.
- Kishore, G.K. y S. Pande (2007). Evaluation of essential oils and their components for broad-spectrum antifungal activity and control of late leaf spot and crown rot diseases in peanut. *Plant Disease*, 91(4), 375 – 379.
- Mohana, D.C. y K.A. Raveesha (2007). Anti-fungal evaluation of some plant extracts against some plant pathogenic field and storage fungi. *Journal of Agricultural Technology*, 4(1), 119 – 137.
- Montes-Belmont, R (2009). Diversidad de compuestos químicos producidos por las plantas contra hongos fitopatógenos. *Revista Mexicana de Micología*, 29, 71 – 82.
- Peraza-Echeverría, L., C.M. Rodríguez-García y D.M. Zapata-Salazar (2008). A rapid, effective method for profuse *in vitro* conidial production of *Mycosphaerella fijiensis*. *Australasian Plant Pathology*, 37, 460 – 463.

- Rai, M., D. Acharya y P. Wadegaonkar (2003). Plant-derived antimycotics: potential of Asteraceous plants. In: Rai, M., D. Mares, (eds.). *Plantderived antimycotics*. Current trends and future prospects. Hartworth Press. N. Y. pp. 165 – 195.
- Saetae D, y W. Suntornsuk (2010). Antifungal activities of ethanolic extract from *Jatropha curcas* seed cake. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20, 319-324.
- Vargas-Díaz, A.A. (2009). Alternativas naturales para el control de *Alternaria chrysanhemi* Simmons & Crosier. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica de Yucatán. 120 p.
- Wenqiang, G., L. Shufen, Y. Ruixiang y H. Yanfeng (2006). Compararison of composition and antifungal activity of *Artemisia argyi* Lévl. et Vant inflorescence essential oil extracted by hidrodistillation and supercritical carbon dioxide. *Natural Product Research*, 20(11), 992 – 998.

CHAPTER III. ANTIFUNGAL EFFECT OF *Acalypha gaumeri* ROOT EXTRACTS AND COMPOUNDS ON *Mycosphaerella fijiensis*.

ABSTRACT

Acalypha gaumeri ethanol extract (AGE) showed good inhibitory effect on *Mycosphaerella fijiensis* (MIC = 500 µg/mL), the causal agent of black Sigatoka in banana plants. Subsequent bioassay-guide fractionation of this extract led to the isolation of active fractions (ACR-1B, 1E, 2B) and compounds Argamerine (1) and ACR-3L (2). Both compounds presented fungicide activity against *M. fijiensis*, with MIC values of 31 µg/mL, and low IC₅₀ values of 8-9 µg/mL. These active compounds also displayed an inhibitory effect on *Alternaria chrysanthemi*; however, the ACR-1E fraction showed lower CI₅₀ (127 µg/mL) compared to 1 and 2. These results suggest that the compounds isolated are the main fungicides of AGE on *M. fijiensis*, but are ineffective on *A. chrysanthemi*. Finally, compound 1 was identified, according to its spectroscopic data, as a novel quaternary isoquinoline alkaloid.

Key words: *Acalypha gaumeri*, *Alternaria chrysanthemi*, antifungal, ethanol extract, *Mycosphaerella fijiensis*

3.1. INTRODUCCION

Mycosphaerella fijiensis Morelet is recognized as the causal agent of black Sigatoka, the most destructive and devastating disease of bananas and plantains in almost all producing regions of the world (Carlier *et al.*, 2003). This pathogen causes reddish-brown streaks running parallel to the leaf veins and forms a water-soaked border with a yellow halo. These eventually merge to cause extensive leaf necrosis causing a reduction in the quantity and quality of the fruit and inducing the premature ripening of fruit harvested from infected plants (Churchill, 2011).

The fungus is controlled mainly by fungicide applications with an annual cost of about 350 million dollars in Central and South America (Peláez *et al.*, 2006). Currently, the consequences deriving from the application of fungicides to control crop diseases have had a negative impact due to their indiscriminate use and high application frequency, which has led to problems and constraints in the control of these diseases through loss of efficiency, increased resistance to active ingredients, ecological damage and a serious negative impact on human health (Alvinda, 2012). For this reason, research has been carried out to develop new antifungal products, as well as methods and strategies for disease control.

Plants are widely recognized as valuable sources of novel antifungal compounds (Meng *et al.*, 2009). Currently, there are a number of reports on plant species with effects against *M. fijiensis*, such as *Lycianthes acutifolia* (Solanaceae), *Nectandra acutifolia* (Lauraceae), *Ocotea paulii* (Lauraceae) and *Piper pesaresanum* (Piperaceae) which inhibited ascospore germination (100 %) at 1000 mg/L; furthermore, rice husk, wood and bamboo extracts completely inhibited the mycelial growth of *M. fijiensis* at concentrations of 5 % (Abiala *et al.*, 2011; Nino *et al.* 2011).

Acalypha gaumeri is an endemic herbaceous plant of the Yucatan peninsula (Fernández-Concha *et al.*, 2010). In previous screening programs, our group detected antifungal activity against several fungi in *A. gaumeri* root extracts. These fungi included *Alternaria tagetica*, *Alternaria chrysanthemi*, and *Fusarium oxysporum*, (Gamboa-Angulo *et al.*, 2008; Vargas-Díaz *et al.*, 2014) and more recently, *M. fijiensis* (MIC 500 µg/mL). No phytochemical studies have been conducted on *A. gaumeri*, and to date, only a few *Acalypha* species have been explored. Compounds reported from this genus included mainly amides, phenols, and terpenoids (Gutiérrez-Lugo *et al.*, 2002; Hungeling *et al.*, 2009; Ju-Di *et al.*, 2012). Most of these chemical studies were focused on the identification of the metabolites, ignoring their activity or ineffectiveness.

In the ongoing search for botanical fungicides, the aim of the present work was bioassay-guided isolation of antifungal compounds from *A. gaumeri* extract (AGE) against *M. fijiensis*. Results included isolation and identification of two active major compounds. The IC₅₀ of both antifungal metabolites were calculated on *M. fijiensis*, as well as previously assessed *Alternaria chrysanthemi*, another important fungal phytopathogen, previously reported as being sensitive to AGE.

3.2. RESULTS AND DISCUSSION

In the search for natural products to control fungal pathogens in tropical crops *A. gaumeri* ethanol extract (AGE) was tested *in vitro* on *M. fijiensis*, supported with microdilution assay. In the first step, the conditions of the assay were established for our pathogen strain, as mentioned in the experimental part. Ethanol extract of *A. gaumeri* was able to cause a high inhibitory effect on *M. fijiensis* (MIC values of 500 µg/mL), being more sensitive than *A. chrysanthemi* (MIC values of 2000 µg/mL), a pathogen previously reported (Vargas-Díaz *et al.*, 2014). Therefore, directed-isolation of AGE was guided by microdilution assay on *M. fijiensis*, starting with a partition with solvents in increased polarity. This process facilitated a medium polarity precipitate (ACR-1E) as the most

active fraction (MIC value of 250 µg/mL) followed only by ACR-1B and ACR-2B fractions (Table 3.1).

Table 3.1. Antifungal effect of *Acalypha gaumeri* extracts and fractions on *Mycosphaerella fijiensis* by microdilution assays (500 µg/mL).

Fraction	Growth inhibition (%)	MIC (µg/mL)
ACR	100 ± 0a	500
ACR-1A	0 ± 0c	ND
ACR-1B	75 ± 0b	> 500
ACR-1C	0 ± 0c	ND
ACR-1D	0 ± 0c	ND
ACR-1E	100 ± 0a	250
ACR-2A	0 ± 0c	ND
ACR-2B	50 ± 0c	> 500

*Mean followed by the same letter within the same columns is not significantly different (Tukey, $P < 0.05$). ACR: Ethanol extract of *Acalypha gaumeri* roots, ACR-1A: *n*-hexane fraction, ACR-1B: Ethyl acetate fraction, ACR-1C: aqueous residue, ACR-1E: Ethyl acetate precipitate, ACR-1D: Ethanol precipitate, ACR-2A: Partition acid, ACR-2B: Partition basic, MIC: Minimum inhibitory concentration. ND: Not determined

The bioassay-guided isolation led to active fraction ACR-1E, which was submitted to successive columns on silica gel obtaining compounds (**1** and **2**); both causing an excellent fungicidal effect against *M. fijiensis* with a MIC value of ≤ 31 µg/mL and a median (IC_{50}) of 8 - 9 µg/mL (Table 3.2). This effect is greater than that caused by ACR-1E fraction, which suggests that the fungal inhibition is due to both metabolites in AGE, with equivalent intensity. Hidalgo *et al.* (2009) reported the activity of two perinaphthenones isolated from *Musa acuminata* var. Yangambi, with an IC_{50} of < 50 µg/mL against *M. fijiensis*. Later, Cheng *et al.* (2010) reported the activity of the compounds 1,2-dimethoxy-4(2-propenyl) benzene isolated from *Acorus tatarinowii* against *Mycosphaerella sentina* (Fr.) with IC_{50} of 2200 µg/mL.

In addition, the compounds **1** and **2** were assessed on *A. chrysanthemi*, which was previously identified as sensitive to AGE (Vargas-Díaz *et al.*, 2014). Unexpectedly, only **2** had a good inhibitory effect with MIC values of 500 µg/mL. However, the ACR-1E fraction showed greater antifungal activity with MIC values of 250 µg/mL (Table 3.2). On the other hand, these results clearly suggest the presence of other minor compounds in ACR-1E, which are contributing to the antifungal effect on *A. chrysanthemi* and also to a possible synergistic action among the compounds. Cheng *et al.* (2010) evaluated the compound 1,2-dimethoxy-4(2-propenyl) benzene against *Alternaria alternata* Tanaka

with IC_{50} of 3600 $\mu\text{g/mL}$. Our results with compounds **1** and **2** presented lower IC_{50} with values between 8 – 791 $\mu\text{g/mL}$, and are therefore highly promising for further studies.

Table 3.2. Minimal inhibitory concentration and inhibition concentration (IC_{50} and IC_{95} of compounds **1** and **2** isolated from *Acalypha gaumeri* against *Alternaria chrysanthemi* and *Mycosphaerella fijiensis*.

Samples	<i>Mycosphaerella fijiensis</i> ($\mu\text{g/mL}$)			<i>Alternaria chrysanthemi</i> ($\mu\text{g/mL}$)		
	IC_{50} (95 % FL)	IC_{90} (95 % FL)	MIC	IC_{50} (95 % FL)	IC_{90} (95 % FL)	MIC
ACR-1E	83 (79 – 87)	140 (130 – 151)	250	127 (72 – 183)	143 (128 – 158)	250
Argaumerine	8 (7.7 – 8.0)	16 (15 – 18)	≤ 31	791 (563 – 1021)	2919 (1952–3888)	>500
ACR-3L	9 (8.5 – 9.4)	17 (16–19)	≤ 31	257 (218 – 299)	485 (429–541)	500
Amphotericin B	0.7 (0.7 – 0.8)	3 (2.7 – 3.4)	8	1.7 (1.6 – 1.7)	3.2 (3.0–3.5)	4

FL: Fiducial limits, **MIC:** Minimum inhibitory concentration, **Positive control:** Amphotericin B (4 $\mu\text{g/mL}$).

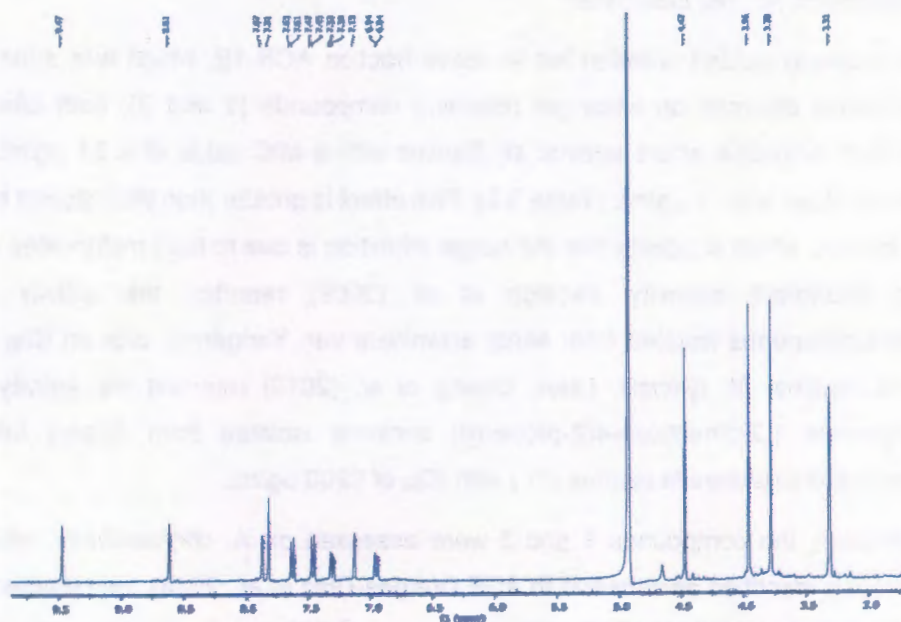


Figure 3.1. ^1H NMR spectrum of argaumerine (**1**) from *Acalypha gaumeri* (400 MHz, MeOD).

Compound **1** was obtained as a yellow solid and was positive in Dragendorff test, suggesting the presence of nitrogen in its structure. This was confirmed in its IR spectrum by the characteristic band at 3216 and 1383 ($=\text{C}-\text{N}$) cm^{-1} for amine groups. In addition to

aromatic double bonds (1623 , 1583 , 1494 cm^{-1}) and ether groups (1383 cm^{-1}). The positive FABMS spectra of **1** showed a molecular ion $[M^+ + 2H]^+$ at m/z 359.13932 , and a molecular formula of $C_{22}H_{19}O_3N_2^+$.

The ^{13}C NMR spectrum (Figure 3.2) of **1** indicated the presence of 22 carbons in its structure. Where ten are quaternary, nine tertiary sp^2 and only three correspond to sp^3 carbons (Table 3.3). The ^1H NMR spectrum of compound **1** (Figure 3.1) showed the expected nine aromatic protons located downfield (δ $6.95 - 9.47$) and three singlets assigned to methoxyl groups (δ 4.47 , 3.96 and 3.78).

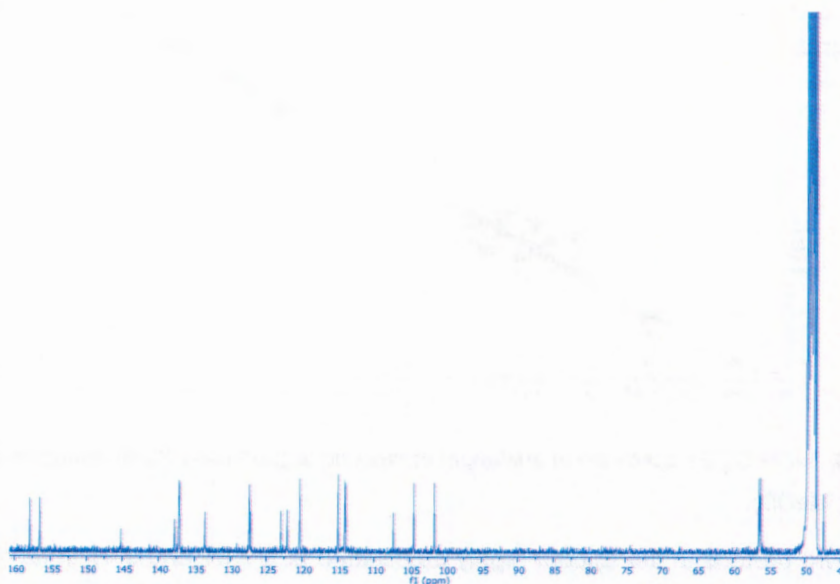


Figure 3.2. ^{13}C NMR spectrum of antifungal compound argaumerine (**1**) of *Acalypha gaumeri* (400 MHz, MeOD).

