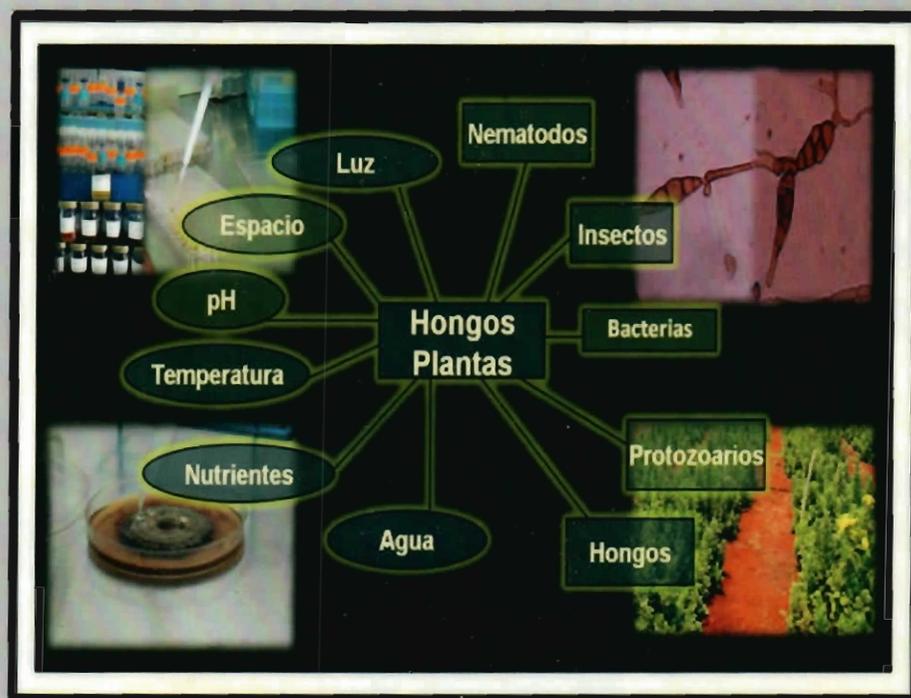


# MAESTRÍA EN CIENCIAS Y BIOTECNOLOGÍA DE PLANTAS

## Alternativas naturales para el control de *Alternaria chrysanthemi* Simmons & Crosier



I.A. ARELY ANAYANSI VARGAS DIAZ

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A.C.

# MAESTRÍA EN CIENCIAS Y BIOTECNOLOGÍA DE PLANTAS

UNIDAD DE BIOTECNOLOGÍA

## Alternativas naturales para el control de *Alternaria chrysanthemi* Simmons & Crosier

Tesis que para obtener el grado de Maestro en  
Ciencias presenta:

**I.A. Arely Anayansi Vargas Diaz**

Centro de Investigación Científica de Yucatán, A. C.  
Mérida, Yucatán, México.

2009



## Declaración de Propiedad

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos Experimentales, los Resultados y Discusión de este documento provienen 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 y que dicha información le pertenece en términos de la ley de propiedad industrial, por lo que no me reservo ningún derecho sobre ello.



---

Arely Anayansi Vargas Diaz

## RECONOCIMIENTOS

A la Dra. María Marcela Gamboa Angulo y el Dr. Jairo Cristóbal Alejo por compartir sus conocimientos, por su apoyo profesional y amistad durante la realización de la presente tesis.

Al H. Comité revisor de tesis, integrado por la Dra. Blondy Canto Canché, Dra. Rocío de Lourdes Borges Argáez y Dra. Susana del Carmen De la Rosa García por sus acertadas indicaciones y sugerencias en la redacción del documento.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada con el número 211999.

A la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., por prestar las instalaciones.

A la Dra. María Manuela de Jesús Reyes Estevanez, por su apoyo técnico en el bioensayo en microdilución y por su amistad.

A el I.A Angel Emmanuel Cruz Estrada por su apoyo en campo y su amistad en los momentos difíciles.

A la IQ. Irma Leticia Medina Baizabal, Sergio Perez y MC. Elizabeth Herrera por su ayuda técnica

A C. Candy Bojorguez y C. Leidy Bojorguez y a su familia, por prestar la unidad experimental en campo.

Al QFB Edgar Emmanuel Caamal por su ayuda en el bioensayo y por su amistad.

A mis compañeros de laboratorio, Andres, Abril, Carlitos, Carlos Cruz e Ignacio por compartir conmigo estos últimos años.

## DEDICATORIAS

*A Dios por darme la vida y permitirme terminar este ciclo de mi vida.*

*A mis padres Imelda y Angel por su amor, confianza y apoyo a lo largo de mi vida.*

*A mis hermanos, Angel, Polo, Regina, Carolina y Erica por su cariño y a mis sobrinos Obed, Merali, Ednovi, Joshua, Antoni, Neithan, Tiara, Tanisha, Mari tere y Angeles.*

## Contenido

Contenido .....	i
Índice de tablas .....	v
Índice de figuras .....	vi
RESUMEN .....	ix
ABSTRACT .....	x
INTRODUCCIÓN .....	xii

### Capítulo I

Antecedentes, objetivos y diseño experimental .....	15
1.1 Antecedentes .....	15
1.1.1 Generalidades del crisantemo .....	15
1.1.1.1 Descripción botánica del crisantemo .....	15
1.1.1.2 Importancia económica del crisantemo .....	16
1.1.1.3 Principales plagas y enfermedades del crisantemo .....	17
1.1.2 Generalidades del género <i>Alternaria</i> .....	18
1.1.2.1 <i>Alternaria chrysanthemi</i> Simmons & Crosier .....	19
1.1.2.2 Síntomas de <i>Alternaria chrysanthemi</i> en crisantemo .....	21
1.1.2.3 Estrategias de control de <i>Alternaria</i> .....	22
1.1.2.3.1 Control cultural .....	22
1.1.2.3.2 Control genético .....	22
1.1.2.3.3 Control químico .....	22
1.1.3 Alternativas naturales para el control de fitopatógenos .....	25
1.1.3.1 Extractos vegetales .....	25
1.1.3.2 Extractos fúngicos .....	26
1.1.4 Métodos y técnicas para determinar la sensibilidad a los antifúngicos .....	28
1.1.4.1 Técnica de difusión en disco .....	28
1.1.4.2 Técnica de dilución en agar .....	28
1.1.4.3 Método de E-test .....	29

1.1.4.4 Bioautografía.....	29
1.1.4.5 Técnica en microdilución (microplaca) .....	30
1.1.5 Bibliografía.....	31
1.2 Objetivos .....	37
1.2.1 Objetivo general.....	37
1.2.2 Objetivos específicos.....	37
1.3 Materiales y métodos .....	38

## Capítulo II

Aislamiento de <i>Alternaria chrysanthemi</i> y establecimiento del bioensayo ..	41
2.1 Introducción.....	41
2.2 Objetivos .....	42
2.3 Materiales y métodos .....	42
2.3.1 Aislamiento de <i>Alternaria chrysanthemi</i> .....	42
2.3.1.1 Purificación de la cepa de <i>Alternaria chrysanthemi</i> por cultivos monosporicos.....	42
2.3.1.2 Identificación del fitopatógeno <i>Alternaria chrysanthemi</i> .....	43
2.3.1.3 Conservación de la cepa .....	43
2.3.2 Inducción de la esporulación de <i>Alternaria chrysanthemi</i> .....	43
2.3.3 Establecimiento del bioensayo en microdilución.....	44
2.3.3.1 Suspensión de Esporas.....	44
2.3.3.2 Prueba antifúngica con los diferentes extractos para el bioensayo en microdilución.....	44
2.3.3.3 Lectura de la microplaca.....	45
2.4 Resultados y discusión .....	46
2.5 Conclusiones.....	49
2.6 Bibliografía .....	50

## Capítulo III

Evaluación antifúngica de extractos a nivel laboratorio .....	55
3.1 Introducción.....	55
3.2 Objetivos .....	57