All protons and carbons were assigned by direct correlations observed by HSQC experiment spectra (Table 3.3). The complete structural identification of **1** was achieved through detailed study of its integral data obtained from its 2D experiments (^1H - ^1H COSY, DEPT, HMBC and NOESY). The *ortho* ($J = 8.9\text{ Hz}$) and *meta* ($J = 2.44\text{ Hz}$) couplings exhibited by aromatic protons in ^1H - ^1H COSY experiment (Figure 3.3) led to the detection of two aromatic rings in **1** (A and D), both with ABX substitution pattern. In the HMBC experiment of **1** it was possible to observe the 3J correlation between the protons shift at δ 3.96 and 3.78 with the carbons at δ 157.9 (C-4) and 156.5 (C-10), corresponding to methoxyl groups located in rings A and D, respectively (Figure 3.4). Also, aromatic proton shift at δ 7.87 in ring A showed long correlations (2J , 3J) with carbons at δ 137.3 (C-1a), 120.3 (C-3), C-4 and C-5b indicating the connection with a second ring (B). Similarly, D

ring is joined to ring C, the long range interactions displayed between the aromatic proton at δ 7.81 with carbons at δ 107.3 (C-8b), 114.0 (C-12), 133.6 (C-12a) and 127.2 (C-13b) (Figure 3.4).

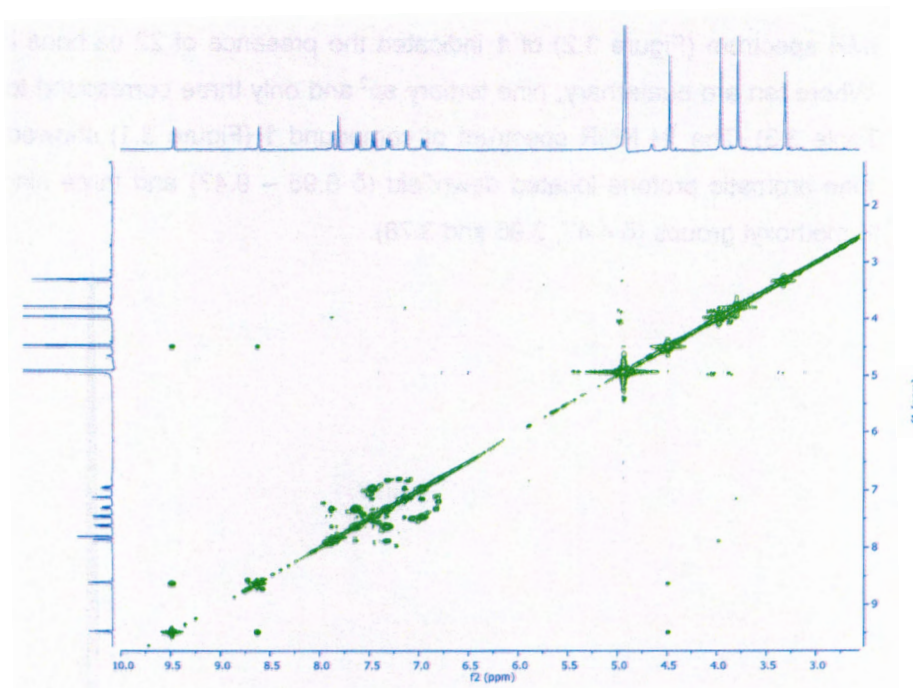


Figure 3.3. ^1H - ^1H COSY spectrum of antifungal compound argaumerine (**1**) of *Acalypha gaumeri* (400 MHz, MeOD).

The last two protons in the appear highly deshielded at δ 8.61 and 9.47 in its ^1H NMR spectrum, and both protons presented little couplings among them by ^1H - ^1H COSY. The high deshielding with respect to other aromatic protons in the structure indicated that these are in proximity to a nitrogen atom. Furthermore, HMBC spectra of **1** exhibited long range correlations of the proton at δ 8.61 with carbons located at δ 107.3 (C-8b), 120.3 (C-8a) belong to C ring; and the interactions between proton at δ 9.47 with carbons at δ 123.0 (C-5b) belong to B ring, and therefore bonded to the fifth ring (E) in **1**. Finally, both protons showed a long range correlation with carbon at δ 145.2 (C-13a), indicating the presence of a tricycle and a substructure of isoquinoline alkaloid in compound **1** (Figure 3.4).

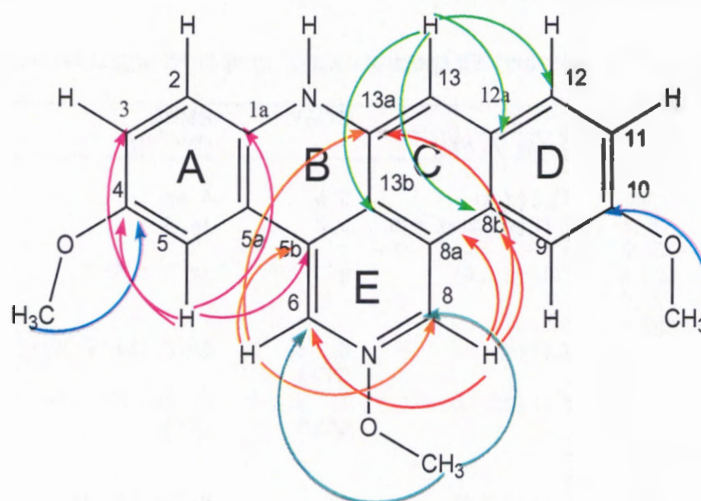


Figure 3.4. The structure and key HBMC correlations of argaumerine.

Finally, the protons of the third methoxyl group herein observed displayed a strong, long range correlation with carbons at δ 137.0 (C-6) and 137.1 (C-8) suggesting that this is directly bonded to nitrogen in ring E, as quaternary alkaloid. This bond and the pentacyclic arrangement of the structure were confirmed by spatial interactions between protons of *N*-methoxyl group with protons at δ 8.61 (H-8) and 9.47 (H-6), indeed the interactions of the same last protons with protons H-5 and H-9 (Fig. 3.5). Thus, this information confirms that compound 1 is a novel pentacyclic quaternary benzoisoquinolin alkaloid named argaumerine.

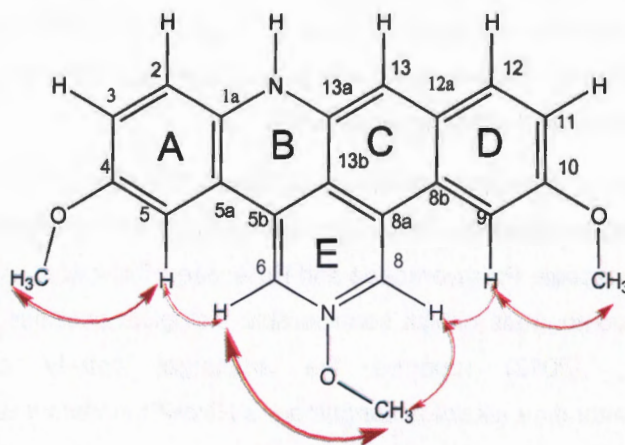


Figure 3.5. The structure and key NOESY correlations of argaumerine

Table 3.3. ^1H - and ^{13}C -NMR and 3D spectral data of compound argaumerine in MeOD.

Position	HSQC		COSY	HMBC (^1H - ^{13}C)	NOESY
	δ_{C}	δ_{H} (m, J= Hz)			
1a	137.3	—			
2	115.0	7.62 (d, 9)	3, 5	4, 5a	3
3	120.3	7.31 (dd, 2.44, 8.9)	2, 5	1a, 4	2
4	157.9	—			
5	104.4	7.87 (d, 2.4)	3	1a, 3, 4, 5b	3, 6, C4-OCH ₃
5a	123.0				
5b	122.1	—			
6	137.0	9.47 (s)	5, 8, N-OCH ₃	5b, 8, 13a, N-OCH ₃	5, N-OCH ₃
8	137.1	8.61 (bd, 1.3)	6, 9, N-OCH ₃	6, 8a, 8b, 13a, N-OCH ₃	9, N-OCH ₃
8a	120.3	—			
8b	107.3	—			
9	104.6	7.13 (d, 2.3)	11	8a, 8b, 11 12a,	8, C10-OCH ₃
10	156.5				
11	114.1	6.95 (dd, 2.3, 8.9)	9, 12	9, 12a	12
12	114.0	7.46 (d, 8.9)	11	10, 13	11, 13
12a	133.6	—			
13	127.4	7.81 (s)		8b, 12, 12a, 13b	12
13a	145.2				
13b	127.2	—			
C4-OCH ₃	56.4	3.95 (s)	5	4	3, 5
C10-OCH ₃	56.2	3.78 (s)	9	10	9, 11
N-OCH ₃	47.4	4.47 (s)	6, 8	6, 8	6, 8

The semi-pure compounds ACR-3L exhibited a proton spectrum similar to that of **1**. In its ^1H NMR spectrum, the nine aromatic signals appeared with different shifts at δ 8.72, 8.29, 8.06, 7.58 (d, J = 8 Hz), 7.5 (dd, J = 12, 8 Hz), 7.39 (d, J = 12 Hz), 7.32 (d, J = 4 Hz), 7.06 (d, J = 4 Hz), and 7.01 (d, J = 4 Hz). This data indicates that argaumerine and ACR-3L are aromatic heterocycles, and that greater quantities are required for further studies to identify their full chemical structure.

Natural quaternary benzophenanthridine alkaloids (QBAs) constitute a relatively small class of isoquinoline alkaloids which are widely distributed, however, in the higher plant families; Fumariaceae, Papaveraceae and Rutaceae (Krane et al., 1984; Šimánek et al., 1985). These compounds exhibit considerable biological activities, such as antifungal. Yang *et al.*, (2012) reported the antifungal activity of the quaternary benzo[c]phenanthridine alkaloids sanguinarine (Growth inhibitory rates of 82 and 71 %, respectively) and chelerythrine (94 and 83 %, respectively) against *Fusarium oxysporum* and *Alternaria alternata* at concentration values of 100 $\mu\text{g/mL}$.

The same author discussed that the iminium bond ($\text{C}=\text{N}^+$) has proved to be the determinant for antifungal activity. Compound **1** presented this same iminium bond, thus its antifungal activity may be attributed to this group. As another example, Singh *et al.*,

(2010) reported that jatrorrhizine was effective in controlling spore germination (100 %) in *Curvularia* sp. and *Fusarium udum*; and compound columbamine against *Helminthosporium* sp. and *F. udum* at 5000 ppm. Results with AGE and compounds presented a MIC between 31.25 – 500 µg/mL on pathogens evaluated, which is highly promising.

In this genus, there have been reports of the occurrence of alkaloids such as acalyphin (Nahrstedt *et al.*, 1982), acalyphamide, aurantiamide, succinimide (Talapatra *et al.*, 1981), flindersin (Taufiq-Yap *et al.*, 2000) and epiacalyphin, noracalyphin, epinoracalyphin, ar-acalyphidone, acalyphin amide and epiacalyphin amide cycloside, all without antifungal activity studies (Hungeling *et al.*, 2009). None of these compounds reported antifungal activity. However, there are reports of alkaloid compounds with antifungal activity.

Therefore, this is the first report of alkaloidal compounds from the *Acalypha* genus with antifungal activity, which also represents a contribution to the chemotaxonomy knowledge of *A. gaumeri*, an endemic species of Yucatán. Our study demonstrates that compounds and fractions isolated from *A. gaumeri* possess good antifungal effect against fungal pathogens; in particular *M. fijiensis* was highly sensitive. The identification of the chemical structure of the isolated metabolites is important in order to determine their safety and effectiveness in the field and subsequently develop eco-friendly products to control black sigatoka disease.

3.3. EXPERIMENTAL

3.3.1. Plant material and preparation of crude extract

The root from *A. gaumeri* was collected in November of 2011 in Yaxcabá, Yucatán (México) The plant material was identified by a taxonomist and a sample was kept in the herbarium at the Unidad de Recursos Naturales of the Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. specimens under the voucher number P. Simá 2979 were deposited at CICY's U Najil Tikin Xiw herbarium.

Dried powdered plant material under artificial light (50–60 °C, 3 days) was extracted at room temperature with ethanol as previously described (Cristóbal-Alejo *et al.* 2006). The filtered extract was concentrated using a rotary evaporator (BUCHI R-200).

3.3.2. Bioassay-guided extraction and isolation

3.3.2.1. Purification of *Acalypha gaumeri* ethanol extract

The ethanol extract (48.2 g) was suspended in 1 L MeOH-H₂O (1:3) and extracted with 2 L of solvents of increasing polarity, obtaining hexane (ACR-1A, 10 g), EtOAc (ACR-1B, 4.2 g) fractions and an aqueous residue (ACR-1C, 22.2 g). Yellow precipitates were also obtained from ethanol (ACR-1D, 0.20 g) and EtOAc (ACR-1E, 0.350 g) fractions. The fraction ACR-1B was submitted to acid-base partition, extracted with EtOAc to obtain the acid (ACR-2A, 3.2 g) and basic (ACR-2B, 0.95 g) phases. ACR-2B and ACR-1E fractions were active and similar by TLC. Both fractions were then chromatographed on a silica gel column (72 × 1.2 cm) using gradient CH₂Cl₂:MeOH 90:10, 85:15 and NH₄OH as mobile phase, to yield compound **1** (10 mg) and ACR-3L (5.9), with R_f = 0.35 and 0.23 (CH₂Cl₂: MeOH: NH₄OH 80:20:0.2), respectively.

Argaumerine (1). yellow solid. IR (KBr, cm⁻¹) 3216, 2920, 2851, 1623, 1583, 1494, 1383. ¹H NMR: Table 3.3. ¹³C NMR: Table 3.3. MS m/z calculated for C₂₂H₁₉N₂O₃ [M⁺ + 2H] + 359.39786, found 359.13932.

3.3.2.2. ANALYTICAL METHODS

The IR spectrum was measured in a Nicolet Protege Spectrometer. Spots on TLC were visualized under UV light and by heating. ¹H, (400 MHz), ¹³C NMR spectra and bi-dimensional, ¹H-¹H COSY were acquired on a Bruker Avance 400 Ultra Shield Spectrometer at 400 and 100 MHz, respectively, using MeOD as solvent. MS were recorded using a JEOL GC-Mate II FAB [+], matriz NBA, with Calibration Ultramark and Resolution 3000.

3.3.3. Strain pathogens

Alternaria chrysanthemi E. G. Simmons & Crosier (CICY004) was isolated from *Dendranthema grandiflorum* Ramat in leaf with lesions. *M. fijiensis* strain CIRAD 1233 (registration number IMI 392976, International Mycological Institute, CABI Bioscience Centre, Egham, UK) from *Musa acuminata* of Yucatan, Mexico. The conidia from *M. fijiensis* were obtained according to the methodology established by Rodríguez-García *et al.*, (2007).

3.3.4. Antifungal microdilution assay

Samples were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) to 40 µg/µL and an aliquot of 10 µL were transferred to microwells containing 190 µL synthetic medium Roswell Park

Memorial Institute 1640 (RPMI-1640). A conidial suspension of *M. fijiensis* (100 µL) was then added to each microwell on a 96-well plate to final concentration of 2.5×10^5 conidia/mL and 2.5, 1.25 and 0.625% DMSO. Fractions were tested to final concentrations of 1000, 500, and 250 µg/µL; compounds to 500, 250, 125, 62.5 and 31.3 µg/µL. Conidial spore suspension, RPMI-1640-2.5% DMSO mixture were used as negative controls, and 25% DMSO as positive control. Tests were carried out in triplicate. The microdilution plates were incubated at $23 \pm 2^\circ\text{C}$ in the dark for 96 hours. Hyphal growth (HG) was determined visually with a microscope (50×) following NCCLS standard (2004). Data was 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 1–2) (Abou-Jawdah *et al.*, 2002).

This assay was performed with isolated compounds against *A. chrysanthemi* at a concentration of 2.5×10^4 conidia/mL.

3.3.5. Data analyses

Data of GI on percentages obtained from the assays were submitted to an analysis of variance using the instruction, $y = \arcsin(\sqrt{q}/100)$, and average values were calculated by multiple means comparison analysis Tukey, $P = 0.05$, using Statistical Analysis System (SAS) version 8.1 for windows. Inhibition concentrations of 50 and 90 were calculated for each active treatment using Probit analysis.

3.4. REFERENCES

- Abiala, M.A., A.A. Ogunjobi, A.C. Odebode and M.A. Ayodele (2011). Evaluation of plant extracts as an antagonist to mycelial growth of *Mycosphaerella fijiensis* morelet. Archives of Phytopathology and Plant Protection, 44(17), 1711 – 1718.
- Abou-Jawdah Y, H. Sobh, A. Salameh (2002). Antimycotic activities of selected plant flora, growing wild in Lebanon, against phytopathogenic fungi. Journal of Agriculture of Food Chemistry, 50, 3208 – 3213.
- Alvindia, D.G. (2012). Inhibitory influence of biocontrol agents, plant oils, and an inorganic salt on *Mycosphaerella fijiensis* and *Cordana musae*. African Journal of Microbiology Research, 6(15), 3690 – 3695.
- Carrier, J. Lebrum, M.H. Zapater, M.F. Dubois and X. Mourichon (2003). Genetic structure of the global population of banana black leaf streak fungus, *Mycosphaerella fijiensis*. 5(4), 499 – 510.

- Cheng, DY., C. Kai-lin, Y. Yan-zhen, D. Zhi-yong and K. Zuo-wei (2010). *In vitro* antifungal activity of the extract and compound from *Acorus tatarinowii* against seven plant pathogenic fungi. *Agricultural Sciences in China*, 9(1): 71-76.
- Churchill, A.C.L. (2011). *Mycosphaerella fijiensis*, the black leaf streak pathogen of banana: progress towards understanding pathogen biology and detection, disease development, and the challenges of control. *Molecular Plant Pathology*, 12(4), 307–328.
- Cristóbal-Alejo, J., J.M. Tun-Suarez, S. Moguer-Catzin, N. Marbán-Mendoza, L. Medina-Baizabal, P. Simá-Polanco, S.R. Peraza-Sánchez y M.M. Angulo-Gamboa (2006). *In vitro* sensitivity of *Meloidogyne incognita* to extracts from natives yucatecan plants. *Nematropica*, 36(1), 89 – 97.
- Fernández-Concha GC, Tapia JLM, Duno R, Ramírez MIM (2010). Flora ilustrada de la península de Yucatán. Lista florística. Centro de Investigación Científica de Yucatán, México. pp 311–312.
- Gamboa-Angulo, M., J. Cristóbal-Alejo, L. Medina-baizabal, F. Chí-Romero, R. Méndez-González, P. Simá-Polanco y F. May-Pat (2008). Antifungal propiedades of selected plants from the Yucatan península, México. *World Journal Microbiology Biotechnology*, 24, 1955 – 1959.
- Gutierrez-Lugo, M.T., M.P. Sigh, W.N. Maiese, B.N. Timmermann (2002). New antimicrobial cycloartane triterpenes from *Acalypha communis*. *Journal Natural Product*, 65(6), 872 – 875.
- Hidalgo, W., L. Duque, J. Saez, R. Arango, J. Gil, B. Rojano, B. Schneider and F. Otalvaro (2009). Structure-activity relationship in the interaction of substituted perinaphthenones with *Mycosphaerella fijiensis*. *Journal Agriculture Food Chemistry*, 57, 7417 – 7421.
- Hungeling, M., M. Lechtenberg, F.R. Fronczek and A. Nahrstedt (2009). Cyanogenic and non-cyanogenic pyridone glucosides from *Acalypha indica* (Euphorbiaceae). *Phytochemistry*, 70, 270 – 277.
- Ju-Di, F., S. Bao-An and S. Yang (2012). Phenolic compounds from *Acalypha australis*. *Chemistry of Natural Compounds*, 48(3), 489 – 490.
- Krane, B.D., M.O. Fagbule, M. Shamma and B. Gözler (1984). The benzophenanthridine alkaloids. *Journal Naural Product*, 47, 1 – 43.

- Meng, F., G. Zuo, X. Hao, G. Wang, H. Xiao, J. Zhang and G. Xu (2009). Antifungal activity of the benzo[c]phenanthridine alkaloids from *Chelidonium majus* Linn against resistant clinical yeast isolates. *Journal of Ethnopharmacology*, 125(3): 494 – 496.
- Nahrstedt, A., J.D. Kant and V. Wray (1982). Acalyphin, a cyanogenic glucoside from *Acalypha indica*. *Phytochemistry*, 21, 101 – 105.
- Nino, J., Y. Correa and O. Mosquera (2011). In vitro evaluation of Colombian plant extracts against Black Sigatoka (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet). *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 44(8), 791 – 803.
- Peláez, J., L.E. Vásquez, T.J. Díaz, D.A. Castañeda, E. Rodríguez and R.E. Arango (2006). Use of microtitre plate dilution assay to measure activity of antifungal compounds against *Mycosphaerella fijiensis*, Morelet. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 59(2), 3425–3433.
- Rodríguez-García, C. M., R.Z. Navarrete-Mapen and L. Peraza-Echeverría (2007). Characterization of the in vitro conidial morphology of *Mycosphaerella fijiensis*, a major pathogen of banana. *Australasian Plant Pathology*, 36, 369 – 372.
- Šimánek, V. (1985). Benzophenanthridine Alkaloids. In *The Alkaloids*; Brossi, A., Ed.; Academic Press: New York, NY, USA, Volume 26, pp. 185–240.
- Singh, A., S. Singh, M. Kesharwani, T. D. Singh, V. P. Singh, V. B. Pandey y U. P. Singh (2010). A jatrorrhizine and columbamine alkaloids isolated from *Argemone mexicana* are inhibitory to spore germination of some plant pathogenic fungi. *Archives Of Phytopathology And Plant Protection*, 43:15, 1450 – 1453.
- Talapatra, B., S. Goswami and S.K. Talapatra (1981). Acalyphamide, a new amide and other chemical constituents of *Acalypha indica* Linn. *Indian Journal of Chemistry*, 20B, 974 – 977.
- Taufiq-Yap, Y.H., T.H. Peh, G.C.L. The and M. Rahmani (2000). Chemical investigation of *Acalypha indica* (Euphorbiaceae). *Oriental Journal of Chemistry*, 16, 249 – 251.
- Vargas-Díaz, A.A., M. Gamboa-Angulo, I.L. Medina-Baizabal, D. Pérez-Brito, J. Cristóbal-Alejo y E. Ruíz-Sánchez (2014). Evaluation of native yucatecan plants against *Alternaria chrysanthemi* and antifungal activity spectrum of *Acalypha gaumeri*. *Revista Mexicana de Fitopatología*.

Yang, X.J., F. Miao, Y. Yao, F.J. Cao, R. Yang, Y.N. Ma, B.F. Qin y L. Zhou (2012). In vitro antifungal activity of sanguinarine and chelerythrine derivatives against phytopathogenic fungi. *Molecules*, 17, 13026 – 1303.

CAPÍTULO IV. ACTIVIDAD ANTIFUNGICA DE TRES POBLACIONES DE *Acalypha gaumeri* COLECTADAS EN ÉPOCA DE SEQUÍA, LLUVIA E INICIO DE SEQUÍA

4.1. INTRODUCCIÓN

Los metabolitos secundarios representan una interface química entre las plantas y el ambiente, por lo tanto, su síntesis, contenido, así como su relativa proporción en plantas, es con frecuencia influenciada por diversos factores ambientales (Chaves *et al.*, 2013).

La época del año en la que una planta se colecta afecta su metabolismo secundario, ya que muchas veces el contenido de compuestos activos no es constante durante todo el año. Entre los factores que determinan esta variación se encuentran los abióticos (temperatura, disponibilidad de agua, luz, humedad) y bióticos (ataque de patógenos e insectos) (Ncube *et al.*, 2012). Un ejemplo de los factores abióticos es el aumento en la producción de antocianinas (compuestos de protección de la planta) en las hojas de *Zea mays* a bajas temperaturas de 18 °C (Pietrini *et al.*, 2002). Contrario a ello en *Hypericum perforatum* se observó aumento de naftodiantronas, hiperforina de acilfloroglucinol y compuestos fenólicos a altas temperaturas de 32 °C (Radušienė *et al.*, 2012).

Los factores fisiológicos críticos, tales como la fotosíntesis, comportamiento estomático, movilización de reservas, expansión foliar y crecimiento, pueden ser alterados por el estrés hídrico y consecuentemente causar alteraciones en el metabolismo secundario (Carneiro *et al.*, 2010; Salisbury y Ross, 1991). Por lo que, los efectos de la lluvia sobre la producción de metabolitos secundarios en plantas, deben considerarse en relación con el índice pluviométrico o con la tasa anual. Tal es el caso de los componentes de los aceites esenciales (Cetona de artemisina y β -eudesmol) de *Santolinaros maritifolia* los cuales son afectados positivamente cuando el índice pluviométrico es alto con 355.1 mm (Pála-Paúl *et al.*, 2001). El periodo de sequía también tiene un efecto en la fisiología de las plantas, ya que a corto plazo puede inducir el incremento en la producción de metabolitos secundarios, pero a largo plazo se observa un efecto opuesto (Carneiro *et al.*, 2010; Waterman y Mole, 1994). Carneiro *et al.* (2010) reportó un aumento en el contenido de β -cariofileno (0.1 mg/mL) en *Plectrathuis amboinicus* con un índice pluviométrico de 194 mm, sin embargo, la disminución del índice pluviométrico a 162 mm causó una disminución en el contenido de β -cariofileno (0.08 mg/mL). La especie en estudio, *Acalypha gaumeri* se encuentra ubicada en la península de Yucatán, zona caracterizada básicamente por tres épocas: sequía, lluvias e inicio de sequía. Con la

finalidad de determinar el comportamiento antifúngico y metabólico de *A. gaumeri* en estas tres épocas, en el presente estudio se seleccionaron tres poblaciones de *A. gaumeri*, que presentaron condiciones climáticas y edáficas diferentes. En estos sitios se hicieron colectas seriadas cada tres meses, durante un año con los objetivos de escrutar la actividad antifúngica de los extractos de la raíz de *A. gaumeri* y determinar en los extractos de estas colectas seriadas, la presencia de los metabolitos activos ACR-3J y ACR-3L, aislados previamente de las raíces de *A. gaumeri*.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Analizar las propiedades fungicidas de los extractos etanólicos de la raíz de *Acalypha gaumeri*, de tres poblaciones con condiciones climáticas y edáficas diferentes durante la época de sequía, lluvia e inicio de sequía contra tres fitopatógenos.
2. Determinar la variación cualitativa de dos metabolitos antifúngicos del extracto etanólico de *Acalypha gaumeri* colectada en las tres poblaciones durante la época de sequía, lluvia e inicio de sequía

4.3. MATERIALES Y MÉTODOS

4.3.1. Selección de los sitios

La selección de los sitios se realizó mediante consultas al herbario del Centro de Investigación Científica de Yucatán y del Jardín Botánico de Missouri, EE.UU., donde se encuentra el registro de colectas de la especie estudiada. Con la información obtenida, se mapearon los diferentes sitios o poblaciones para obtener las variables ambientales, climáticas y edáficas de cada una de ellas, mediante la base cartográfica reportada por García y Secaira (2006) y Hijmans *et al.*, (2005). De los datos obtenidos se seleccionaron tres poblaciones por presentar alguna diferencia en las condiciones anteriormente mencionadas. Estos sitios se ubicaron en el Rancho Tixcaltuyub en el municipio de Yaxcabá (latitud norte 20° 25' y longitud oeste 88° 55'), en San Francisco, municipio de Tinum (latitud norte 20° 38' y longitud oeste 88° 27') y en el Rancho grande de Kiuic municipio de Oxkutzcab (latitud norte 22° 24' y longitud oeste 23° 33'), cuyas características se presentan en el Cuadro 4.1 (Fuentes *et al.*, 2000).

Cuadro 4.1. Condiciones climáticas y edáficas de los sitios de muestreo (García y Secaira, 2006; Hijmans *et al.*, 2005).

Localidad	Tmin (°C)	Tmax (°C)	PTA (mm)	Vegetación	Suelo	Tipo de clima	Temperatura	PTA
Yaxcabá (Tixcacaltu yub)	19.21	32.98	1133	Selva mediana caducifolia y subcaduci folia	Cambisol	Aw1(x')	Cálido subhúmedo, temperatura media anual mayor de 22 °C y T del mes más frío mayor de 18 °C.	Mes más seco < 60 mm; lluvias de verano con índice P/T entre 43.2 y 55.3 y porcentaje de lluvia invernal del 5 % al 10.2 % del total anual.
Oxkutzcab (Kiuic)	18.93	32.41	1033	Selva mediana caducifolia y subcaduci folia	Leptosoles vertisoles	Awo	Cálido subhúmedo, T media anual mayor 22 °C y T del mes más frío mayor a 18 °C	Mes más seco < 60 mm; lluvias de verano y porcentaje de lluvia invernal > 10.2 % del total anual.
Tinum (San Francisco)	19.10	32.31	1224	Selva mediana caducifolia y subcaduci folia	Rendzina	Aw1 (x')	Cálido subhúmedo, T media anual mayor de 22 °C y T del mes más frío mayor de 18 °C	Mes más seco < 60 mm; lluvias de verano con índice P/T entre 43.2 y 55.3 y porcentaje de lluvia invernal del 5 % al 10.2 % del total anual.

Tmin: temperatura mínima, Tmax: temperatura máxima y PTA: precipitación.

4.3.2. Recolección del material vegetal

Las plantas de *A. gaumeri* se recolectaron trimestralmente durante el 2011 (febrero, mayo, agosto y noviembre) en cada uno de los sitios seleccionados. Esto considerando la época de sequía (Mayo) y lluvia (Agosto) y el inicio de la sequía en (Noviembre – Febrero) durante el año (Ricalde *et al.*, 2010). Para ello se tomaron un total 15 plantas en cada colecta por sitio, las raíces se lavaron y se secaron por tres días en una estufa de lámparas a una temperatura no mayor de 50°C. Después de obtener el material vegetal seco, éste se fragmentó en un molino de cuchillas (Brabender), se etiquetaron y guardaron para su posterior extracción etanólica (Figura 4.1).



Figura 4.1. Esquema general de la colecta, procedimiento y análisis de las muestras de *Acalypha gaumeri* en colectas seriadas, en tres poblaciones.

4.3.3. Obtención de los extractos de *A. gaumeri*

La extracción etanólica se realizó como se describe en el capítulo II, sección 2.3.1., el material vegetal seco (20 g) se extrajo con etanol (150 mL) tres veces (Cuadro 4.2).

4.3.3.1. Obtención de los extractos ricos en compuestos nitrogenados

Partición líquido-líquido

Cada uno de los extractos crudos EtOH se suspendieron en metanol:agua 1:2 y se extrajeron sucesivamente con hexano (3 ×, 2:1, 1:1, 1:1) y acetato de etilo (AcOEt) (3 ×, 2:1, 1:1, 1:1). El disolvente se eliminó al vacío en un rotavapor hasta sequedad total.

Partición ácido base

La fracción de acetato se suspendió en AcOEt (10 mL) y se particionó con ácido clorhídrico (HCl) al 5 % (pH = 3), obteniendo la fase orgánica ácida de acetato. La fase acuosa residual se basificó con hidróxido de potasio (KOH) (pH = 10) y se extrajo con AcOEt, para obtener la fracción rica en compuestos nitrogenados (Cuadro 4.2).

4.3.4. Perfil químico de los extractos

4.3.4.1. Perfil químico por cromatografía de capa delgada (CCD)

El monitoreo de los metabolitos se realizó por cromatografía de capa delgada (CCD), utilizando cromatofolios de aluminio impregnados con gel de sílice 60F254 (E.M. Merck DC-Alufolien de 0.25 mm de espesor) e indicador de fluoresceína. Los extractos ricos en compuestos nitrogenados (Cuadro 4.2) se disolvieron con metanol al 4 % y se aplicaron con una micropipeta a la placa cromatográfica con un volumen de 1 μ L. Las placas se eluyeron con diferentes mezclas de disolventes: a) diclorometano: metanol: hidróxido de amonio 85 15: 0.9 %, b) butanol: agua: hidróxido de amonio 8:1:1 y c) butanol: ácido acético: agua 7:1:2.

4.3.5. Evaluación de la actividad antifúngica mediante el bioensayo en microdilución

La evaluación antifúngica de los extractos etanólicos (EE) se realizó con el bioensayo en microdilución descrito en el capítulo II, sección 2.3.2.3, en el cual se determinó la inhibición de la germinación de esporas (IGE) de *Mycospaherella fijiensis*.

La suspensión de esporas de *Alternaria chrysanthemi* y *Colletotrichum gloeosporioides* se obtuvieron después de siete días de crecimiento en medio extracto de malta (18 ± 2 °C en oscuridad) y PDA (23 ± 2 °C, a luz natural), respectivamente. Posteriormente, con la ayuda de un portaobjetos estéril se removieron las esporas, para filtrar y ajustar con un hemocitómetro la concentración de esporas a 5×10^4 esporas/mL y 2×10^5 , respectivamente. Contra *M. fijiensis* la suspensión se obtuvo como se describe en el capítulo II, sección 2.3.4.3.1. Finalmente, la concentración de esporas de *A. chrysanthemi*, *C. gloeosporioides* y *M. fijiensis* se evaluó a 2.5×10^4 , 1×10^5 y 2.5×10^5 esporas/mL, respectivamente. Los extractos se evaluaron contra *A. chrysanthemi* y *C. gloeosporioides* a una concentración de 2000, 1000, 500 y 250 μ g/mL y contra *M. fijiensis* a 500, 250 y 125 μ g/mL. Las lecturas para cada fitopatógeno se realizaron a las 96 horas después de que se expusieron al extracto. Los resultados se describen en el capítulo II, sección 2.3.4.3.1.