3.3 Materiales y métodos .....	57
3.3.1 Recolecta de las especies vegetales .....	57
3.3.1.1 Extracción etanólica de plantas .....	59
3.3.1.2 Extracción acuosa de plantas .....	59
3.3.2 Cultivos fúngicos en arroz .....	59
3.3.2.1 Extracción con AcOEt de micelio fúngico .....	59
3.3.3 Bioensayo antifúngico en microdilución .....	59
3.3.3.1 Tratamientos evaluados.....	59
3.3.3.2 Análisis estadístico .....	60
3.3.4 Determinación de la concentración mínima fungicida (CMF) .....	60
3.3.5 Determinación de la actividad fungicida o fungistática de los extractos .....	60
3.3.6 Bioensayo de dilución en agar .....	60
3.3.6.1 Determinación del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial .....	61
3.3.6.2 Determinación de la concentración de esporas de cada tratamiento evaluado por mL .....	61
3.3.6.3 Análisis estadístico .....	61
3.4 Resultados y discusión .....	62
3.4.1 Bioensayo antifúngico en microdilución .....	62
3.4.2 Determinación de la $CI_{50}$ y $CI_{90}$ en los extractos vegetales y fúngicos .....	64
3.4.3 Determinación de la actividad fungicida o fungistática y la concentración mínima fungicida de los mejores extractos.....	64
3.4.4 Bioensayo de dilución en agar .....	65
3.4.4.1 Efectividad de los extractos vegetales contra <i>Alternaria chrysanthemi</i> .....	65
3.4.4.2 Densidad de esporulación y porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de <i>Alternaria chrysanthemi</i> .....	66
3.4.5 Discusión .....	67
3.5 Conclusiones.....	72
3.6 Bibliografía .....	73

## Capítulo IV

Evaluación a nivel de campo .....	79
4.1 introducción .....	79
4.2 Objetivo .....	79
4.3 Materiales y métodos .....	80
4.3.1 Ubicación del área experimental .....	80
4.3.2 Establecimiento del experimento en campo.....	80
4.3.3 Tratamientos .....	80
4.3.4 Diseño experimental .....	80
4.3.5 Aplicaciones de los extractos .....	81
4.3.6 Intensidad de la enfermedad .....	81
4.3.6.1 Parámetros epidemiológicos a medir .....	81
4.3.7 Análisis de datos .....	82
4.4 Resultados .....	83
4.4.1 Intensidad de la enfermedad causada por el agente <i>Alternaria chrysanthemi</i> y el efecto del extracto acuoso en campo.....	83
4.4.2 Efectividad del extracto al reducir la severidad en campo .....	85
4.4.3 Variables agronómicas .....	86
4.5 Discusión.....	87
4.6 Conclusiones.....	88
4.7 Bibliografía .....	89

## Capítulo V

Conclusiones generales y perspectivas.....	91
5.1 Conclusiones.....	91
5.2 Perspectivas.....	92
APÉNDICE .....	93

## Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b> Principales enfermedades de origen fúngico en el crisantemo.....	18
<b>Tabla 2.</b> Fungicida químicos usados en el control de <i>A. chrysanthemi</i> . ....	24
<b>Tabla 3.</b> Plantas de la península de Yucatán con actividad antifúngica contra <i>Alternaria tagetica</i> . ....	26
<b>Tabla 4.</b> Extractos fúngicos con actividad antifúngica contra <i>Alternaria tagetica</i> . ....	28
<b>Tabla 5.</b> Escala numérica de la inhibición del crecimiento en el bioensayo de microdilución en microplaca. ....	45
<b>Tabla 6.</b> Plantas seleccionadas y evaluadas contra <i>Alternaria chrysanthemi</i> . ....	58
<b>Tabla 7.</b> Extractos vegetales y fúngicos contra <i>Alternaria chrysanthemi</i> a las 48 y 96 horas de exposición en el bioensayo en microdilución. ....	63
<b>Tabla 8.</b> $CI_{50}$ y $CI_{90}$ de los extractos orgánicos contra <i>Alternaria chrysanthemi</i> .....	64
<b>Tabla 9.</b> $CI_{50}$ y $CI_{90}$ de los extractos acuosos contra <i>Alternaria chrysanthemi</i> .....	64
<b>Tabla 10.</b> Efectividad de los extractos incorporados al medio de cultivo (PDA) contra <i>Alternaria chrysanthemi</i> .....	66
<b>Tabla 11.</b> Efectividad de los extractos incorporados al medio de cultivo (PDA) sobre la densidad de esporulación <i>A. chrysanthemi</i> .....	67
<b>Tabla 12.</b> Metabolitos reportados de <i>Acalypha</i> spp. ....	70
<b>Tabla 13.</b> Severidad de la enfermedad evaluada en el patosistema <i>Alternaria chrysanthemi</i> - <i>Chrysanthemum morifolium</i> . ....	84

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Flores de crisantemo ( <i>D. grandiflorum</i> Ramat.).....	16
<b>Figura 2.</b> Invernaderos con plantas de crisantemo en Maní, Yucatán.....	17
<b>Figura 3.</b> Conidios y conidióforos de <i>A. chrysanthemi</i> .....	21
<b>Figura 4.</b> Lesiones observadas en las hojas de crisantemo .....	22
<b>Figura 5.</b> Diagrama de la estrategia experimental. ....	39
<b>Figura 6.</b> A) Plantas de crisantemo en campo, B) Esporas de <i>Alternaria chrysanthemi</i> en el material infectado y C) Desinfección del material vegetal. ....	42
<b>Figura 7.</b> a) Filtración b) homogenización de esporas en el Vortex y c) conteo de esporas en la cámara de Neubauer. ....	44
<b>Figura 8.</b> A) Crecimiento en medio PDA con 28 días, B) Crecimiento en extracto de malta con 28 días, C) Crecimiento en extracto de malta con 15 días, D) Conidios de <i>A. chrysanthemi</i> , E) Germinación de una espora y F) Conidióforo con espora. ....	46
<b>Figura 9.</b> A) Estructura del cinnamaldehído aislado de <i>Cassia tora</i> L., B) Estructura de La estrobilutina A y C) Estructura de la ciclosporina aislada de <i>Fusarium oxysporum</i> . ....	56
<b>Figura 10.</b> Determinación de la actividad fungicida o fungistática A) Extracto acuoso ACR al 3 % (100 %), extracto acuoso BFC al 3 % (100 %), y extracto etanólico ACR a (2 mg/mL y 4 mg/mL), y B) extracto acuoso ACR al 3 % (100 %) y extracto etanólico ACR (1, 2 y 4 mg/mL). ....	65
<b>Figura 11.</b> Efecto fungicida de los extractos vegetales sobre el crecimiento micelial de <i>Alternaria chrysanthemi</i> <b>A)</b> ACR etanólico (1000 µg/mL), <b>B)</b> ACR etanólico (500 µg/mL), <b>C)</b> ACR acuoso (3 %), <b>D)</b> ACR acuoso (1.5 %), <b>E)</b> BFC acuoso (3 %), <b>F)</b> BFH acuoso (3 %), <b>G)</b> Control positivo (Mirage 48CE) y <b>H)</b> Control negativo(Crecimiento). ....	66
<b>Figura 12.</b> Estructura química de la sakurosaponina .....	72
<b>Figura 13.</b> Distribución de los tratamientos en bloques al azar . <b>T</b> <sub>1</sub> = <i>Bonellia flammea</i> , <b>T</b> <sub>2</sub> = <i>Acalypha gaumeri</i> , <b>T</b> <sub>3</sub> = Testigo (agua), <b>T</b> <sub>4</sub> = Captan.....	81
<b>Figura 14.</b> Escala logarítmica diagramática de severidad en el patosistema <i>Chrysanthemum morifolium</i> - <i>Alternaria chrysanthemi</i> . ....	82
<b>Figura 15.</b> Curvas del Progreso de la enfermedad en el cultivo de crisantemo con tizón foliar causando por el agente <i>A chrysanthemi</i> , <b>T</b> <sub>1</sub> = <i>Bonellia flammea</i> , <b>T</b> <sub>2</sub> = <i>Acalypha gaumeri</i> , <b>T</b> <sub>3</sub> = Testigo (agua), <b>T</b> <sub>4</sub> = Captan.83	83

<b>Figura 16.</b> Promedio del Área Bajo la Curva del Progreso de la Enfermedad (ABCPE), T <sub>1</sub> = <i>Bonellia flammea</i> , T <sub>2</sub> = <i>Acalypha gaumeri</i> , T <sub>3</sub> = Testigo (agua), T <sub>4</sub> = Captan.....	85
<b>Figura 17.</b> Efectividad de los tratamientos en la severidad de la enfermedad, T <sub>1</sub> = <i>Bonellia flammea</i> , T <sub>2</sub> = <i>Acalypha gaumeri</i> , T <sub>3</sub> = Testigo (agua), T <sub>4</sub> = Captan.....	86
<b>Figura 18.</b> Efecto de los tratamientos sobre el número de botones florares en plantas de crisantemo a los 85 ddt, T <sub>1</sub> = <i>Bonellia flammea</i> , T <sub>2</sub> = <i>Acalypha gaumeri</i> , T <sub>3</sub> = Testigo (agua), T <sub>4</sub> = Captan.....	86
<b>Figura 19.</b> Efecto de los tratamientos en el diámetro del racimo de los botones florales en plantas de crisantemo a los 85 ddt, T <sub>1</sub> = <i>Bonellia flammea</i> , T <sub>2</sub> = <i>Acalypha gaumeri</i> , T <sub>3</sub> = Testigo (agua), T <sub>4</sub> = Captan.....	87

## RESUMEN

Un total de 37 extractos se seleccionaron del banco de la unidad de Biotecnología del CICY, por su capacidad para inhibir al hongo fitopatógeno *Alternaria tagetica*. Dichos extractos se evaluaron contra *A. chrysanthemi* empleando los bioensayos en microdilución y posteriormente el de dilución en agar. Los resultados señalaron a los extractos etanólico (>75 %) y acuoso (>50 %) de la raíz de *Acalypha gaumeri*, así como al extracto acuoso de la corteza de *Bonellia flammea* (>50 %), como los mejores extractos para inhibir a *A. chrysanthemi*. Con estos resultados, los dos extractos acuosos activos se evaluaron en cultivos de crisantemo a nivel de campo, midiendo la severidad de la enfermedad mediante una escala diagramática. A la séptima semana de aplicación de los extractos, la severidad de la enfermedad presentó una reducción de hasta un 67 y 49% para *A. gaumeri* y *B. flammea*, respectivamente. Estos resultados corroboran los resultados *in vitro* y señalan el gran potencial de estas plantas para seguir siendo investigadas para su posible aplicación en el control de *A. chrysanthemi* en campo.

## ABSTRACT

A total of 37 extracts were selected from a collection of plant extracts kept at the Unidad de Biotecnología at CICY for their ability to inhibit *Alternaria tagetica*. These extracts were evaluated against *A. chrysanthemi* using the microdilution bioassay technique and later by an agar dilution bioassay. The results showed that ethanol (>75%) and aqueous (>50%) extracts of *Acalypha gaumeri* root, and aqueous extract of *Bonellia flammea* stem (>50%) were the most active extracts to inhibit the plant pathogen. Then, the aqueous extracts of *A. gaumeri* and *B. flammea* were evaluated on chrysanthemum plants in the field. The severity of the disease was measured by a diagrammatic scale. During the seventh week of application of the extracts, the severity of the disease presented a reduction of 67 and 49% to *A. gaumeri* and *B. flammea*, respectively. Since these results were obtained at *in vivo* level, the selected plants are potential alternatives to control *A. chrysanthemi*. More investigations will continue in the field to apply these extracts to control *A. chrysanthemi*.

## INTRODUCCIÓN

El crisantemo (*Dendranthema grandiflorum* Ramat) es la segunda flor de corte más importante de las tres principales que se cultivan anualmente a nivel internacional, después de la rosa (*Rosa* spp.) (Villanueva-Couoh *et al.*, 2005). En el país, la superficie sembrada de crisantemo es de 2,388 ha, con un volumen de producción de 10.41 millones de toneladas (Esquivel-Pool *et al.*, 2005); en el estado de Yucatán este cultivo se encuentra proceso de introducción, con un volumen de producción de 700 toneladas anuales (SAGARPA 2005). En los últimos años, la floricultura en Yucatán se ha convertido en una de las actividades de gran aporte para el desarrollo económico y social de las regiones marginadas del estado. Sin embargo, los hongos fitopatógenos causan las mayores pérdidas económicas en este cultivo. Existen al menos 12 géneros que lo afectan significativamente, dentro de los cuales se encuentran los inductores de enfermedades foliares, representando la principal limitante en la producción y la calidad de la flor (Bautista *et al.*, 2002).

Entre los fitopatógenos que afectan la producción del crisantemo se encuentra *Alternaria chrysanthemi*, causante de necrosis de tejidos y marchitamiento; en las hojas provoca manchas circulares angulosas de color café oscuro a negro y en casos severos las lesiones pueden producir el ahogamiento del tallo (Camargo *et al.*, 2000).

El uso indiscriminado de agroquímicos sintéticos para el control de fitopatógenos, a induciendo la resistencia en los organismos, con lo que hay un aumento significativo en los costos de producción y problemas graves de contaminación ambiental. Esta situación ha llevado a investigadores de todo el mundo a buscar nuevos compuestos que representen alternativas para la protección de cultivos contra la acción de microorganismos fitopatógenos, y cuya actividad selectiva y seguridad ambiental sea adecuada. En este sentido, no es de extrañar que los productos naturales derivados de plantas y microorganismos sean una fuente atractiva de productos químico-biológicos potenciales para el control de organismos fitopatógenos, no solo por su diversidad en estructuras químicas sino también por su acción biológica específica y su carácter amigable a el ambiente (Bernal, 2005).

Con la finalidad de contribuir a esta búsqueda, 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 fuentes naturales. Un total de 20 plantas de la región se seleccionaron en base a sus antecedentes plaguicidas, de las cuales mediante un estudio exploratorio nueve presentaron actividad antifúngica contra *Alternaria tagetica* (Gamboa-Angulo *et al.*, 2008). Por otra parte, en la misma unidad se han evaluado mediante bioensayos antifúngicos un total de 148 extractos originados de hongos microscópicos aislados de la región

peninsular. De estos, 11 extractos presentaron actividad contra *A. tagetica* (De la Rosa-García, 2007; Reyes-Estebanez, 2007).

A partir de estas evaluaciones se seleccionaron 37 extractos (13 extractos vegetales etanólicos, 13 vegetales acuosos y 11 fúngicos) con la capacidad de inhibir el crecimiento de *A. tagetica*, los cuales se evaluaron contra *A. chrysanthemi*. Con estos antecedentes, el objetivo del presente trabajo es evaluar el control de *A. chrysanthemi* causante del tizón foliar en crisantemo (*Dendranthema grandiflorum* Ramat) con un agente natural bajo condiciones de laboratorio y campo. La actividad antifúngica *in vitro* de los extractos contra *A. chrysanthemi* se determinó utilizando el bioensayo en microdilución en placa y el bioensayo de dilución en agar. Los mejores extractos obtenidos *in vitro* se evaluaron en campo en cultivos de crisantemo determinando el porcentaje de la severidad de la enfermedad mediante una escala diagramática.

## Capítulo I

### Antecedentes, objetivos y diseño experimental

#### 1.1 ANTECEDENTES

##### 1.1.1 Generalidades del Crisantemo

El crisantemo es originario de Asia oriental y se desarrolla en climas tropicales, por lo que se puede cultivar en varias regiones de México (Romero-Cova 1996; Sánchez, 2003). El centro de origen del crisantemo es China; en este país se usa en escudos de armas, emblemas y motivos decorativos. Esta planta se dispersó por la India y llegó a Japón en el reinado de Ninto Ku en 313 A.C.; y se introdujo en Europa a finales del siglo XVIII; sin embargo, su amplia difusión no data de más de 80 años (Figueiredo, 2005).

##### 1.1.1.1 Descripción botánica del crisantemo

Presenta tallos herbáceos y hojas alternas que pueden ser dentadas o con márgenes de distintas formas. Las flores son apreciadas por su elegancia y la variedad de sus colores, con excepción del azul (Esquivel-Pool *et al.*, 2005). Estas se presentan arregladas en inflorescencias llamadas capítulos, los cuales pueden ser solitarios o reunidos en corimbos. La reproducción puede ser por semilla, por esqueje o por división de la planta. Existen millares de variedades catalogadas; por ejemplo se pueden distinguir las variedades de jardín y las variedades comerciales para flor cortada; según la forma de cultivo hay variedades de cultivo al aire libre, de invernadero y de cultivo en maceta. De acuerdo con el tamaño de los capítulos, destacan los crisantemos pompones, de flor pequeña y compacta y los chinos de flores más grandes (Figura 1). Las lígulas pueden ser incurvadas, recurvadas o irregulares, como en las variedades japonesas. Actualmente, se reconocen aproximadamente 150 especies, muchas de ellas derivadas de *Dendranthema grandiflorum* denominadas grandes flores (Cabrera *et al.*, 2004).