4.3.6. Análisis estadístico

Los datos del porcentaje de IGE obtenidos de las diferentes colectas se analizaron mediante un análisis de varianza con múltiple factores usando el paquete estadístico SPSS versión 18 con el software Windows. Para cumplir con la distribución de

normalidad datos se sometieron a la prueba de Bonferroni, para su descripción y análisis mediante estadística no paramétrica.

4.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La Península de Yucatán es una zona que se caracteriza por tener un clima tropical y según la distribución de las lluvias (periodo de un año), se puede dividir en tres épocas: inicio de sequía (Noviembre – Febrero), sequía (Marzo – Mayo) y lluvias (Junio – Octubre). En el presente trabajo, se verificó la influencia de las condiciones climáticas y edáficas en tres poblaciones (Oxkutzcab, Tinum y Yaxcabá) de *Acalypha gaumeri* en cuanto al rendimiento y actividad antifúngica de los extractos de sus raíces. El material vegetal se obtuvo de cuatro colectas trimestrales en las tres poblaciones y en las tres épocas anteriormente mencionadas para la península de Yucatán.

4.4.1. Rendimiento de los extractos etanólicos de la raíz de *Acalypha gaumeri*

Los resultados de rendimiento, muestran un comportamiento similar en todas las poblaciones, sin embargo, en el mes de mayo, en el periodo de sequía, se obtuvo el más alto rendimiento (2.2 – 3.1 %) del EE en las tres poblaciones, comparado con las otras dos épocas (Cuadro 4.2).

Cuadro 4.2. Rendimiento de la extracción etanólica de cada una de las colectas de *Acalypha gaumeri* realizadas en los tres sitios.

Poblaciones de colecta	Rendimiento de los extractos (%)			
	Sequía	Lluvia	Inicio de sequía	
	Mayo	Agosto	Febrero	Noviembre
Oxkutzcab	2.2.	1.7	1.8	1.3
Tinum	2.7	1.5	1.7	1.5
Yaxcabá	3.1	1.4	1.5	1.4

4.4.2. Evaluación de la actividad antifúngica

4.4.2.1. Actividad antifúngica contra *Alternaria chrysanthemi*

El análisis de la actividad antifúngica de los 12 extractos (Cuadro 4.3) contra *A. chrysanthemi*, permitió observar diferencia estadística entre épocas, pero no entre poblaciones ($p \leq 0.01$). En general, las tres poblaciones de *A. gaumeri* mostraron una alta efectividad en *A. chrysanthemi*. ($IGE \geq 75\%$). No así entre colectas, donde se detectó marcada diferencia solo en el mes de mayo ($p \leq 0.01$) con una menor actividad en todas las poblaciones. Los extractos en lluvia e inicio de sequía presentaron la mayor

actividad antifúngica con este patógeno, no encontrándose diferencia significativa entre ambos periodos (94 – 100 %) ($p \leq 0.1$).

Cuadro 4.3. Inhibición de la germinación de esporas (IGE) con los extractos etanólicos de *Acalypha gaumeri* (1000 µg/mL) contra *Alternaria chrysanthemi*.

Poblaciones de colecta	Porcentaje de inhibición de la germinación (1000 µg/mL)			
	Sequía •	Lluvia ••	Inicio de sequía ••	
	Mayo _b	Agosto _a	Noviembre _a	Febrero _a
Oxkutzcab _x	88 ± 14.4	100 ± 0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0
Tinum _x	75 ± 0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0
Yaxcabá _x	75 ± 0.0	94 ± 12.5	100 ± 0.0	100 ± 0.0

Nota: Columnas (Colecta y época), con las misma letra o número de asteriscos son estadísticamente iguales según la prueba Bonferroni ($P = 0.5$) y Filas (Poblaciones) con la misma letra son estadísticamente iguales por la misma prueba.

4.4.2.2. Actividad antifúngica contra *Colletotrichum gloeosporioides*

El análisis estadístico indicó diferencias significativas ($p \leq 0.01$) entre el porcentaje de IGE de *C. gloeosporioides* tanto en las poblaciones, época del año y mes de colecta de *A. gaumeri* (Cuadro 12). La población Tinum mostró los más altos porcentajes de IGE de *C. gloeosporioides* durante las tres épocas (63 – 100%). La varianza de las colectas permitió separar al extracto de febrero con los mayores porcentajes de IGE en todas las poblaciones (63 – 75 %) ($p \leq 0.01$), contrastando con la colecta realizada en noviembre en la misma época. Asimismo, el material obtenido en los meses de mayo y agosto no presentó diferencia estadística significativa ($p \leq 0.1$) entre ellas (cuadro 4.4).

Cuadro 4.4. Porcentaje de inhibición de la germinación de los diferentes extractos etanólicos de *Acalypha gaumeri* (1000 µg/mL) contra *Colletotrichum gloeosporioides*.

Poblaciones	Porcentaje de inhibición de la germinación (1000 µg/mL)			
	Sequía ••	Lluvia •	Inicio de sequía ••	
	Mayo _b	Agosto _b	Noviembre _c	Febrero _a
Oxkutzcab _y	63 ± 14.3	0 ± 0.0	0 ± 0.0	75 ± 0.0
Tinum _x	63 ± 14.3	100 ± 0.0	0 ± 0.0	69 ± 12.5
Yaxcabá _y	38 ± 14.3	44 ± 12.5	0 ± 0.0	63 ± 14.3

Nota: Columnas (Colecta y época), con las misma letra o número de asteriscos son estadísticamente iguales según la prueba Bonferroni ($p = 0.05$) y Filas (Poblaciones) con la misma letra son estadísticamente iguales por la misma prueba.

4.4.2.3. Actividad antifúngica contra *Mycosphaerella fijiensis*.

El análisis de varianza con los 12 EE indicó que existe diferencia estadística significativa entre las colectas, las épocas y entre las poblaciones ($p \leq 0.01$). La prueba de varianza entre poblaciones indicó que la actividad antifúngica de las plantas en Yaxcabá (75 – 100 %) y Oxkutzcab (56 – 100 %) son estadísticamente iguales ($p \leq 0.05$). Ambas poblaciones presentaron un buen porcentaje de IGE en *M. fijiensis* (cuadro 4.5). Las colectas de agosto (lluvia) y noviembre presentaron los más altos porcentajes de IGE contra *M. fijiensis* (IGE = 92 – 100 %) en todas las poblaciones. La época de lluvia presentó mayor actividad contra *M. fijiensis* que la época de sequía e inicio de sequía, observándose diferencia estadística significativa entre todas las épocas ($p \leq 0.01$).

Cuadro 4.5. Porcentaje de inhibición de la germinación de los diferentes extractos etanólicos de *Acalypha gaumeri* (500 µg/mL) contra *Mycosphaerella fijiensis*.

Poblaciones	Porcentaje de inhibición de la germinación (500 µg/mL)			
	Sequía *	Lluvia ***	Inicio de sequía **	
	Mayo _c	Agosto _a	Noviembre _a	Febrero _b
Oxkutzcab _{xy}	56 ± 12.5	100 ± 0.0	92 ± 12.5	88 ± 14.4
Tinum _y	69 ± 12.5	100 ± 0.0	100 ± 0.0	56 ± 12.5
Yaxcabá _x	75 ± 0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0	75 ± 0.0

Nota: Columnas (Colecta y época), con las misma letra o número de asteriscos son estadísticamente iguales según la prueba Bonferroni ($p = 0.05$) y Filas (Poblaciones) con la misma letra son estadísticamente iguales por la misma prueba.

La determinación de la CMI de los extractos se realizó contra cada uno de los hongos patógenos evaluados. Este análisis permitió observar que la población de Tinum, en el periodo de lluvias (AV-3b) presentó el mayor efecto antifúngico contra los tres fitopatógenos. Asimismo, durante el inicio de la sequía se observó una buena actividad contra *A. chrysanthemi* y *M. fijiensis* (Cuadro 4.6).

Cuadro 4.6. Concentración mínima inhibitoria (CMI) de los extractos etanólicos de las diferentes colectas contra *Alternaria chrysanthemi*, *Colletotrichum gloeosporioides* y *Mycosphaerella fijiensis*.

Época	Clave EN	Clave EE	CMI (µg/mL)		
			<i>A. chrysanthemi</i>	<i>C. gloeosporioides</i>	<i>M. fijiensis</i>
Sequía (Mayo)	AV-24	AV-2a	> 1000	> 1000	1000
	AV-25	AV-2b	> 1000	> 1000	1000
	AV-26	AV-2c	> 1000	> 1000	1000
Lluvia (Agosto)	AV-27	AV-3a	1000	> 1000	500
	AV-28	AV-3b	500	1000	500
	AV-29	AV-3c	> 1000	> 1000	500
Inicio de sequía (Febrero y noviembre)	AV-21	AV-1a	1000	> 1000	1000
	AV-22	AV-1b	1000	> 1000	1000
	AV-23	AV-1c	1000	> 1000	1000
	AV-30	AV-4a	1000	> 1000	1000
	AV-31	AV-4b	1000	> 1000	500
	AV-32	AV-4c	1000	> 1000	500

*Nota: CMI: concentración mínima inhibitoria, EN: extractos nitrogenados utilizados para el perfil químico, EE: extractos etanólicos para la evaluación antifúngica; Claves: 1: Primera colecta realizada en el mes de febrero, 2: Segunda colecta realizada en el mes de mayo, 3: Tercera colecta realizada en agosto y 4: Cuarta colecta realizada en noviembre a: Oxxutzcab, b: Tinum y c: Yaxcabá.

4.4.3. Perfil químico por cromatografía de capa delgada (CCD)

Cada uno de los EE de las colectas se sometieron a una partición ácido-base para limpiar y concentrar los principios antifúngicos tipo alcaloidal de *A. gaumeri* (Capítulo III). Posteriormente, se analizaron por cromatografía de capa delgada, siendo revelados bajo la luz ultravioleta de onda corta, onda larga, con ácido fosfomolibdico y el reactivo de Dragendorff. Como referencias se utilizaron los compuestos argaumerina y ACR-3L previamente aislados y detectados como dos de los principios antifúngicos de *A. gaumeri* contra *M. fijiensis*.

Los compuestos alcaloidales argaumerina y ACR-3L se observaron por CCD a un R_f de 0.48 y 0.32 en el sistema *n*-butanol: ácido acético:agua (7:1:2), respectivamente (Figura 4.2). Los perfiles de los diferentes EE por CCD revelan una gran similitud, donde destacan los dos compuestos alcaloidales. El metabolito argaumerina se observó como mayoritario en todas las fracciones, seguido de ACR-3L. Este último compuesto se observó con mayor intensidad en las tres poblaciones en el mes de agosto o época de lluvia, periodo reportado con la mayor actividad antifúngica contra los tres patógenos.

Estos resultados comprueban lo obtenido en el proceso de purificación y lo reportado en el capítulo III, ya que el compuesto semi- puro ACR-3L es el más activo contra los dos patógenos, por lo tanto es uno de los principios responsables de la actividad antifúngica en el extracto etanólico obtenido en Tinum durante la época de lluvia.

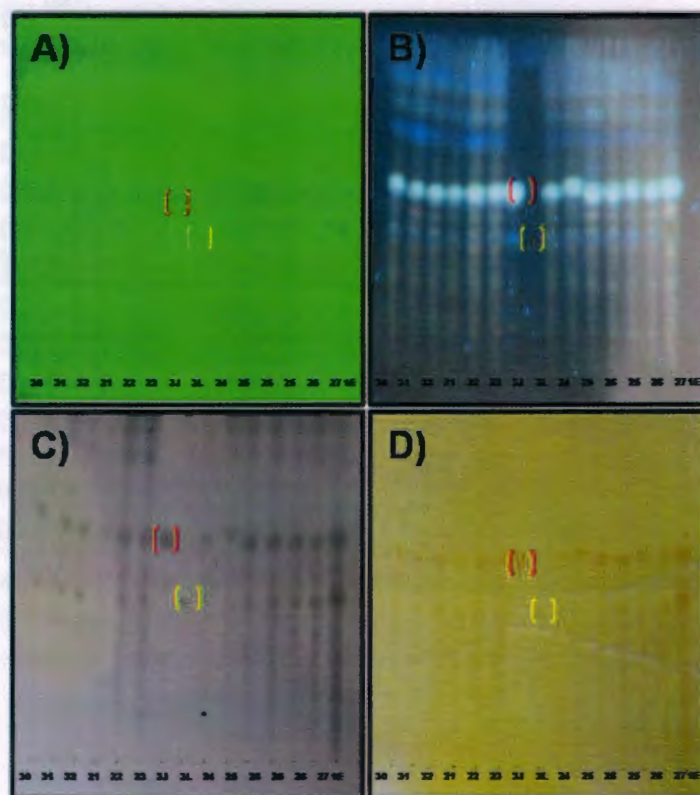


Figura 4.2. Perfil químico de los extractos nitrogenados de *Acalypha gaumeri* en un sistema: *n*-butanol: ácido acético: agua 7:1:2, A) placa cromatográfica observada a onda corta, B) placa cromatográfica observada a onda larga, C) placa cromatográfica revelada en ácido fosfomolibdico y D) placa cromatográfica revelada con Dragendorff. El corchete de color rojo indica la presencia de estándar argaumerina y el corchete de color amarillo el compuesto semi-puro estándar ACR-3L.

Aunque no se encontraron diferencias en el perfil químico por CCD la variación en la actividad antifúngica en los EE puede atribuirse a la concentración de los metabolitos argaumerina y ACR-3L. Además existen otros compuestos con actividad que no son de naturaleza alcaloidal y que probablemente se encuentran en el EE. En estudios previos, las raíces de *A. gaumeri* colectadas en Oxkutzcab (Kiuic) en agosto y mayo se sometieron a extracciones sucesivas y partición con disolventes de polaridad ascendente. En estos, la actividad se observó en los extractos de mediana polaridad

contra *M. fijiensis* y *C. gloeosporioides*, lo cual se correlaciona con los resultados de este trabajo; y adicionalmente, la fracción hexánica de baja polaridad presentó actividad antifúngica únicamente contra *C. gloeosporioides* (Avendaño-Ortiz, 2012). Los resultados de este trabajo sugieren que existen otros compuestos de baja polaridad, de naturaleza no alcaloidal encontrados en el EE y que debido a la partición acido-base no se pueden observar en la placa por CCD.

Por otra parte, es importante mencionar que los extractos de las colectas se sometieron a análisis por cromatografía de gases acoplado a masas (CG-EM) y cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR). En el primer caso, los compuestos alcaloidales (Argaumerina y ACR-3L) de las muestras no se volatilizaron, por lo que no se analizaron con esta técnica. En el cromatógrafo de líquidos, por fase reversa los compuestos estándares argaumerina y ACR-3L se detectaron con un tiempo de retención de 2.42 y 2.57 minutos, respectivamente (sistema Metanol:agua 60:40) a una longitud de onda de 254 nm. Al analizar el extracto nitrogenado ACR-28 (Tinum, agosto) se observó nuevamente la presencia del compuesto semi-puro ACR-3L con un tiempo de retención de 2.54 minutos; no encontrando el compuesto argaumerina, pero debido a la similitud de ambos compuestos podría estar dentro del mismo pico como se observa en cromatograma (Anexo 5). Por lo tanto, es necesario realizar más pruebas con otros sistemas, otras columnas y otras condiciones para separar adecuadamente estos compuestos por CLAR y a futuro cuantificar su contenido.