Figura 1. Flores de crisantemo (*D. grandiflorum* Ramat.)

Taxonómicamente, el crisantemo se clasificó originalmente en el género *Chrysanthemum* (del latín *Crysanthemum* y este del griego *chrysanthemon*, de *chrysos*, oro y de *anthemon*, flor). Sin embargo, recientemente la especie *Chrysanthemum morifolium* Ramat. se reubicó al género *Dendranthema*, por lo que su nombre científico correcto es *D. grandiflorum* (Ramat.), perteneciente a la clase dicotiledoneae, al orden compositae y a la familia asteraceae (Figueiredo, 2005; Russell *et al.*, 1997).

#### 1.1.1.2 Importancia económica del crisantemo

La horticultura ornamental es una actividad nacional rentable en el sector agrícola, ya que el valor de la producción de estos cultivos es más alto en comparación con otros. Sin embargo, la superficie destinada a su actividad es muy pequeña, representando el 0.07 % (0.0186 millones de ha) respecto a la superficie total nacional (20.99 millones de ha) (García, 2001).

El cultivo de crisantemo es de gran importancia a nivel mundial; los mercados más atractivos a nivel internacional son Estados Unidos (anual) y Europa (estacional). Los mercados potenciales para su exportación son Argentina, Alemania, Brasil, Canadá, Estados Unidos y Japón (Villanueva-Couoh *et al.*, 2005). Entre los principales exportadores se encuentran Colombia, Ecuador, Holanda, Israel y Kenya (Cadenas Agrolimétricas, 2005).

En México, el crisantemo es una flor importante ya que se encuentra dentro de los principales cultivos, ocupando el segundo lugar en cuanto a superficie sembrada y el primer lugar en cuanto a su valor de producción, seguido de la rosa, el gladiolo y el clavel. Los principales estados productores son: Baja California, Estado de México, Guerrero, Puebla y Sinaloa (SAGARPA, 2005).

En Yucatán, la floricultura ha sido en los últimos años una actividad importante para el desarrollo económico y social de las regiones marginadas, siendo el crisantemo la flor de corte más sembrada en los diferentes invernaderos del estado (Figura 2). La superficie destinada a la producción de este ornamental genera empleos para los pequeños productores; a pesar de no abarcar grandes áreas este cultivo es de alta rentabilidad.



Figura 2. Invernaderos con plantas de crisantemo en Maní, Yucatán.

### 1.1.1.3 Principales plagas y enfermedades del crisantemo

En el cultivo de crisantemo es importante mantener en buen estado fitosanitario tanto la flor como la parte vegetativa de la planta, ya que finalmente son las partes que se comercializan, y dependiendo de su calidad se cotizan en el mercado, sin importar si hay o no reducción en el volumen de producción (Otero, 2002).

Los principales hongos fitopatógenos en el cultivo del crisantemo son *Alternaria* sp., *Ascochyta* sp., *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Puccinia horiana*, *Rhizoctonia solani* y *Septoria chrysanthemi* (Tabla 1) (Camargo *et al.*, 2000; Sánchez, 2003).

**Tabla 1.** Principales enfermedades de origen fúngico en el crisantemo (Camargo *et al.*, 2000).

Enfermedad	Síntomas	Agente
Necrosis de tejidos y marchitamiento	Manchas de color café o marrón en las hojas, ahorcamiento del tallo	<i>Alternaria</i> sp.
Tizón	Manchas de color café en los pétalos de las flores de la inflorescencia. Lesiones en el tallo de color pardo o negro.	<i>Ascochyta</i> sp.
Tizón	Manchas en los pétalos de las flores de la inflorescencia de color pardo.	<i>Botrytis cinerea</i>
Cenicilla	Polvo blanco que cubre tallo y hojas.	<i>Erysiphe cichoracearum</i>
Marchitamiento	Clorosis o amarillamiento de las hojas, marchitamiento y muerte de la planta.	<i>Fusarium oxysporum</i>
Marchitamiento y enanismo	Pústulas de color rosado en las hojas, enanismo en la planta.	<i>Puccinia horiana</i>
Pudrición	Pudrición del tallo.	<i>Rhizoctonia solani</i>
Tizón	Manchas circulares pardas en el haz de las hojas.	<i>Septoria chrysanthemi</i>
Amarillamiento	Amarillamiento de las áreas foliares provocando la muerte de la planta.	<i>Verticillium alboatrum</i>

### 1.1.2 Generalidades del género *Alternaria*

El género *Alternaria* fue establecido en el año 1817 por Nees Von Esenbeck con el nombre de *Alternaria tenuis*. El nombre *Alternaria* viene del latín “*alternare*” y se refiere a la disposición que guardan los conidios. Los conidióforos de *Alternaria* se caracterizan por poseer uno o más septos transversales con apariencia geniculada. Los conidios son de color marrón pálido a marrón oscuro, ovalados u obclavatos, con o sin cuello, son multicelulares con septos transversales, longitudinales y algunas veces oblicuos. Estos pueden estar solitarios o formando cadenas de manera acropetal, donde el conidio más joven se encuentra en el ápice de la cadena (Fernández, 2005).

Todas las especies de *Alternaria* son parásitos facultativos que infectan a plantas y han sido patógenos responsables de epidemias masivas en cultivos de importancia agrícola (Gamboa, 2000; Tylkowska *et al.*, 2008);

son capaces de sobrevivir en el suelo o en plantas. Las esporas germinan en un amplio rango de temperaturas y son fácilmente diseminadas por el viento o por el agua. Bajo condiciones favorables los tubos germinativos de las especies de *Alternaria* germinan en aproximadamente 1-3 horas (Rotem, 1997).

En general, las especies de *Alternaria* son patógenos foliares que causan la destrucción de los tejidos del hospedero a través de la reducción del potencial fotosintético. La infección de las plantas es a través de sus estomas o bien directamente en la superficie de las hojas; los tejidos senescentes o bajo estrés son los más susceptibles a la infección (Thomma, 2003). La penetración en el tejido puede retardarse dependiendo de la virulencia de la especie, muchas de ellas son poco virulentas y lo realizan después de que emerge el tubo germinativo y se extiende en la superficie de la hoja (Rotem, 1997).

Los daños se pueden observar como lesiones necróticas, los residuos del hongo se encuentran en el centro de la lesión la cual se encuentra rodeada por un halo clorótico, síntoma común observado en los procesos de infección en las especies de *Alternaria*; esta zona es creada por la difusión de metabolitos tóxicos para la planta (Thomma, 2003). Las especies de *Alternaria* son capaces de producir toxinas específicas y toxinas no específicas del hospedero (fitotoxinas) (Solfrizzo *et al.*, 2004). La producción de metabolitos secundarios se ha usado para distinguir entre especies morfológicamente similares, especialmente entre las especies que presentan esporas pequeñas (Rotem, 1997).

#### **1.1.2.1 *Alternaria chrysanthemi* Simmons & Crosier**

El hongo fitopatógeno *Alternaria chrysanthemi* Simmons & Crosier se aisló en 1953 por Crosier de las semillas de *Chrysanthemum maximum* y en 1957 de semillas infestadas originarias de Holanda. Posteriormente, se aisló en 1963 de las hojas de esta misma planta en EE.UU, Florida y Australia; más tarde se encontró en las hojas de *C. indicum* L. en la india, por lo que se le conoce como una especie cosmopolita (Sobers, 1965).

**a) Clasificación taxonómica (Herrera & Ulloa, 1990)**

**Reino:** Eumycota

**División:** Dicyariomicota

**Subdivisión:** Deutoromycotina

**Clase:** Hyphomycetes

**Orden:** Moniliales

**Familia:** Dematiaceae

**Género:** *Alternaria*

**Especie:** *Alternaria chrysanthemi* Simmons & Crosier

**b) Características microscópicas**

Las características presentadas en el aislamiento de este hongo son micelio de color hialino, olivo pálido o café, con un diámetro de 4-8  $\mu$ . Los conidióforos se originan solamente de una fascicula; se pueden distinguir las cicatrices anulares (lugar de donde se separó el conidio), son erectos y miden 110  $\mu$  de largo por 6-11  $\mu$  (10  $\mu$ ) 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  $\mu$  (70  $\mu$ ) de largo y entre 10-26  $\mu$  (17  $\mu$ ), presentan entre 5 a 17 septas transversales y entre cero a seis longitudinales, el septo del conidio pueden tener una dimensión < 12  $\mu$  (Fig. 3) (Ellis, 1993; Rao, 1969; Cabrera *et al.*, 2004).

El crecimiento del conidióforo producido en cultivos artificiales comúnmente termina en la producción de un conidio solitario. En *A. chrysanthemi* éstos son producidos en una verdadera porospora en el ápice del conidióforo, en el hospedero natural usualmente mantienen su forma cilíndrica y pueden medir entre 130-160  $\mu$  de largo, con un ancho aproximadamente de 4.0 -5.3  $\mu$  (Simmons, 1965).

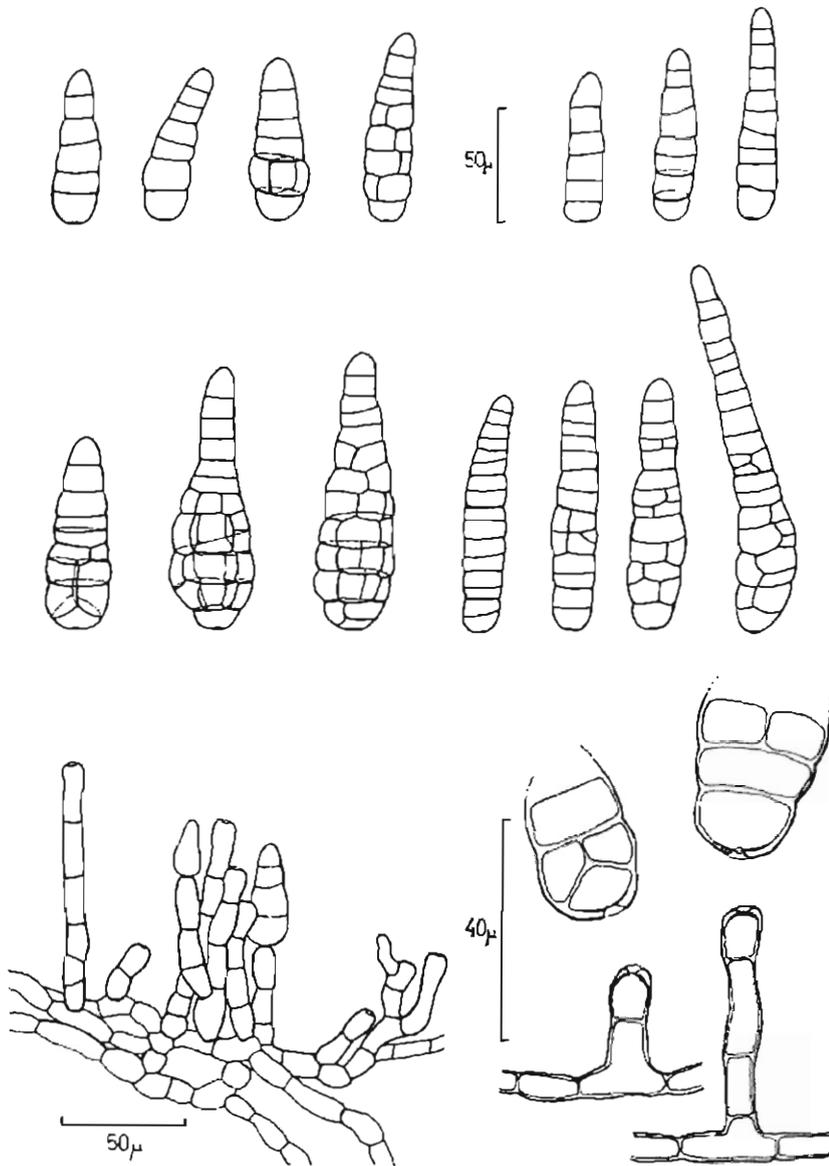


Figura 3. Conidios y conidióforos de *A. chrysanthemi* (Sobers, 1965)

### 1.1.2.2 Síntomas de *Alternaria chrysanthemi* 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 (Fig. 4) (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, lo que finalmente provoca la 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).

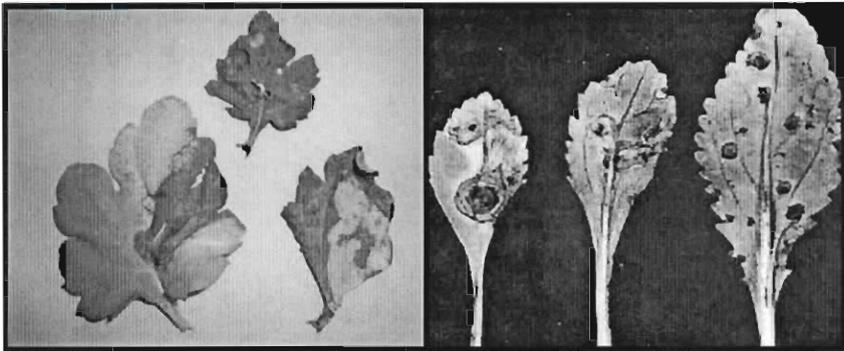


Figura 4. Lesiones observadas en las hojas de crisantemo (Sobers, 1965).

### 1.1.2.3 Estrategias de control de *Alternaria*

Para el control de *Alternaria* se utilizan diversas estrategias de control entre ellas están las siguientes:

#### 1.1.2.3.1 Control cultural

Incluye prácticas culturales que reducen la habilidad del patógeno para sobrevivir y por lo tanto el objetivo es disminuir el inóculo primario del patógeno y/o su habilidad para causar enfermedades. De manera preventiva se realiza seleccionando las plantas madres, arrancando y quemando las plantas enfermas, evitando excesos de humedad, además se eliminan las hojas inferiores para una mayor ventilación entre las plantas y así reducir la propagación del patógeno (Scholaen, 2005).

#### 1.1.2.3.2 Control genético

Implica el mejoramiento genético mediante la producción de variedades resistentes o tolerantes. Sin embargo, solo funcionan en la región donde se realizó el mejoramiento (Scholaen, 2005).

#### 1.1.2.3.3 Control químico

Involucra el uso de plaguicidas para reducir o erradicar la población del patógeno antes o después de sembrar, para prevenir la infección o dispersión del patógeno. Para su control se utilizan fungicidas comerciales tales como los sistémicos y los de contacto.

### **a) Fungicidas sistémicos**

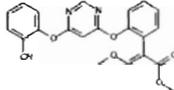
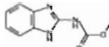
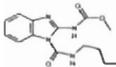
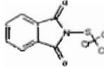
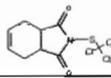
Los fungicidas sistémicos son absorbidos por las plantas a través de la raíz, hojas o semillas y son translocados en el interior de la planta (Agris, 2005), entre ellos se encuentran (Villanueva-Couoh et al., 2005)

### **b) Fungicidas de contacto**

Los fungicidas de contacto o de superficie se aplican en el follaje de la planta en forma de polvo o rociados, donde tales materiales no penetran apreciablemente la cutícula de la planta (Dulan, 2008). Entre los más utilizados se encuentran Captan, Clorotalonil y Folpan (Tabla 2).

Muchos agroquímicos son extremadamente efectivos para controlar a los patógenos, pero frecuentemente presentan efectos colaterales indeseables como el riesgo de intoxicación a los trabajadores del campo, desarrollo de resistencia en los patógenos y la acumulación de niveles tóxicos en el ambiente, incluyendo la contaminación del agua y del suelo (Dayan *et al.*, 2009) .