Las diferencias en el análisis estadístico en relación a la actividad en las poblaciones, indican que las condiciones climáticas y edáficas en que se desarrollan las plantas de *A. gaurmeri* influye en sus propiedades biológicas y con mucha seguridad en su metabolismo secundario. Asimismo, se observó que la actividad varía entre épocas dentro de la misma población, permitiendo separar a la población de Tinum por presentar una actividad alta contra los tres fitopatógenos evaluados durante el mes de agosto (lluvias). Los reportes en la literatura indican que las plantas cierran sus estomas e interrumpen la fotosíntesis durante un estrés hídrico, lo que puede causar un efecto negativo en la producción de metabolitos secundarios, posible razón por la cual en el periodo de sequía se observó un decremento en la actividad antifúngica. Ejemplo de ello es el trabajo realizado por Jaleel *et al.* (2007) el cual encontró un aumento en la producción de alcaloides indólicos en *Catharanthus roseus* cuando se sometió a un déficit de agua. Por el contrario existe una disminución en el contenido de swasonina en *Astragalus mollissimus* bajo un déficit hídrico (Vallotton *et al.*, 2012). Este es el primer

estudio realizado, donde se correlaciona la actividad antifúngica con respecto a las épocas analizadas. En publicaciones recientes, se reporta este tipo de actividad, pero de acuerdo a las condiciones geográficas en las cuales se realizaron estos estudios se analizan otras estaciones del año, como primavera, verano, invierno y otoño (Derita *et al.*, 2009; Ncube *et al.*, 2011). Sin embargo, en la literatura reportan otro tipo de actividades, como el trabajo realizado por González-Salvatierra *et al.* (2010), en el cual determinaron mayor actividad antioxidante en los extractos de *Tillandsia brachrycaulos* colectados durante la época de sequía. El estudio fitoquímico de esta planta indicó la presencia de compuestos de naturaleza fenólica, los cuales son utilizados por la planta para evitar el daño celular causado por altas temperaturas y alta radiación UV. La producción de este tipo de compuestos podría favorecerse durante el periodo de sequía en *A. gaumeri* y por lo tanto, aumentar su rendimiento. Sin embargo, no existe una relación directa entre el incremento en rendimiento y actividad antifúngica (Gazim *et al.*, 2010).

En el presente trabajo se analizó de igual forma la época de inicio de sequía la cual comprendió dos colectas realizadas en los meses de febrero y noviembre. Los resultados indican diferencias significativas en la respuesta de los patógenos *C. gloeosporioides* (mayor actividad en febrero) y *M. fijiensis*, (mayor actividad en noviembre) a pesar de estar catalogadas dentro de la misma época. Esto podría deberse a que en noviembre (final de período de lluvias) hay mayor humedad comparado con febrero (inicio de sequía). En *M. fijiensis* los extractos con mayor efecto correspondieron a las colectas realizadas en la época de lluvias y en noviembre, cuando inicia la sequía. Esto podría deberse a que en la época de lluvias existe mayor humedad y por lo tanto mayor cantidad de patógenos, parásitos e insectos (Montes-Belmont, 2009). En relación a *C. gloeosporioides*, se observó una mayor actividad del EE cuando existe una menor humedad, durante la época inicio de sequía en febrero y en la época de sequía (mayo). Sin embargo, en ambos casos cuando la sequía se prolongó durante Mayo, causó una disminución en la actividad. Existen reportes que indican que el déficit de agua puede favorecer la producción de metabolitos secundarios, sin embargo, cuando éste se prolonga, causa un efecto adverso desfavoreciendo la producción de los mismos (Gobbo-Neto y López, 2007; Waterman y Mole, 1994).

Asimismo, se observó que la actividad es diferente contra cada fitopatógeno, siendo el más sensible *M. fijiensis*, seguido de *A. chrysanthemi* y *C. gloeosporioides*. En resumen, los resultados indican que las plantas de *A. gaumeri* según el periodo en que se

colectan, tienen la capacidad de producir compuestos con mayor especificidad para inhibir el crecimiento de cada uno de los patógenos, demostrando el arsenal químico que esta planta presenta y por lo tanto su potencial para ser utilizada en un futuro cercano como un producto natural en la agricultura.

4.6. CONCLUSIONES

El mayor rendimiento de la extracción de los metabolitos secundarios de la raíz de *A. gaumeri* se encontró en la población de Yaxcabá durante la época de sequía. Sin embargo, el efecto antifúngico más alto se observó con la población de Tinum, contra los tres fitopatógenos evaluados. Esta misma población demostró la menor CMI contra los tres fitopatógenos en agosto, por lo tanto, ésta es la mejor época para colectar a la especie *A. gaumeri*.

El perfil químico indicó que los compuestos aislados argaumerina y ACR-3L se encuentran en todos los extractos y que la actividad varía de acuerdo a su contenido en cada una de ellas.

4.7. BIBLIOGRAFÍA

- Avendaño-Ortiz, V. A. (2012). Propagación de *Acalypha gaumeri* ex situ y evaluación antifúngica de la raíz en el control de *Colletotrichum gloeosporioides* y *Mycosphaerella fijiensis*. Memoria de residencia profesional. Instituto Tecnológico del Valle de Oaxaca. 67 p.
- Bazaaz, F., N. Chiariello, P. Coley y L. Pitelka (1978). Herbal medicine in Jordan with special emphasis on commonly used herbs. Bioscience, 37, 58 – 67.
- Carneiro, F.B., I.D. Júnior, P.Q. Lopes y R.O. Macêdo (2010). Variação da quantidade de β -cariofileno em óleo essencial de *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng., Lamiaceae, sob diferentes condições de cultivo. Revista Brasileira de Farmacognosia, 20(4), 600 – 606.
- Chaves, T.P., C.P. Santana, G. Vêras, D.O. Brandão, D.C. Felismino, A.C.D. Medeiros y D.M.B.M. Trovão (2013). Seasonal variation in the production of secondary metabolites and antimicrobial activity of two plant species used in Brazilian traditional medicine. African Journal of Biotechnology, 12(8), 847 – 853.
- Derita, M.G., M.L. Leiva y S.A. Zacchino (2009). Influence of plant part, season of collection and content of the main active constituent, on the antifungal properties

- of *Polygonum acuminatum* Kunth. Journal of Ethnopharmacology, 124, 377–383.
- Fuentes, F.V., M.M. Granda, M.L. Hernández y C.A. Rodríguez (2000). Estudios fenológicos en plantas medicinales XI. Revista Cubana de Planta Medica, 5 (3), 106 – 113.
- García, G. y F. Secaira (2006). Una visión para el futuro: Cartografía de las Selvas Maya Zoque y Olmeca: Plan Ecorregional de las selvas Maya, Zoque y Olmeca. Pronatura Península de Yucatán-The Nature Conservancy. CI, Ecosur FDN, PFB, PPY, TNC y WCS. Infoterra Editores, Sna José, Costa Rica.
- Gazim, Z.C., A.C.L. Amorim, A.M.C. Hovell, C.M. Rezende, I.A. Nascimento, G.A. Ferreira y D.A.G. Cortez (2010). Seasonal variation, chemical composition, and analgesic and antimicrobial activities of the essential oil from eaves of *Tetradenia riparia* (Hochst.) Codd in Southern Brazil. Molecules, 15, 5509 – 5524.
- Gobbo-Neto, L. y N.P. Lopes (2007). Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. Quimica Nova, 30(2), 374 – 381.
- González-Sañvatierra, C., J.L. Andrade, F. Escalante-Erosa, K. García-Sosa y L.M. Peña-Rodríguez (2010). Antioxidant content in two CAM bromeliad species as a response to seasonal light changes in a tropical dry deciduous forest. Journal of Plant Physiology, 167, 792 – 799.
- Hijmans, R. J., S. E. Cameron, J. L. Parra, P. G. Jones y A. Jarvis (2005). Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. International Journal of Climatology, 25(15), 1965 – 1978.
- Jaleel, C.A., P. Manivannan, A. Kishorekumar, B. Sankar, R. Gopi, R. Somansundaram y R. Panneerselvam (2007). Alterations in osmoregulation, antioxidant enzymes and indole alkaloid levels in *Catharanthus roseus* exposed to water deficit Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 59(2), 150 – 157.
- Montes-Belmont, R. (2009). Diversidad de compuestos químico producidos por las plantas contra hongos fitopatógenos. Revista Mexicana de Micología, 29, 73 – 82.
- Ncube, B., J.F. Finnie y J. Van Staden (2011). Seasonal variation in antimicrobial and phytochemical properties of frequently used medicinal bulbous plants from South Africa. South African Journal of Botany, 77, 387 – 396.

- Ncube, B., J.F. Finnie y J.V. Staden (2012). Quality from the field: The impact of environmental factors as quality determinants in medicinal plants. *South African Journal of Botany*, 82, 11– 10.
- Palá-Paúl, J., M.J. Pérez-Alonso, A. Velasco-Negueruela, R. Palá-Paúl, J. Sanz y F. Conejero (2001). Seasonal variation in chemical constituents of *Santolina rosmarinifolia* L. ssp. *rosmarinifolia*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 29(7), 663 – 672.
- Pietrini, F., M.A. Lannelli y A. Massacci (2002). Anthocyanin accumulation in the illuminated surface of maize leaves enhances protection from photo-inhibitory risks at low temperature, without further limitation to photosynthesis. *Plants Cell Environment*, 25, 1251 – 1259.
- Radušienė, J., B. Karpavičienė y Ž. Stanius (2012). Effect of external and internal factors on secondary metabolites accumulation in St. John's wort. *Botanica Lithuanica*, 18(2), 101 – 108.
- Ricalde, M.F., J.L. Andrade, R. Duran, J.M. Dupuy, J.L. Simá, R. Us-Santamaría y L.S. Santiago (2010). Environmental regulation of carbon isotope composition and crassulacean acid metabolism in three plant communities along a water availability gradient. *Oecologia*, 164, 871 – 880.
- Salisbury, F.B. y C.W. Ross (1991). Inhibition of the growth of cariogenic bacteria *in vitro* by plant flavanones. *Plant Physiology*, 2, 71 – 75.
- Vallotton, A.D., L.W. Murray, K.J. Delaney y T.M. Sterling (2012). Water deficit induces swainsonine of some locoweeds taxa, but with no swainsonine-growth trade-off. *Acta Oecologica*, 43, 140 – 149.
- Waterman, P.G. y S. Mole (1994). *Analysis of phenolic plant metabolites*. 1. ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications. pp. 325 – 327.

CAPÍTULO V. PROPAGACIÓN DE *Acalypha gaumeri*

5.1. INTRODUCCIÓN

Las plantas son una fuente importante de productos bioactivos debido a la complejidad y variabilidad de su metabolismo secundario. La península de Yucatán presenta una flora nativa muy característica dadas sus condiciones climáticas y edáficas. Estudios realizados en esta zona reportan al menos 2,330 especies de plantas con flores, de las cuales 168 son endémicas o nativas (Durán *et al.*, 1997). Sin embargo, el reino vegetal experimenta un acelerado proceso de extinción debido en parte, a las pocas medidas que se han tomado para proteger sus hábitats. Por tal razón, es importante conocer el potencial biológico de la flora y plantear estrategias de conservación de las especies (Iriondo-Alegría, 2001).

Acalypha gaumeri Pax Hoffm. es un arbusto que pertenece a la familia Euphorbiaceae, considerada endémica de la región peninsular, la cual ha mostrado actividad antifúngica contra patógenos de cultivos de importancia económica: *Alternaria tagetica*, *A. chrysanthemi*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium oxysporum* y *Rhizopus* sp. (Gamboa-Angulo *et al.*, 2008; Vargas-Díaz, 2009). Asimismo, ha presentado actividad contra el nematodo *Meloidogyne incognita* (Cristobal *et al.*, 2006) y el insecto *Bemisia tabaci* (Cruz-Estrada *et al.*, 2013). En un estudio antifúngico, se evaluaron diferentes partes de la planta contra diversos patógenos y se concluyó que sólo la parte radical muestra esta propiedad (Gamboa-Angulo *et al.*, 2008). Con el propósito de darle continuidad a estos trabajos y conservar este recurso natural, se decidió diseñar estrategias de propagación de la especie *in situ* con el objetivo de promover su uso sostenible en la región.

5.2. OBJETIVO ESPECÍFICO

1. Evaluar las posibilidades de propagación de *A. gaumeri* mediante semillas o esquejes a nivel vivero.

5.3. MATERIALES Y MÉTODOS

5.3.1. Propagación vegetativa por esqueje

5.3.1.1. Colecta de esquejes

Los esquejes se obtuvieron de plantas provenientes de campo de la población de Yaxcabá, Yucatán, a las cuales se les eliminaron las hojas para su transporte al vivero del Centro de Investigación Científica de Yucatán. La planta se estratificó en tres partes:

basal, media y distal. En cada estrato, se cortaron esquejes de aproximadamente 15 cm conteniendo por lo menos cinco yemas (Castrillón *et al.*, 2008).

5.3.1.2. Siembra de esquejes

Los esquejes de cada estrato se trataron con ácido indolbutírico (AIB, Raizone*-Plus®) a una concentración de 0.06 % (Yamamoto *et al.*, 2010) y se incluyeron como tratamientos control esquejes de *A. gaumeri* libres de AIB en cada uno de los estratos de planta (Castrillón *et al.*, 2008). Se utilizaron seis esquejes por replica, con cinco repeticiones por tratamiento (30 unidades). Posteriormente, los esquejes se sembraron en charolas de poliestireno en sustrato comercial Cosmopeat®-tierra-agrolita en relación 1:2:1. Se mantuvieron en condiciones protegidas a una temperatura de 35.1 ± 2.3 °C y una humedad de 64.2 ± 7.8 %. La variable respuesta se determinó a los 60 días posteriores al establecimiento de los tratamientos y consistió en estimar el porcentaje de esquejes enraizados (PEE) aplicando la ecuación: $PEE = (\text{número de esquejes enraizados} / \text{número total de esquejes}) \times 100$ (Da Silva *et al.*, 2006).

5.3.2. Propagación sexual o por semillas

5.3.2.1. Colecta de semillas

Las semillas se obtuvieron a partir de plantas de invernadero provenientes de colectas de Yaxcabá, Yucatán, debido a su tamaño y a la complejidad de su colecta en campo. Para su recolección se colocaron trampas de agribón en ramas con frutos. Las semillas que se obtuvieron se depositaron en bolsas de papel estraza, para su transporte al laboratorio de Biotecnología, perteneciente al Centro de Investigación Científica de Yucatán. Se dejaron secar a temperatura ambiente en sombra durante tres días, posteriormente se almacenaron a 20 °C hasta su uso (Sano *et al.*, 1995).

5.3.2.2. Siembra de semillas

Un total de 100 semillas se trataron con solución de Benomil al 2.5 % por 20 minutos, para evitar la presencia de hongos contaminantes. Se dejaron secar por una hora, posteriormente se sembraron en charolas de poliestireno a una profundidad de 1-2 cm aproximadamente, en un sustrato comercial Cosmopeat®-tierra-agrolita en relación 1:2:1 y se cubrieron con plástico transparente para mantener la humedad y el paso de la luz. El número de semillas germinadas se contó semanalmente para determinar su viabilidad (Sano *et al.*, 1995).

5.3.3. Análisis estadísticos

En la propagación por esqueje se realizó un análisis de varianza y comparación de medias mediante la prueba de Tukey ($P=0.05$).

5.4. RESULTADOS Y DISCUSION

5.4.1. Propagación por esqueje

Los análisis estadísticos mostraron a los 30 días diferencias altamente significativas ($p \leq 0.01$) en el porcentaje de enraizamiento con los diferentes tratamientos. Los esquejes provenientes del estrato medio de la planta presentaron los mayores porcentajes de enraizamiento (96 %), cuando se trataron con 0.06 % de la auxina (AIB) y en ausencia de ella la viabilidad de enraizamiento decayó al 47%, mostrando estadísticamente el mismo comportamiento que los esquejes provenientes de la parte basal tratados con AIB (Figura 5.1). Asimismo, no se encontraron diferencias estadísticas significativas ($p=0.05$) en el enraizamiento, cuando los esquejes provenientes de la parte basal se trataron con o sin AIB (48 y 40 %, respectivamente) (Figura 5.1). Los esquejes de la parte distal después de un periodo de 15 días, se marchitaron y murieron ya que eran muy delgados, razón por la cual se decidió no continuar utilizando esta parte de la planta en estudios posteriores.