**Tabla 2.** Fungicida químicos usados en el control de *A. chrysanthemi*.

Fungicidas	Nombre comercial	Principio activo	Dosis de campo	Mecanismo de acción	Fórmula	Autor
Sistémicos	Amistar	Azoxystrobin	5 g/L	Potente inhibidor de la germinación de esporas e impide el crecimiento micelial, interfiere en la respiración mitocondrial bloqueando la transferencia de electrones en el citocromo bc1 lo que dificulta, la aparición de resistencias cruzadas con otras familias de fungicidas.		FRAC, 2009
	Derosal	Carbendazim	5.56 g/L	Alteran la división celular inhibiendo el ensamble de la $\beta$ -tubulina durante la mitosis.		FRAC, 2009
	Benomil	Benomil	4.5 g/l	Causa una distorsión morfológica de las esporas durante la germinación y se piensa que altera la división celular ya que inhibe el ensamble de la $\beta$ -tubulina durante la mitosis		FRAC, 2009; Ware & Whitacre, 2004
Contacto	Folpan	Folpet	2 g/L	Inhibe la división normal de la célula; fungicida de contacto multisitio		FRAC, 2009; Sanchez, 2003
	Daconil	Clorotalonil	4 g/L	Inactiva los grupos-SH en aminoácidos, proteínas y enzimas; inhibe la germinación de esporas		FRAC, 2009;
	Captan	Captan	4 g/L	Inhibe y altera diversos procesos metabólicos de manera simultánea; actividad de contacto multisitio		FRAC, 2009; Sanchez, 2003

### 1.1.3 Alternativas naturales para el control de fitopatógenos

Dentro del control orgánico, los productos naturales derivados de las plantas representan una fuente atractiva de productos potenciales (Guerrero-Rodríguez *et al.*, 2007). Algunos de estos han sido ampliamente estudiados por su capacidad de inhibir el crecimiento micelial, esporulación y germinación de hongos fitopatógenos (Radhakrishnan *et al.*, 2003; Itako *et al.*, 2008). También se encuentra el uso de extractos microbianos, como los fúngicos, de los cuales existen relativamente pocas investigaciones en cuanto a evaluaciones biológicas y sus aplicaciones.

#### 1.1.3.1 Extractos vegetales

México es un país con una gran diversidad biológica, debido a la amplia variedad de climas y condiciones fisiográficas. Existen aproximadamente 30, 000 especies de plantas vasculares que aun no han sido investigadas y que potencialmente pueden contener metabolitos secundarios con propiedades plaguicidas y con posibilidad de emplearse en la agricultura (Chi, 2005; Hernández *et al.*, 1998).

En el caso de microorganismos fitopatógenos, existe información de aproximadamente 400 especies de plantas con propiedad fungicida, y se estima que esta propiedad es una característica que se presenta frecuentemente en algunos metabolitos secundarios (Zamora-Natera *et al.*, 2005). El proceso para obtener metabolitos secundarios de las plantas es variable; se pueden obtener polvos, extractos acuosos o utilizar otros disolventes para obtener diferentes compuestos, según su polaridad (About-Jawdah *et al.*, 2002; Bautista-Baños *et al.*, 2002; Bautista *et al.*, 2003).

Los compuestos fenólicos sencillos (hidroxibenzoicos o hidroxicinámicos), son metabolitos secundarios comunes en las plantas muchos reportados con propiedades fungicidas; existen cumarinas clasificadas como antifúngicas y antibacterianas (Osorio, 2006); se ha observado que los alcaloides, terpenoides y los fenilpropanoides participan activamente matando al microorganismo patógeno o restringiendo su invasión al resto de la planta. Es así, como algunos metabolitos secundarios constituyen una parte importante de la respuesta de la defensa de las plantas sometidas al ataque por patógenos (Sepúlveda *et al.*, 2003).

*Azadirachta indica* (neem) es el mejor ejemplo de una planta usada frecuentemente en muchos países por su actividad antifúngica de amplio espectro utilizada; dicha actividad se le atribuye a las azadirachtinas y nimbidinas, entre otros. Otros extractos comúnmente utilizados son el de *Chrysanthemum cinerariaefolium*, productora de piretrinas y el de *Derris elliptica*, con un compuesto activo llamado rotenona (Stark, 1995; Chi, 2005).

Siguiendo esta línea de investigación, el trabajo realizado en la Unidad de Biotecnología (Gamboa-Angulo *et al.*, 2008) incluye reportes donde el extracto con mayor espectro de acción fungicida contra *Alternaria tagetica*, *C. gloeosporioides* y *F. oxysporum* correspondió al extracto de la raíz de *Croton chichenensis*. Con menor espectro fungicida se detectaron a los extractos de la hoja de *Trichilia minutiflora*, el tallo-raíz de *Ambrosia hispida* y la hoja de *Vitex gaumeri*. Asimismo, en este estudio se detectaron 11 extractos con capacidad de inhibir el crecimiento de *A. tagetica*, entre los cuales la mayor actividad se observó en el extracto de la raíz de *Acalypha gaumeri* (Tabla 3).

**Tabla 3.** Plantas de la península de Yucatán con actividad antifúngica contra *Alternaria tagetica* (Gamboa-Angulo *et al.*, 2008).

Especie	Familia	Parte vegetal	No. de voucher	% de inhibición
<i>Acalypha gaumeri</i> Pax & K. Hoffm. <sup>e</sup>	Euphorbiaceae	Raíz	PS 2584	94
<i>Ambrosia hispida</i> Pursh	Asteraceae	Hoja	PS 2579	51
		Tallo-raíz		52
<i>Calea urticifolia</i> (Mill.) DC. <sup>e</sup>	Asteraceae	Tallo	FM 1721	61
		Raíz		59
<i>Croton chichenensis</i> Lundell <sup>e</sup>	Euphorbiaceae	Tallo	PS 2571	53
		Raíz		62
<i>Furcraea cahum</i> Trel <sup>e</sup>	Agavaceae	Raíz	PS 2583	44
<i>Randia obcordata</i> S. Watson	Rubiaceae	Tallo	PS 2582	36
<i>Trichilia minutiflora</i> Standl. <sup>e</sup>	Meliaceae	Tallo	PS 2586	36
<i>Vitex gaumeri</i> Greenm.	Verbenaceae	Hoja	PS 2598	59

Nota: e = endémicas

Otra planta que se decidió evaluar contra *A. chrysanthemi* por su actividad fungicida reportada contra *Aspergillus niger*, *Fusarium* sp. y *Colletotrichum gloeosporioides* es *Bonellia flammea* (Mills. ex Mez) B.Ståhl & Källersjö (Rodríguez & Peña, 2003).

### 1.1.3.2 Extractos fúngicos

Los hongos micromicetos tienen la capacidad de producir metabolitos secundarios que han sido la base para la obtención de importantes fármacos, entre los que se incluyen antibióticos, antioxidantes, antitumorales e inmunosupresores (Herrera & Ulloa, 1998). En las actividades agrícolas y ganaderas, diversas especies de micromicetos son usadas como bioherbicidas y bioplaguicidas (Anke & Sterner, 2002)

Las especies de *Trichoderma* son hongos de vida libre que pueden ser usados para el control de muchos patógenos, al biosintetizar un amplio rango de metabolitos que actúan sobre los hongos patógenos. También está demostrado que especies de *Trichoderma* inducen respuestas de defensa local y sistémica en cultivos agrícolas tal como algodón, tabaco y lechuga (Reino *et al.*, 2008).

En algunos países se tienen ya disponibles a nivel comercial microorganismos antagonistas para controlar algunas enfermedades de cultivos agrícolas. En México, son pocas las investigaciones que se han realizado sobre el control orgánico de fitopatógenos, y principalmente se han realizado a nivel laboratorio e invernadero, y muy pocas en campo (Zavaleta, 2000). Entre estos últimos se encuentra la aplicación del filtrado de *Helminthosporium tritici-repentis* para controlar la roya de la cebada (*Puccinia striiformis* f. sp. *hordei*); logrando reducir al patógeno en un 40 % e incrementando la producción de grano de cebada a 1000 Kg/ha (Castrejón & González, 1994).

La evaluación de los extractos fúngicos del cepario del CICY sobre *A. tagetica*, llevaron a detectar 11 aislamientos con propiedades inhibitorias (Tabla 4). Estas correspondieron a las cepas de *Fusarium incarnatum* 1TZH23, *Fusarium* sp. 1XHH1Ga, *Zygosporium minus* 1TZH25, 2TZS6, 1TZH34, TZA13, XHA2, 2TZA2, 2TZA6, MRH42 y MRH45 con actividad antifúngica (De la Rosa-García, 2007; Reyes-Estebanez, 2009).



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 (aprox. a 50 °C) y se depositan en placas de Petri. Ya solidificadas se les añade el inóculo a las concentraciones deseadas y se incuban a 35 °C. El diámetro del crecimiento micelial se mide en direcciones perpendiculares y para determinar el porcentaje de crecimiento de cada muestra se sustrae al diámetro del crecimiento micelial los 6 mm correspondientes al disco de inoculación inicial; posteriormente se resta el diámetro del crecimiento del control negativo, el cual se considera como un 100 % del crecimiento del micelio, por lo que se multiplica por 100 y se divide entre crecimiento de la muestra, siguiendo la fórmula de Abbott (Andrews, 2001; Wenqiang *et al.*, 2006).

La CMI es definida como la concentración mínima a la cual es capaz de inhibir de manera visible el crecimiento de un microorganismo después de un periodo de incubación. 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).

#### **1.1.4.3 Método de E-test**

Método diseñado para cuantificar la actividad antifúngica, en un gradiente exponencial de las concentraciones del agente a evaluar. Consiste en una tira de plástico no poroso de 5 cm de largo por 5 mm de ancho que incorpora un gradiente predefinido de un antifúngico equivalente a 15 concentraciones dobles progresivas. Siguiendo la metodología de difusión, una vez que se ha inoculado la placa de agar con el patógeno, se coloca la tira de E-test sobre la superficie, produciéndose de forma inmediata una difusión del fungicida desde el soporte de plástico hasta al agar. Esta técnica solo se utiliza para evaluar compuestos comerciales (Salgado-Parreño *et al.*, 2004).

#### **1.1.4.4 Bioautografía**

Técnica usualmente usada para detectar la actividad antifúngica por absorción química, en la cual se utilizan placas cromatográficas de gel de sílice donde el extracto a evaluar se aplica y se eluye con un sistema de disolventes. Las placas se observan bajo luz ultravioleta de onda corta y larga, y las bandas visibles son marcadas. Posteriormente, en la superficie de las placas de gel se vierte suavemente agar inoculado con el patógeno a una concentración conocida. Transcurrido el tiempo de incubación, según el patógeno la placa es revelada. El  $R_f$  de las zonas de inhibición se comparan 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).

#### **1.1.4.5 Técnica en microdilución (microplaca)**

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 las ventajas de utilizar volúmenes finales menores (100 o 200  $\mu$ l), las diluciones son de manera automatizada, se puede realizar en menor tiempo y también se puede realizar con mayor número de muestras.

En este trabajo se utilizó esta técnica para determinar la actividad antifúngica de los extractos, así como la CMI de aquellos que presentaron una buena actividad (NCCLS, 2002).

### 1.1.5 Bibliografía

- Abou-Jawdah, Y., H. Sogh and 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.
- Agrios, G. N. (2005). *Plant Pathology*. Ed. ACADEMIC PRESS. 5th edition. University of Florida, Gainesville, U.S.A. 340p
- Andrews, J. (2001). *Determination of minimum inhibitory concentrations*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 48: 5-16.
- Anke, S. and O. Sterner (2002). "Insecticidal and nematocidal metabolites from fungi", in *The Mycota. A comprehensive treatise on fungi experimental systems for basic and applied research. X Industrial Applications*, Esser, K. and J.W. Bennett (eds). Springer-Verlag, New York. pp. 109-127.
- Bautista, B. S., D. E. García, N. L. Barrera, C. R. Reyes and C. L. Wilson (2003). *Seasonal evaluation of the postharvest fungicidal activity of powders and extracts of huamucil (Pithecellobium dulce): action against Botrytis cinera, Penillium digitatum and Rhizopus stolonifer of strawberry fruit*. Postharvest Biology Technology, 29, 81-92.
- Bautista-Baños, S., L. L. Barrera-Necha, L. Bravo-Luna and K. Bermúdez-Torres (2002). *Antifungal activity of leaf and stem extracts from various plant species on the incidente of Colletotrichum gloeosporioides of papaya and mango fruit after storage*. Revista Mexicana de Fitopatología, 20(1), 8-12.
- Cabrera, M.G., R. E. Alvarez, N. T. Sosa de Castro y L. A. Sosa (2004). *Patógenos de Chrysanthemum sp. en cultivos de Corrientes y Chaco, Argentina*. Universidad Nacional del Nordeste. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas. Resumen A028.
- Cadenas Agroalimentarias (2005). *Análisis del mercado mundial de flores*. [www.fundacionchile.clfcflores.analisis.cfm](http://www.fundacionchile.clfcflores.analisis.cfm).
- Camargo, S., V. García y R. Muciño (2000). *¿Que 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.
- Castrejón, S. A. y R. M. González (1994). *Posibilidad de control biológico de Puccinia striiformis f. sp. hordei en cebada, bajo condiciones de campo*. In: Memorias del XXI Congreso Nacional de Fitopatología. Cuernavaca, Morelos, México. 33 pp.

- Chi, R. F. (2005). *Evaluación del potencial fungicida de los extractos etanólicos de diez plantas nativas de la Península de Yucatán*. Tesis en la opción al título de químico industrial. Facultad de ingeniería Química. p 23, 41.
- Dayan, F. E., C. L. Cantrell and S. Duke (2009). *Natural products in crop protection*. *Bioorganica & Medicinal Chemistry*, 17(12), 4022-4034.
- De la Rosa, G. S. (2007). *Evaluación del potencial antimicrobiano de microorganismos aislados de cenotes de la Península de Yucatán*. *Tesis de Doctorado en Ciencias y Biotecnología en Plantas*. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. 144-147 p.
- Dulan, S. (2008). *McGraw-Hill's 10 ACT Practice Tests*. Ed. McGraw-Hill Professional, 2008. 727 p.
- Ellis, M. B. (1993). *Dematiaceous Hyphomycetes*. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England. CAB INTERNATIONAL. 465 p
- Esquivel-Pool A. G., E. Villanueva-Cohuo, A. Pérez-Gutiérrez, L. A. Sánchez-Cach y C. F. J. Fuentes-Cerda (2005). *El daminozide aumenta el diámetro de inflorescencia del crisantemo (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev.), cultivar Polaris White*. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 11(2), 361-364.
- Fernández, G. J. (2005). *Incidencia y caracterización: morfológica, patogénica y genética de *Alternaria* spp. en cultivos de cebolla del sur de puerto rico*. Tesis para el grado de Maestro en Ciencias en Protección de Cultivos. Universidad de Puerto Rico Recinto Universitario de Mayagüez. 8 p.
- Figueiredo, D. F. (2005). *Percepção sobre a gestão ambiental de resíduos químicos na cultura de crisântemo em uma unidade produtiva familiar no distrito de vargem alta, município de nova Friburgo, RJ: um estudo de caso*. Requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Sistemas de Gestão. Universidade federal Fluminense centro Tecnológico Maestrado Profissional de Sistemas de Gestão. 26 p.
- Fungicide Resistance Action Committee (FRAC) (2009). *Mode of action of fungicides*. FRAC classification on mode of action 2009. ([www.frac.info](http://www.frac.info)). FRAC\_Code\_List\_2009.
- Gamboa, A. M. (2000). *Metabolitos fitotóxicos producidos por *Alternaria tagetica**. Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas (*Química organica*). Universidad autónoma de México. 6 p