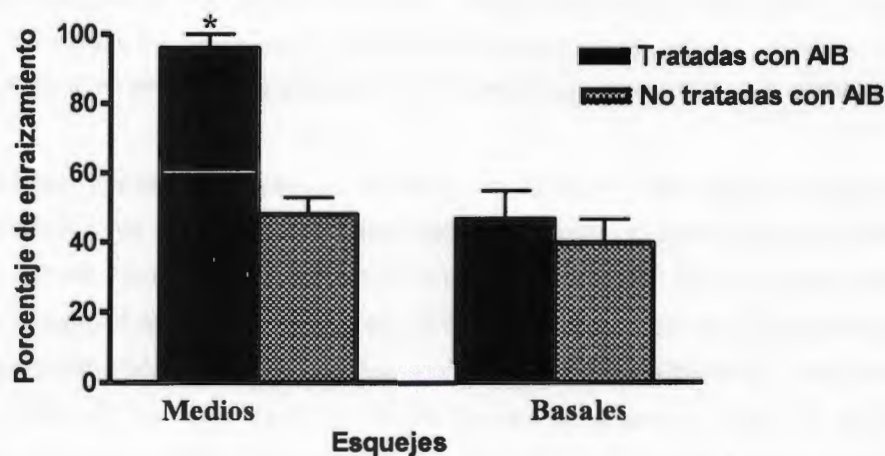


Figura 5.1. Porcentaje de enraizamiento de esquejes provenientes de la parte media y basal de la planta con tratamiento con y sin auxinas. El asterisco sobre la barra indica diferencia estadística significativa según la prueba de Tukey

Los resultados indican que los esquejes de la parte media responden mejor al tratamiento con la hormona AIB (Figura 5.2 A) mostrando más ramificaciones y mejor vigor en las raíces, que los originados de la parte basal, los cuales están aparentemente

más lignificados, lo cual confirma la propuesta de Hanson (1978), en la que indicó que los esquejes con menor grado de lignificación responden mejor al efecto del AIB.

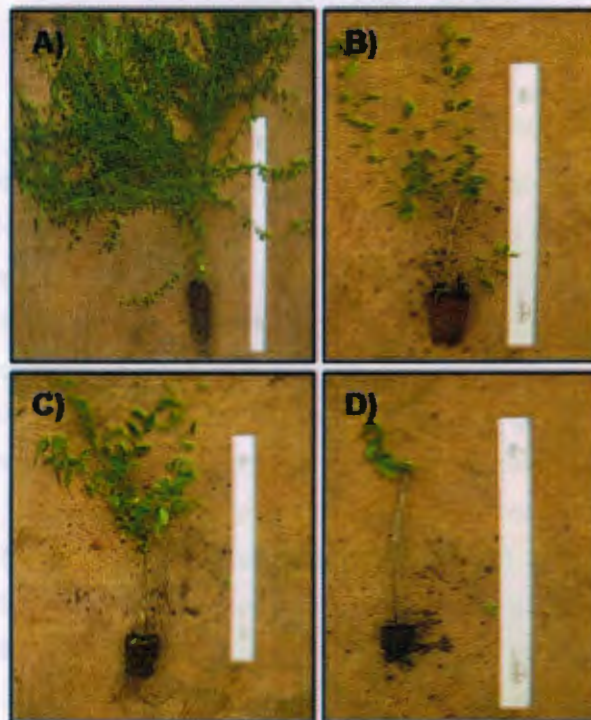


Figura 5.2. Esquejes de *Acalypha gaumeri* después de 60 días A) Esqueje proveniente de la parte media con auxinas, B) Esqueje proveniente de la parte media sin auxinas, C) Esquejes provenientes de la parte basal con auxinas y D) Esquejes provenientes de la parte basal sin auxinas.

Respuesta similar se presentó en *Psidium guajava*, *Vaccinium meridionale* y *Berberidopsis corallina* cuando se les aplicó AIB (Cardoso *et al.*, 2011; Castellón *et al.*, 2008; Latsague *et al.*, 2008; Yamamoto *et al.*, 2010). La aplicación de AIB está bien documentada en la propagación vegetativa, ya que promueven la formación de raíces adventicias. Por ejemplo, el AIB puede incrementar la concentración interna de auxinas, reforzar su efecto y mejorar la calidad de las raíces (Moreno *et al.*, 2009). El ácido indolbutírico es la auxina más utilizada para promover el enraizamiento, principalmente porque no es tóxica en una amplia gama de concentraciones, es efectiva para un gran número de especies y es más estable químicamente que el ácido indolacético (AIA), al contacto con el sustrato de propagación (Hartmann *et al.*, 2002). También se caracteriza porque es una sustancia fotoestable, de acción localizada y menos sensible a la degradación biológica en comparación a las demás auxinas sintéticas (Fachinello *et al.*, 1995).

5.4.2. Propagación por semilla

En la propagación por semilla se observó un porcentaje de germinación del $51 \pm 3.6 \%$, lo cual representó un promedio aceptable con base en los trabajos de Sierra-Escobar, *et al.*, (2005), quienes evaluaron la germinación de ocho especies silvestres: *Cleome speciosa*, *Gaultheria erecta*, *Monnina angustata*, *Oreopanax floribundum*, *Palicourea* sp., *Stigmaphyllon* sp., *Tournefortia fuliginosa* y *Vaccinium corymbodendrom*, obteniendo porcentajes de germinación que oscilaron entre 58 – 90 %, el primer valor se obtuvo con *Stigmaphyllon* sp. y en el segundo con *Oreopanax floribundum*. En especies silvestres, la pérdida de viabilidad de la semilla se debe a la acelerada pérdida de la humedad (Hay y Probert, 2013). Estas semillas son clasificadas como recalcitrantes ya que son inviables cuando llegan a contener entre 12 – 30 % de contenido en humedad.

Para aumentar el porcentaje de germinación, se sugiere aplicar técnicas como: la escarificación mecánica, la aplicación de ácidos (sulfúrico y clorhídrico), el uso de disolventes orgánicos o bien el uso de agua, para ablandar las cubiertas y bloquear las sustancias inhibitoras de la germinación (Duran *et al.*, 1997; Iriondo-Alegría, 2001). Algunas de estas técnicas se evaluaron para observar el efecto sobre la germinación de *A. gaumeri*, sin embargo, se estimó un decremento en la germinación (datos no presentados).

Por otra parte, la propagación vegetativa por esqueje es una técnica que ha adquirido gran importancia en la multiplicación y conservación de especies en peligro de extinción o amenazadas. Esta técnica, permite fijar información genética a través de generaciones, obteniendo plantaciones uniformes, o bien, cuando las especies presentan semillas recalcitrantes que requieren procedimientos de manejos especiales y a menudo complicados. También, permite conservar genotipos que determinan características genéticas favorables (plantas élite) y además de acortar ciclos reproductivos (Rojas-González *et al.*, 2004). Por lo tanto, debido a que este método de propagación se dio con mayor eficiencia (96%) que la propagación por semilla (51%), se determinó que el mejor método de propagación para *Acalypha gaumeri* es por esqueje. Este método permite obtener plantas élite, con mayor producción de metabolitos secundarios para estudios posteriores, haciendo uso de herramientas biotecnológicas que permitan obtener los principios activos en mayor cantidad. Sin embargo, para procesos de conservación, restauración y reforestación de aéreas perturbadas, se recomienda introducir plantas provenientes de semillas, ya que le

permiten a la plantación disponer de su potencial genético para afrontar las dificultades del ambiente y continuar procesos ecológicos y evolutivos de forma natural (Duran *et al.*, 1997).

5.4.3. Descripción de flores masculinas y semillas

La colecta y cultivo de esquejes de la especie *A. gaumeri* en vivero, permitieron obtener flores masculinas y semillas. Aunque se considera a esta especie como dioica, no existen reportes de la descripción de flores masculinas. Sin embargo, la propagación en condiciones de vivero permitió su desarrollo, lo cual constituye el primer reporte descriptivo de este órgano de la planta, las cuales son inflorescencias diminutas, axilares con 6–12 flores, provistas con 4–5 brácteas vellosas, que cubren la parte interna de la flor donde se guarda el polen (Figura 5.3). El fruto se encuentra rodeado por brácteas pertenecientes a las flores femeninas que llegan a cubrir por completo al fruto. Presenta tres lóbulos y produce una semilla por lóbulo. Semillas, ovoides, agudas en el ápice y con diminutas foveolas (Figura 5.3).

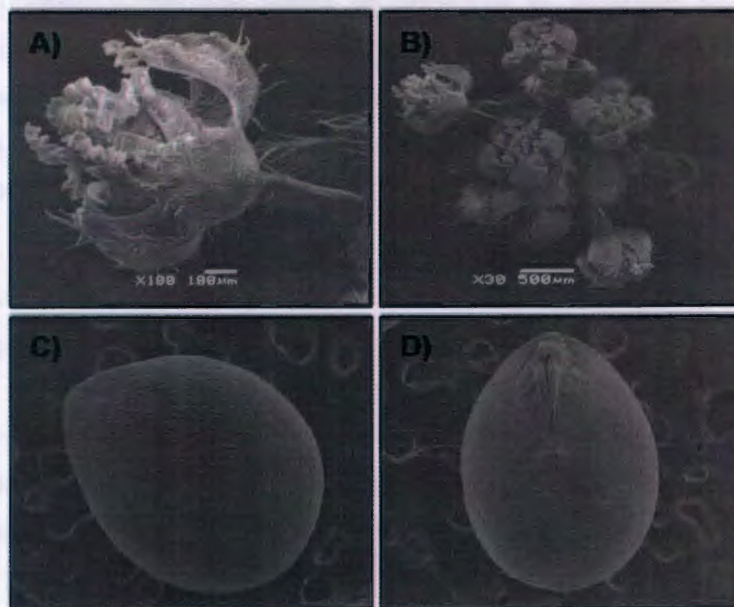


Figura 5.3. A) flor masculina, B) inflorescencia masculina, C) semilla lado horizontal y D) semillas lado frontal.

5.5. CONCLUSIONES

El mejor método de propagación de *A. gaumeri* es por esquejes, utilizando la parte media de la planta como explante y adicionalmente con la aplicación del ácido indolbutírico a 0.06 %.

La colecta, propagación y cultivo *ex situ* de *A. gaumeri*, especie endémica silvestre, enriquece la información sobre la ecología, biología y manejo de la misma, asimismo, con la caracterización de las semillas, frutos y flores masculinas no reportadas previamente.

5.6. BLIBIOGRAFÍA

- Cardoso, C., L.Y. Yamamoto, E.A. Preti, A.M. de Assis, C.S. Vieira y S.R. Ruffo (2011). IBA and substrates on the rooting all cuttings of Okinawa peach trees. *Semina: Ciencias Agrárias, Londrina*, 32 (4), 1307 – 1314.
- Castrillón, J.C., E. Carvajal, G. Ligarreto y S. Magnitskiy (2008). The effect of auxins on rooting of *Andean blueberry* (*Vaccinium meridionale* Swartz) cuttings in different substrates. *Agronomía Colombiana*, 26(1), 16 – 22.
- Cristóbal-Alejo, J., J.M. Tun-Suárez, S. Moguel-Catzín, N. Marbán-Mendoza, L. Medina-Baizabal, P. Simá- Polanco, S.R. Peraza-Sánchez y M.M. Gamboa-Angulo (2006). *In vitro* sensitivity of *Meloidogyne incognita* to extracts from native Yucatecan plants. *Nematropica*, 36(1), 89 – 97.
- Cruz-Estrada, A., M. Gamboa-Ángulo, R. Borges-Argáez, y E. Ruiz-Sánchez (2013). Insecticidal effects of plant extracts on immature whitefly *Bemisia tabaci* Genn. (Hemiptera: Aleyroideae). *Electronic Journal Biotechnology*. 16(1), 1 – 9.
- Da Silva, C.S., M.C. Alves y R.M. Monteiro (2006). Avaliação de substrato no enraizamento de estacas de acalifa (*Acalypha wilkesiana*). *Revista Biociencias Taubate*, 12(1-2), 8 – 15.
- Duran, G.R., M. Méndez-González y R. Orellana-Lanza (1997). Manual de propagación de plantas nativas de la península de Yucatán. Centro de Investigación Científica de Yucatán. Impresiones Profesionales del Sureste, S. A. de C. V. 94 p.
- Fachinello, J. C., A. Hoffmann, J. C. Nachtigal, E. Kersten y G. R. Fortes (1995). *Propagacao de plantas frutiferas de clima temperado*. 2a ed. Ufpel, Pelotas, Brasil.
- Gamboa-Angulo, M., J. Cristóbal-Alejo, I.L. Medina-Baizabal, F. Chi-Romero, R. Méndez-González, P. Sima-Polanco y F. May-Pat (2008). Antigungal properties of selected plants from the Yucatán peninsula, Mexico. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24, 1955 – 1959.

- Hanson, C. K. (1978). The effects of indobutyric acid on rooting Lovell and Nemaguard peach cuttings. *Horticulture Science*, 13(3): 374.
- Hartmann, H.T., D.E. Kester, F.T., Davies y R.L. Geneve (2002). *Plant propagation: principles and practices*. 7a ed. Prentice Hall, Saddle River, NJ.
- Hay, F. R, y R.J. Probert (2013). Advances in seed conservation of wild plant species: a review of recent research. *Conservation Physiology*, 1, 1 – 11.
- Iriondo-Alegría, J.M. (2001). Conservación de germoplasma de especies raras y amenazadas. *Investigación Agrícola: Producción y Protección Vegetal*, 16 (1), 5 – 24.
- Latsague, V. M., P. D. Sáez y Leiva Sánchez, A., J. A. Hernández Valdés y A., González Rossell (2009). Progreso hacia las metas de estrategia mundial para la conservación de las especies vegetales y el programa de trabajo sobre áreas protegidas. pp. 90-103.
- Moreno, N. H., J. G. Álvarez-Herrera, H. E. Balaguera-López y G. Fischer (2009). Asexual propagation of cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.) using different substrates and auxin levels. *Agronomía Colombiana* 27(3), 341-348.
- Rojas-González, S., J., García-Lozano y M. Alarcón-Rojas (2004). *Propagación asexual de plantas*. Editorial PRODUMEDIOS. Bogota, Colombia. 56 p.
- Sano, S.M., C.E.L. Fonseca, J.F. Ribeiro, F.M. Ogae y A.J.B. Luiz (1995). Leafing, flowering, fruiting and inicial growth of cagaitera, in Planaltina, de, Brazil. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 30(1), 5 – 14.
- Sierra-Escobar, J., A. F. Alzate-Guarín, H. S. Soto-Rodríguez, B. Durán Rivera y L. Losada-Vidarte (2005). Plantas silvestres con potencialidad ornamental de los bosques montano bajos del oriente antioqueño, Colombia. *Revista Facultad Nacional de Agronomía*, 58(1), 2651 – 2663.
- Vargas-Díaz, A.A. (2009). *Alternativa naturales para el control de Alternaria chrysanthemi* Simmons & Crosier. Tesis de maestría. Centro de investigación Científica de Yucatán. 107 p.
- Yamamoto, L.Y., R. de Sá Borges, M. Sorace, B.F. Rachid, J.M.F. Ruas, O. Sato, A.M. de Assis, y S. Ruffo (2010). Cutting rooting of *Psidium guayava* L. Seculo XXI guava treated with indolebutyric acid with talc and alcohol as a vehicule. *Ciência Rural*, 40(5), 1037 – 1042.

CAPÍTULO VI. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES GENERALES

6.1. DISCUSIÓN GENERAL

Actualmente, existe una gran demanda en el mercado internacional del consumo de vegetales y frutos libres de plaguicidas. Por esa razón, se ha incrementado el interés en productos naturales como fuente de agroquímicos amigables con el ambiente, seguros y compatibles con el manejo de plagas y enfermedades (MIP) (Copping y Duke, 2007; Dayan *et al.*, 2009).

En este sentido, las plantas siguen siendo una fuente natural importante de productos bioactivos (Isman, 2000). *Acalypha gaumeri* es una planta endémica de la península de Yucatán, que ha demostrado importantes actividades antifúngicas contra varios hongos fitopatógenos (Gamboa-Angulo *et al.*, 2008; Vargas-Díaz, 2009).

En este trabajo se realizó el estudio integral de *A. gaumeri*, con la finalidad de determinar el potencial de esta especie como agente antifúngico en el control de hongos fitopatógenos. Esto permitió observar que el extracto etanólico de la raíz de *A. gaumeri* es capaz de inhibir a 10 hongos patógenos de plantas, tres cepas pertenecientes al género *Alternaria* (*Alternaria* sp., *A. tagetica* y *A. chrysanthemi*) (Gamboa-Angulo *et al.*, 2008; Vargas-Díaz 2009), dos cepas de *Colletotrichum* (*Colletotrichum gloeosporioides* y *C. capsici*) (Gamboa-Angulo *et al.*, 2008), una cepa de *Corynespora cassicola*, *Curvularia* sp., *Helminthosporium* sp., *Fusarium oxysporum* y *Mycosphaerella fijiensis*. Esto indica que el extracto tiene un buen espectro de acción comparable con los de *Allium sativum*, *Anagallis arvensis* L y *Ricinus communis* (Rai *et al.*, 2003).

La purificación biodirigida del extracto etanólico de *A. gaumeri* permitió el aislamiento de dos alcaloides (Argaumerina y ACR-3L) activos contra *Mycosphaerella fijiensis*. El compuesto argaumerina posee una estructura de nueva de naturaleza pentacíclica nitrogenada. El espectro de protón del semi-puro compuestos ACR-3L demuestra que tiene una estructura química similar a la argaumerina. En el género se han reportado alcaloides con la acalyfinina (Nahrstedt *et al.*, 1982), acalyfamida, aurantiamida succiamida (Talapatra *et al.*, 1981), flindersina (Taufiq-Yap *et al.*, 2000), epicalifina, noracalyfina, epinoracalyfina, ar-acalyfidona, amida acalyfin, y ciclosida amida epiacalyfina (Hungeling *et al.*, 2009), ninguno reporta actividad contra hongos. Otros compuestos reportados con efecto contra *M. fijiensis* son dos perinaftenonas aisladas de *Musa acuminata* var. Yangambi y el compuesto sintético 4-metoxi-2-nitro-1H-fenalen-1. Este último, presentó la más alta actividad contra *M. fijiensis* con una $CI_{50} <$

50 µg/mL. Los dos compuestos alcaloidales aislados en este trabajo presentaron una Cl_{50} más baja (7 – 9 µg/mL) (Hidalgo *et al.* 2009), por lo cual los resultados son prometedores. Este es el primer reporte del aislamiento de compuestos alcaloidales en la especie *A. gaumeri* con actividad antifúngica.

Los alcaloides son responsables de múltiples actividades biológicas, entre ellas la antifúngica. Oliva *et al.* (2003) reportó la actividad de cuatro alcaloides aislados de *Ruta graveolens* L. contra especies de *Colletotrichum* y *Botrytis cinerea*. Otro ejemplo es el alcaloide venenatina aislado de *Alstonia penenata* el cual presentó un efecto antifúngico contra *Fusarium udum*, *Alternaria brassicola*, *Aspergillus flavus* y *Ustilago cynodontis* a una concentración de 2000 µg/mL. La concentración mínima inhibitoria (CMI) de los compuestos ACR-3J y ACRL contra *M. fijiensis* y *A. chrysanthemi* es mucho menor a la reportada en la literatura (31.25 – 500 µg/mL, respectivamente). Cabe mencionar que la cepa *M. fijiensis* 1233 es una cepa aislada de un cultivar libre de fungicidas, por lo tanto, es importante evaluar estos compuestos contra otras cepas con manejo de fungicidas ya que podrían ser más agresivas (Romero y Sutton, 1998). Sin embargo, Zapien (2014) reportó que la cepa Oz1b proveniente de una finca libre de manejo de fungicida fue más agresiva que las cepas CR4b y Jaguar C3 aisladas de fincas con manejo de fungicidas. Por lo tanto, es importante evaluar con otras cepas y determinar la CMI con cada una de ellas.

Por otro lado, los dos compuestos aislados (Argaumerina y ACR-3L) se encuentran en los 12 extractos colectados en las tres poblaciones durante el periodo de sequía, lluvia e inició de sequía. Sin embargo, el compuesto ACR-3L se observa con mayor intensidad en las tres poblaciones en el mes de agosto (lluvias), periodo reportado con la mayor actividad antifúngica contra los tres patógenos. Los resultados obtenidos en el proceso de purificación indicaron que el compuesto semi- puro ACR-3L es el más activo contra los dos patógenos, por lo tanto, es uno de los principios responsables de la actividad antifúngica en el extracto etanólico. También, es importante mencionar que el compuesto ACR-3L no se encuentra completamente puro, ya que por ccd se puede observar impurezas. Este compuesto se intentó purificar con diversos procesos (HPLC, sílice, sephadex y placas preparativas), sin éxito debido a la falta de material. Por lo tanto, es importante plantear estrategias para obtener más material para seguir siendo estudiado.

En la especie se ha reportado la propagación por esqueje (Baratta y Magalhães, 2010; Da Silva *et al.*, 2006). En este trabajo se evaluaron dos métodos: la propagación por

esqueje y semilla. El primer método fue más eficiente con la aplicación de la auxina AIB. La aplicación de esta auxina está bien documentada en la propagación vegetativa, ya que promueve la formación de raíces (Cardoso *et al.*, 2011; Castrillón *et al.*, 2008; Latsague *et al.*, 2009; Moreno *et al.*, 2009; Yamamoto *et al.*, 2010). Para los fines del trabajo, la propagación por esqueje es mejor, ya que se podrá seleccionar plantas élites y la obtención de material vegetal más rápido, en condiciones controladas para seguir estudiando su biología y fitoquímica.

6.2. CONCLUSIONES GENERALES

El extracto etanólico de la raíz de *A. gaumeri* posee propiedades antifúngicas de amplio espectro al inhibir 10 cepas fitopatógenas, pertenecientes a siete diferentes géneros.

Los compuestos argaumerina (1) y ACR-3L (2) aislados de la fracción ACR-1E corresponden a los principios activos producidos en las raíces de *A. gaumeri* contra *M. fijiensis*; el compuesto semipuro ACR-3L presentó un mayor efecto inhibitorio contra *A. chrysanthemi*. Los compuestos argaumerina y ACR-3L son alcaloides heterociclos aromáticos de acuerdo a sus datos espectroscópicos y espectrométricos.

Las plantas de *A. gaumeri* colectadas en las tres poblaciones (Oxkutzcab, Tinum y Yaxcabá) presentaron actividad antifúngica. La más efectiva correspondió a la población de Tinum en la época de lluvia por presentar la menor CMI contra *A. chrysanthemi*, *C. gloeosporioides* y *M. fijiensis*. El perfil químico de estos extractos indicó la presencia de los compuestos nitrogenados argaumerina y ACR-3L en cada uno de ellos.

La propagación de *A. gaumeri* por esqueje con la aplicación de la auxina ácido indolbutírico es más eficiente que la reproducción por semilla. La especie *A. gaumeri* es una planta endémica, por lo tanto, es de vital importancia asegurar su explotación sostenible.

La efectividad antifúngica de *A. gaumeri* contra los fitopatógenos, la hace una excelente candidata a ser utilizada en un futuro como alternativa natural para desarrollo de nuevos fungicidas. Adicionalmente, con este trabajo se contribuye al estudio fitoquímico y biológico de esta especie y de la flora Yucatanense.

6.3. PERSPECTIVAS

Entre las perspectivas del trabajo se encuentra los siguientes puntos:

- Evaluar el extracto etanólico de *A. gaumeri* contra más cepas fitopatógenas de especies con origen en el suelo, ya que la parte radicular es donde se encuentra

la parte activa de la planta. Asimismo, contra otras cepas resistentes a fungicidas en especial cepas de *M. fijiensis*.

- La evaluación de los compuestos y el extracto de *A. gaumeri* contra *A. chrysanthemi* permiten suponer que esta especie posee un arsenal de compuestos capaces de inhibirlo, los cuales no se aislaron en este trabajo por lo tanto, sería importante realizar el aislamiento bio-dirigido con este patógeno.
- Elucidar la estructura química completa del compuesto ACR-3L y realizar más estudios para confirmar la estructura química de argaumerina.
- Cuantificar los compuestos aislados en las diferentes colectas mediante HPTLC o HPLC.
- Establecer el mecanismo de acción de los compuestos activos aislados.
- Realizar estudios de inocuidad de los compuestos activos aislados con organismos benéficos y pruebas de toxicidad.
- Realizar formulados con el extracto etanólico de *A. gaumeri* y evaluar su efectividad en vivero y campo.
- Analizar la efectividad de las tres poblaciones de *A. gaumeri* propagadas en invernadero y campo.
- Por último, seleccionar plantas élites capaces de producir compuestos antifúngicos, mediante la evaluación de las mismas y caracterización molecular de las plantas.

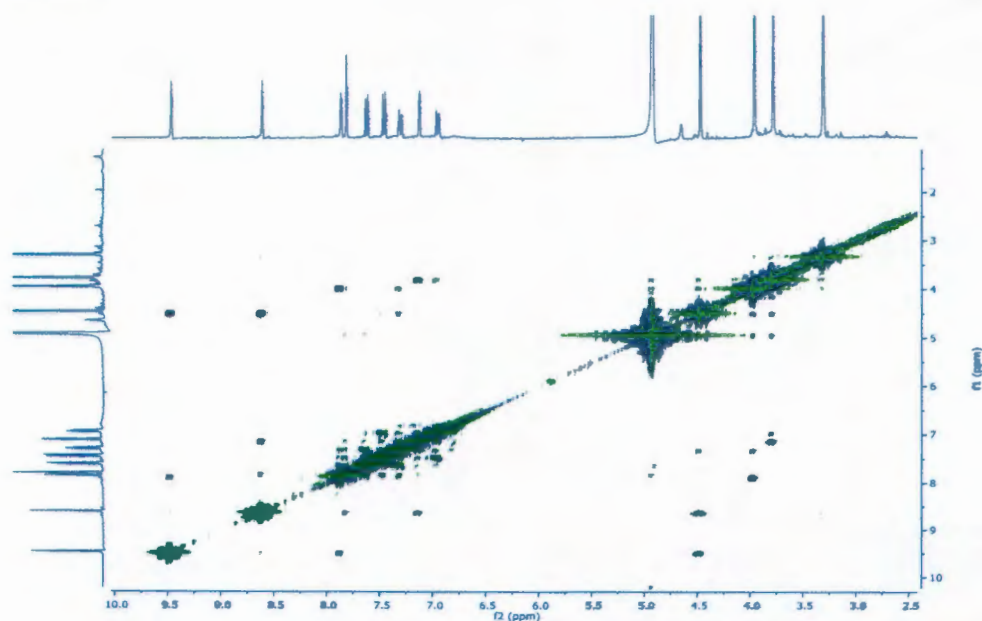
BIBLIOGRAFÍAS

- Baratta, J. A. P. y L. S. Magalhães (2010). Produção de mudas por estaquia, de acalifa e tumbérgia, utilizando compostagem, preparada a partir de resíduos da poda da arborização urbana. REVSAU, Piracicaba, 5(3): 113-148.
- Cardoso, C., L.Y. Yamamoto, E.A. Preti, A.M. de Assis, C.S. Vieira y S.R Ruffo (2011). IBA and substrates on the rooting all cuttings of Okinawa peach trees. Semina: Ciências Agrárias, Londrina, 32 (4), 1307 – 1314.
- Castrillón, J.C., E. Carvajal, G. Ligarreto y S. Magnitskiy (2008). The effect of auxins on rooting of Andean blueberry (*Vaccinium meridionale* Swartz) cuttings in different substrates. Agronomía Colombiana, 26(1), 16 – 22.
- Copping, L.G. y S.O. Duke (2007). Natural products that have been used commercially as crop protection agents. Pest Management Science, 63, 524 – 554.

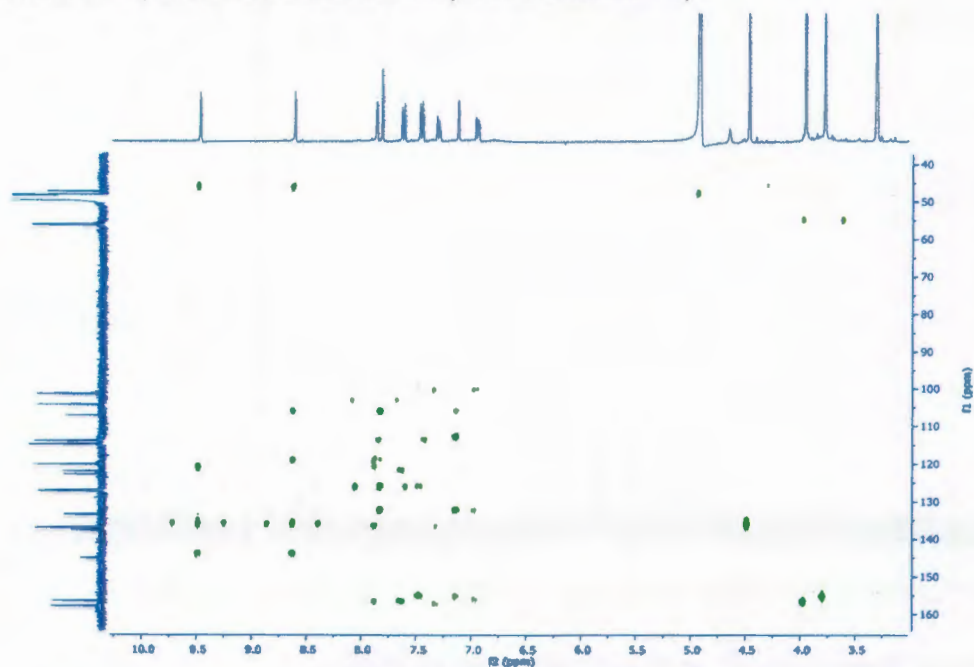
- Da Silva, C.S., M.C. Alves y R.M. Monteiro (2006). Avaliação de substrato no enraizamento de estacas de acalifa (*Acalypha wilkesiana*). Revista Biociencias Taubate, 12(1-2), 8 – 15.
- Dayan F.E., C.L. Cantrell y S.O. Duke (2009). Natural products in crop protection. Bioorganic and Medicinal Chemistry, 17, 4022 – 4034.
- Gamboa-Angulo, M., J. Cristóbal-Alejo, I.L. Medina-Baizabal, F. Chi-Romero, R. Méndez-González, P. Sima-Polanco y F. May-Pat (2008). Antigungal properties of selected plants from the Yucatán peninsula, Mexico. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 24, 1955 – 1959.
- Hidalgo, W., L. Duque, J. Saez, R. Arango, J. Gil, B. Rojano, B. Schneider and F. Otalvaro (2009). Structure-activity relationship in the interaction of substituted perinaphthenones with *Mycosphaerella fijiensis*. Journal Agriculture Food Chemistry, 57, 7417 – 7421.
- Hungeling, M., M. Lechtenberg, F.R. Fronczek and A. Nahrstedt (2009). Cyanogenic and non-cyanogenic pyridone glucosides from *Acalypha indica* (Euphorbiaceae). Phytochemistry, 70, 270 – 277.
- Isman, M.B. (2000). Plant essential oils for pest and disease management. Crop Protection, 19, 603 – 608.
- Latsague, V. M., P. D. Sáez y Leiva Sánchez, A., J. A. Hernández Valdés y A., González Rossell (2009). Progreso hacia las metas de estrategia mundial para la conservación de las especies vegetales y el programa de trabajo sobre áreas protegidas. pp. 90-103.
- Moreno, N. H., J. G. Álvarez-Herrera, H. E. Balaguera-López y G. Fischer (2009). Asexual propagation of cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.) using different substrates and auxin levels. Agronomía Colombiana 27(3), 341-348.
- Nahrstedt, A., J.D. Kant and V. Wray (1982). Acalyphin, a cyanogenic glucoside from *Acalypha indica*. Phytochemistry, 21, 101 – 105.
- Oliva, A., K. M. Meepagala, D. E. Wedge, D. Harries, A.L. Hale, G. Aliotta and S.O. Duke (2003). Natural fungicides from *Ruta graveolens* L. leaves, including a new quinolone alkaloid. Agriculture Food of Chemistry 51, 890 – 896.

- Rai, M., D. Acharya y P. Wadegaonkar (2003). Plant-derived antimycotics: potential of Asteraceous plants. In: Rai, M., D. Mares, (eds.). *Plantderived antimycotics*. Current trends and future prospects. Hartworth Press. N. Y. pp. 165-195.
- Romero, R.A., y T.B. Sutton (1997). Sensitivity of *Mycosphaerella fijiensis*, causal agent of Black sigatoka of banana, to propiconazole. *Phytopathology*, 87, 97 – 100.
- Talapatra, B., S. Goswami and S.K. Talapatra (1981). Acalyphamide, a new amide and other chemical constituents of *Acalypha indica* Linn. *Indian Journal of Chemistry*, 20B, 974 – 977.
- Taufiq-Yap, Y.H., T.H. Peh, G.C.L. The and M. Rahmani (2000). Chemical investigation of *Acalypha indica* (Euphorbiaceae). *Oriental Journal of Chemistry*, 16, 249 – 251.
- Vargas-Díaz A. A. (2009). Alternativas naturales para el control de *Alternaria chrysanthemi* Simmons & Crosier. Tesis de maestría. Centro de investigación Científica de Yucatán. 120 p.
- Yamamoto, L.Y., R. de Sá Borges, M. Sorace, B.F. Rachid, J.M.F. Ruas, O. Sato, A.M. de Assis, y S. Ruffo (2010). Cutting rooting of *Psidium guayava* L. Seculo XXI guava treated with indolebutyric acid with talc and alcohol as a vehicule. *Ciência Rural*, 40(5), 1037 – 1042.
- Zapien-De la Rosa, E. E. (2014). Agresividad de cepas de *Mycosphaerella fijiensis* asiladas de fincas bananeras con diferente manejo de fungicidas. Tesis de maestría. Centro de Investigación Científica de Yucatán. 115p.

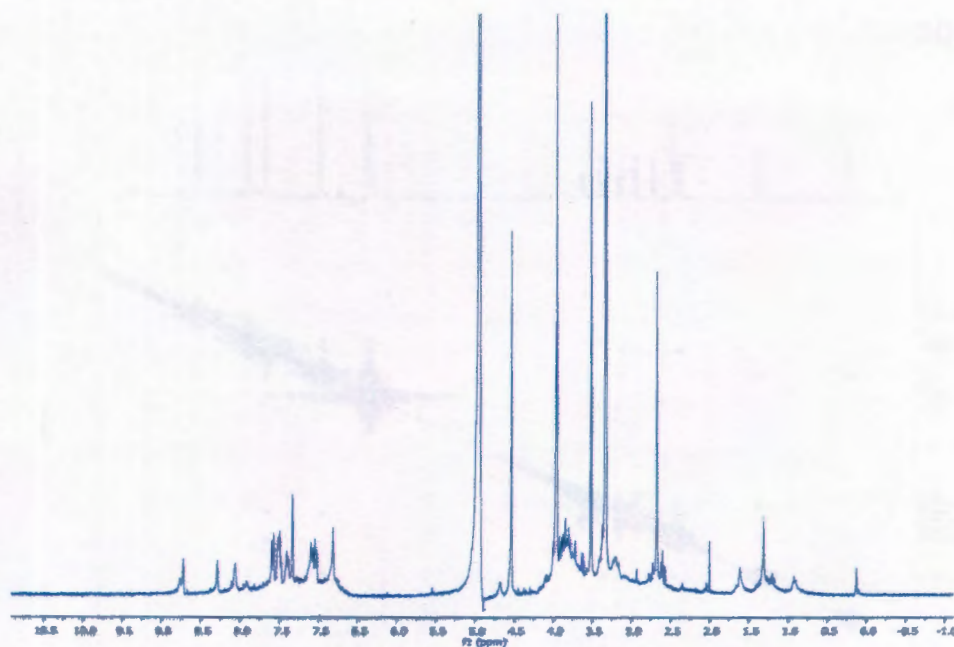
ANEXOS



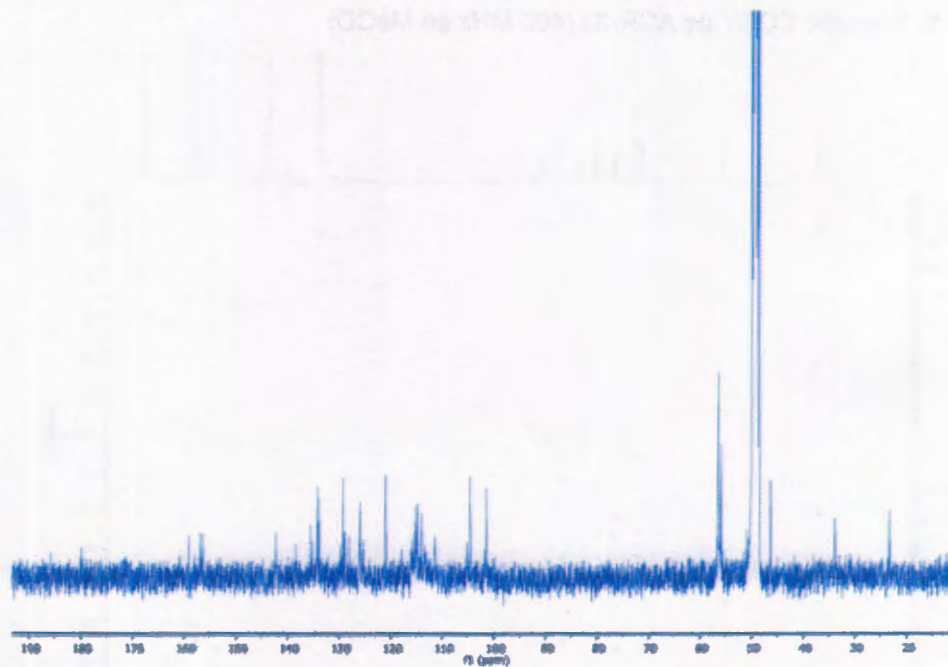
Anexo 1. Espectro COSY de ACR-3J (400 MHz en MeOD)



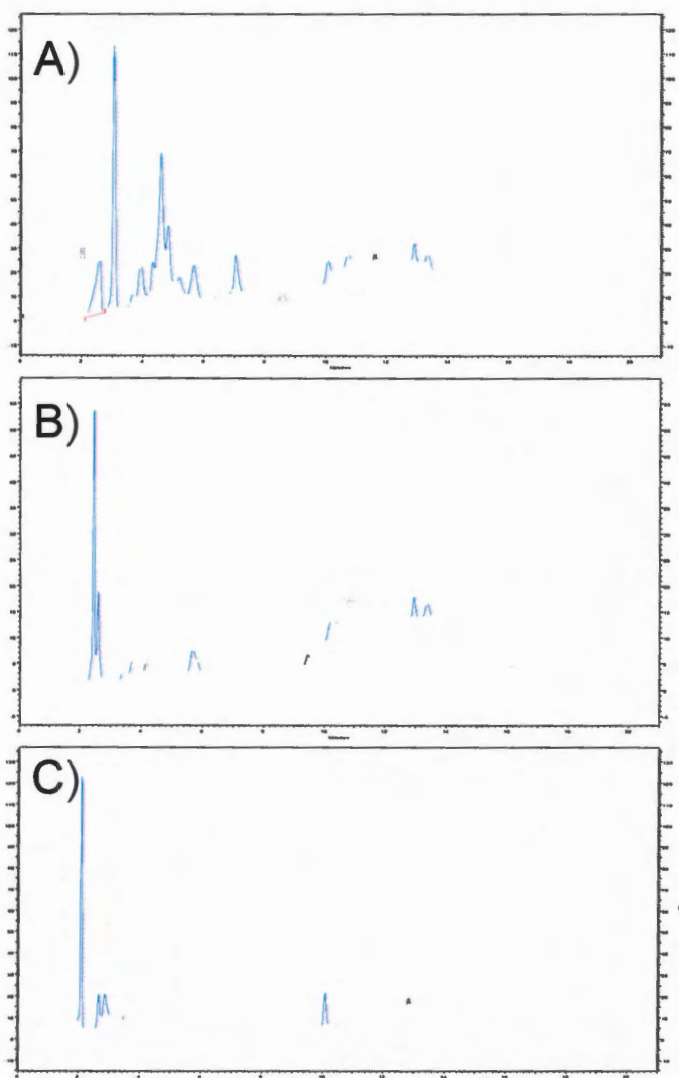
2. Espectro de HMBC de argaumerina (400 MHz en MeOD)



Anexo 3. Espectro de ^1H de ACR-3L (400 MHz en MeOD)



Anexo 4. Espectro de ^{13}C de ACR-3L (400 MHz en MeOD)



Anexo 5. Cromatograma de HPLC, A) ACR-1E, B) ACR-3J y C) ACR-3L. Columna Altima C18 (250 × 4.5), método: agua: metanol 40:60, flujo 1 ml/min.

Anexo 6. Artículo sometido a la Revista Mexicana de Fitopatología.

Evaluation of native yucatecan plants against *Alternaria chrysanthemi* and antifungal activity spectrum of *Acalypha gaumeri*

Evaluación de plantas nativas yucatecas contra *Alternaria chrysanthemi* y espectro de actividad antifúngica de *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 CP 97200, Yucatán, México; **Jairo Cristóbal-Alejo, Esaú Ruiz-Sánchez,** Departamento de Posgrado, Instituto Tecnológico de Conkal, Conkal CP 97345, Yucatán, México. Corresponding author: Tel.: +52 (999)9428330; Fax: +52 (999)9813900; E-mail: mmarcela@cicy.mx

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 flammea* 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*. 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

Resumen. Un total de 24 extractos (acuosos y etanólicos) de nueve especies de plantas se evaluaron contra *Alternaria chrysanthemi*, el agente causal del tizón 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 flammea* (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 *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 85µg/cm². También el EE de *A. gaumeri* inhibe el crecimiento de las cepas fúngicas *Alternaria* sp. (ITC02), *Colletotrichum capsici*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Corynespora cassicola*, *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.

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 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* of 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).

Ethanolic extracts (EE): Dried plant material (40 g) 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 anuum* L.; *Curvularia* sp. (ITC10) from *Zea mayz* 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 days.

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 5×10^4 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 medium Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI-1640) and samples of 100 µL 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 µL) 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 µg/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 ± 2 °C in the dark for 96 h and hyphal growth (HG) was determined visually with a microscope (50×) 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 ± 2 °C. Inhibitory concentrations (IC_{50} and IC_{90}) were also calculated (Table 3).

Agar dilution assay

Mycelial Growth Inhibition (MGI). To evaluate MGI, EE of *A. gaumeri* was dissolved in DMSO (20 µg/µL) 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 ± 2 °C for *A. chrysanthemi* and at 25 ± 2 °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). Inhibitory Concentrations (IC_{50} and IC_{90}) were also determined (Tables 4).

Sporulation inhibition on *Alternaria chrysanthemi*. Saline solution (5 mL) was added to *A. chrysanthemi* colonies. 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)

Leaf disk assay

Leaf-disks of chrysanthemum (1.5 cm²) 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 µg/cm²); 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 $y = \arcsin(\sqrt{a}/100)$. 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 (IC₅₀ and IC₉₀) 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 IC₅₀ and IC₉₀ (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 (57 and 45 %, respectively) (Table 2).

Sporulation inhibition was not significantly different (77-82 %) in *A. chrysanthemi* exposed to aqueous extract of *B. flammea* stem and leaf (9.1×10^3 spores/mL) and to EE of *A. gaumeri* roots ethanolic and aqueous extracts (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 0.12 and 0.13 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 inhibition of mycelial growth was observed when 4 mg/mL ($42.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) was applied on the chrysanthemum leaf disks (Fig. 1).

Antifungal activity spectrum of *Acalypha gaumeri*

The EE of *A. gaumeri* root was evaluated by agar dilution assays 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 IC_{50} (0.33 mg/ml) and IC_{90} (1.01 mg/ ml) showed that the most sensitive fungal species was *C. cassicola*. In contrast, the least sensitive was *C. capsici* (IC_{50} = 0.60 mg/mL and IC_{90} = 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 IC_{50} and IC_{90} 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, 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 IC_{50} and IC_{90} 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 (Fig. 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 prohibited 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 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 *Microsporum 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 that the metabolites responsible for the activity are 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 cassicola*, *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 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 indicate a high of 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).

CITED LITERATURE

- 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.
- Boehlendorf 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, Scolforo JRS, de Carvalho DA, and Batista TRS. 2011. Plant extracts to control *Alternaria alternata* in Murcott tangor 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, and 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 of 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, and 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 hidrodistillation and supercritical carbon dioxide. *Natural Product Research* 20:992-998.
- Xu G, Chen S, and Chen F. 2010. Transgenic chrysanthemum plants expressing a harpin_{xoo} 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.

Table 1. Antifungal screening of Mexican 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 ± 12.5b
<i>Ambrosia hispida</i>	Asteraceae	PS 2579	L	0 ± 0d	0 ± 0d
			S/R	6 ± 0d	13 ± 0d
<i>Bonellia flammea</i>	Theophrastaceae	PS 2782	L	0 ± 0d	50 ± 0bc
	e		S	0 ± 0d	63 ± 19 b
<i>Calea urticifolia</i>	Asteraceae	FM 1721	R	6 ± 0d	38 ± 12.5c
<i>Croton chichenensis</i>	Euphorbiaceae	PS 2571	S	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 ± d
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)

Table 2. Effect of plant extracts on the mycelial growth and sporulation inhibition of *Alternaria chrysanthemi* assays, and determination of their inhibitory concentration (IC₅₀ and IC₉₀).

Plant species	Part Plant	Solvent	MGI (%)	SI (%)
<i>Acalypha gaumeri</i>	Root	E	78 ± 1.0b	78 ± 2.0b
		A	51 ± 2.3 c	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 **IC:** Inhibitory concentration at 50 and 90. **E:** Ethanol extract (1 mg/mL) **A:** Aqueous extract (3 % w/v). **ND:** not determined. **Positive control:** Prochloraz 45 CE (200 µg/mL). **Negative control:** PDA + 2.5% DMSO

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	GI (%)	mg/mL	
		0.5 mg/mL	IC ₅₀	IC ₉₀
ACR-1A	<i>n</i> -hexane	0 ± 0 c	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 0.004 µg/mL)		100 ± 0a	0.001	0.003
Negative control (DMSO 2.5%)		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

Table 4. Antifungal spectrum of *Acalypha gaumeri* against fungal strain 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 (0.54 – 0.67)	4.60 (3.22 – 7.68)
<i>Colletotrichum</i> <i>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). **ND:** not determined.

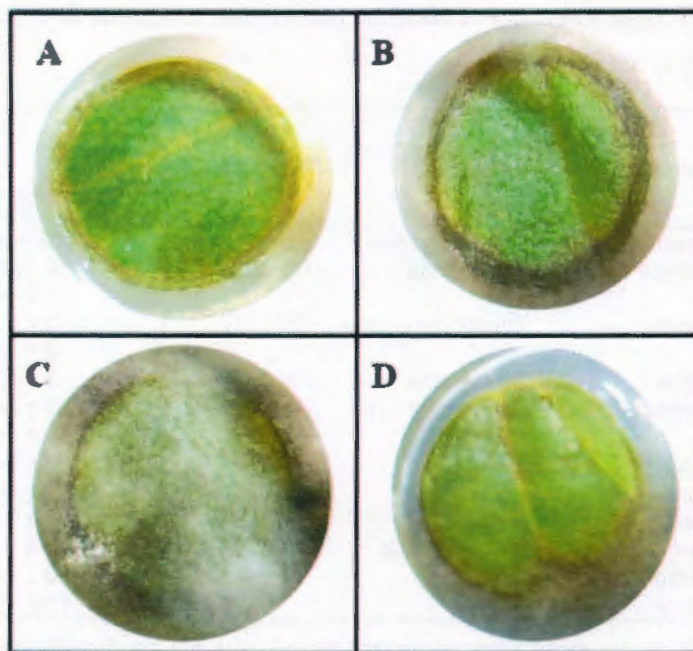


Figure 1. Effects of the fraction ACR-1E on *Alternaria chrysanthemi* inhibition in leaf disk assay after seven days of incubation. A. 85 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ B. 42.5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. C. EtOH:H₂O 1:2 D. Mirage 45 CE (2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$).

Table 1. Antifungal screening of Mexican 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 ± 12.5b
<i>Ambrosia hispida</i>	Asteraceae	PS 2579	L	0 ± 0d	0 ± 0d
			S/R	6 ± 0d	13 ± 0d
<i>Bonellia flammea</i>	Theophrastaceae	PS 2782	L	0 ± 0d	50 ± 0bc
			S	0 ± 0d	63 ± 19 b
<i>Calea urticifolia</i>	Asteraceae	FM 1721	R	6 ± 0d	38 ± 12.5c
<i>Croton chichenensis</i>	Euphorbiaceae	PS 2571	S	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 ± 0 d
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)

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

Plant species	Part Plant	Solvent	MGI (%)	SI (%)
<i>Acalypha gaumeri</i>	Root	E	78 ± 1.0b	78 ± 2.0b
		A	51 ± 2.3 c	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 IC: Inhibitory concentration at 50 and 90. E: Ethanol extract (1 mg/mL) A: Aqueous extract (3 % w/v). ND: not determined Positive control: Prochloraz 45 CE (200 µg/mL). Negative control: PDA + 2.5% DMSO

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	GI (%)	mg/mL	
		0.5 mg/mL	IC ₅₀	IC ₉₀
ACR-1A	<i>n</i> -hexane	0 ± 0 c	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 0.004 µg/mL)		100 ± 0a	0.001	0.003
Negative control (DMSO 2.5%)		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

Table 4. Antifungal spectrum of *Acalypha gaumeri* against fungal strain 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 (0.54 – 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). **ND:** not determined