- Gamboa-Angulo, M., A. J. Cristóbal, B. L. Medina, R. F. Chi, G. R. Mendéz, P. P. Sima and P. May (2008). *Antifungal properties of selected plants from the Yucatán peninsula, Mexico*. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 24, 1955-1959.
- García, R. R. (2001). *Estudio preliminar de manejo Integrado del crisantemo (Dendrathera grandiflorum Tzvel.) cv. Polaris en Villa Guerrero Edo. De México*. Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados. Montecillo. México. 81 p.
- Guerrero-Rodríguez, E., S. Solís-Gaona, F. D. Hernández-Castillo, A. Flores-Olivas y V. Sandoval-López (2007). *Actividad biológica in vitro de extractos de Flourensia cernua D.C. en patógenos de postcosecha: Alternaria alternata (Fr.: Fr.) Keissl., Colletotrichum gloeosporioides (Penz) Penz. y Sacc. y Penillium digitatum (Pers.Fr.) Sacc.* Revista Mexicana de Fitopatología, 53(1), 48-53.
- Hernández de J., T. Sanabria, M. Quintos, J. García y N. Romero (1998). *Estudio preliminar de especies vegetales contra fitopatógenos*. En: Resúmenes del IX Congreso Mexicano de Etnobiología. La Asociación de Etnobiológica Mexicana y el Instituto Tecnológico Agropecuario N 23, Xoxocatalán, Oaxaca. p 49.
- Herrera, T. y Ulloa, M. (1990). *El reino de los Hongos*. Micología básica Aplicada. Fondo de Cultura Económica. 37-43 p.
- Itako, A., K. Schwan-Estrada, J. Tolentino, J. Stangarlin y M. Silva (2008). *Actividade antifúngica e proteção do tomateiro por extratos de plantas medicinais*. Tropical Plant Pathology, 33(3), 241-244.
- Kimura, N. and T. Tsuge (1993). *Gene Cluster Involved in Melanin Biosynthesis of the Filamentous Fungus Altemaria alternata*. Journal of Bacteriology, 175 (14), 4427-4435.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2002. *Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Approved standard M38-A*. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, 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.
- Nostro, A., M. P. Germanó, V. D'Angelo, A. Marino and M. A. Cannatelli (2000). *Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity*. Letters in Applied Microbiology, 30, 379-384.

- Osorio S. G. (2006). *Evaluación de hongos endofíticos y extractos botánicos para el Control de la sigatoka negra (Mycosphaerella fijiensis Morelet) en banano. Tesis de maestría en Agricultura Ecológica.* CATIE Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. Escuela de Posgraduados. 10p.
- Radhakrishnan, S. S., R. R. Velusamy, R. R. Rajavel, S. Misilamani and N. Srinivasam (2003). *Antifungal activity essential oils.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51, 7596-7599.
- Rao, V. G. (1969). *The Genus Alternaria-from India.* Nova Hedwigia, 17, 219-258.
- Reino, J. L., R F. Guerrero, R. Hernández-Gala and I. G. Collado (2008). *Secondary metabolites from species of the biocontrol agent Trichoderma.* Phytochemistry Reviews, 7, 89-123.
- Reyes-Estebanez, M. M. J. (2009). *Estudio exploratorio de la bioactividad de hongos microscópicos asociados a restos vegetales, en zonas tropicales de México.* Tesis para obtener el grado de doctorado en ciencias y biotecnología de plantas. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. 7 p.
- Rodríguez, F. A. y L. M. Peña (2003). *Detección y purificación de metabolitos bioactivos de la especie Jacquinia flammea del Estado de Yucatán.* En: Memoria del II Congreso de Estudiantes del Verano. 3 de octubre de 2003. Universidad Autónoma de Yucatán. Programa de Impulso y orientación a la investigación *priori*. p. 231-232.
- Romero-Cova, S. (1996). *Plagas y enfermedades de ornamentales.* Universidad Autonoma Chapingo. Chapingo, Tesis para obtener el grado de maestra en ciencias hortícolas. Edo. De México. 244 p.
- Rotem, J. (1997). *The Genus Alternaria, Biology, Epidemiology, and Pathogenicity.* Ed. APS Press. Minnesota, USA. 83 p.
- Russell, A. B., J. W. Hardin, L. Grand and A. Fraser (1997). *Chysanthemum x morifolium (Dendratherma x glandiflorum).* North Carolina State University.
- SAGARPA (Secretaría de Agricultura y Ganadería y Pesca) (2005). *Anuario Estadístico de la Producción Agrícola de los Estados Unidos Mexicanos.* SAGARPA. Centro de Estadística Agropecuaria. [www.sagarpa.mx](http://www.sagarpa.mx)
- Salgado-Parreño, F. J., J. Alcoba-Florez, A. Arias, M. D. Moragues, G. Quindós and J. Pontón (2006). *In vitro activities of voriconazole and five licensed antifungal agents against Candida dubliniensis:*

- comparison of CLSI M27-A2, sensititre yeast one, disk diffusion, and etest methods. *Microbial Drug Resistance-Mechanisms Epidemiology and Disease*, 12, 246–51.
- Sánchez, B. M. A. (2003). *Diagnóstico y control químico del tizón foliar en el crisantemo (Chrysanthemum morifolium Ramat. kitamura) en Yucatán, México*. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias en Horticultura Tropical. Instituto Tecnológico Agropecuario No. 2, Conkal, Yucatán, México. 27-32 pp.
- Scholaen, S. (2005). *Manejo integrado de plagas en hortalizas*. Ed. Deusche Gesellschaft f.r Technische Zusammenarbeit (GTZ GmbH). 15-16 p.
- Sepúlveda, G., H. Porta y M. Rocha (2003). *La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas*. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 21(1), 355-363 p.
- Simmons, E. G. (1965). *Alternaria chrysanthemi*. *Mycologia* 57: 140-143.
- Sobers, E. K. (1965). *Alternaria chrysanthemi in Florida*. Annual meeting of the Florida State Horticultural Society, 78, 419-422.
- Solfrizzo, M., C. Vitti de Girolamo, A. Visconti, A. Logrieco, and F. P. Fanizzi (2004). *Radicinols and radicinin phytotoxins produced by Alternaria radicina on carrots*. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 52, 3655–3660.
- Stark, J. D. and J. F. Walter (1995). *Neem oil and neem oil components affect the efficacy of commercial neem insecticides*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43(2), 507-512.
- Otero, C. G. (2002). *Ácaros plagas de plantas ornamentales. Manejo Fitosanitario de Ornamentales*. 1ª. Edición. Colegio de Postgraduados, Instituto de Fitosanidad. 237 p.
- 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 and E. Zenkteler (2008). *Histopathology of Daucus carota L. root cells treated with toxic metabolites produced by Alternaria radicina and A. alternata*. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, 50(1), 27–34.
- Villanueva-Couoh. E., B. M. Sánchez., A. J. Cristóbal y S. J. Tún (2005). *Diagnostico y alternativas de manejo químico del tizón foliar (Aternaria chrysanthemi Simmons y Crosier) del crisantemo (Chrysanthemum morifolium Ramant.) Kitamura en Yucatán, México*. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 23(1), 49-56.

- Ware, G. and D. Whitacre (2004). *The pesticide book*. 6a ed, Meister Media Worldwide, Willoughby, Ohio. 496 p.
- Wenqiang, G., L. Shufen, Y. Ruixiang and H. Yanfeng (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(11), 992-998.
- Zamora-Natera, J. F., A. Bernal-Alcocer y M. Ruiz-López (2005). *Perfil de alcaloides de semillas de Lupinus exaltatus Zucc. (Fabaceae) y la evaluación antifúngica del extracto alcaloideo y lupanina contra fitopatógenos*. Revista Mexicana de Fitopatología, 23(2), 124-129.
- Zavaleta, M. (2000). *Alternativas de manejo de enfermedades de las plantas*. Instituto de Fitosanidad, Colegio de Postgraduados. Montecillo, Edo. de México.

## 1.2 OBJETIVOS

### 1.2.1 Objetivo general

Evaluar el control de *Alternaria chrysanthemi* causante del tizón foliar en crisantemo (*Dendranthema grandiflorum* Ramat) con un agente natural bajo condiciones de laboratorio y campo en la Península de Yucatán.

### 1.2.2 Objetivos específicos

1. Aislar e identificar una cepa de campo de *Alternaria chrysanthemi* de cultivos infestados con este patógeno.
2. Establecer las condiciones del bioensayo antifúngico en microdilución con *A. chrysanthemi*.
3. Evaluar *in vitro* mediante los bioensayos en microdilución y dilución en agar la acción inhibitoria de los extractos fúngicos y vegetales del banco de la Unidad de Biotecnología contra *A. chrysanthemi*.
4. Determinar la concentración inhibitoria 50 y 90 de los extractos con mayor actividad antifúngica contra *A. chrysanthemi*.
5. Evaluar en campo en cultivos de crisantemo (*Dendranthema grandiflorum* Ramat) el extracto con mayor actividad antifúngica contra *Alternaria chrysanthemi*.

### 1.3 MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo experimental se dividió en dos etapas: de laboratorio y de campo (Figura 5).

La etapa de laboratorio comprendió las siguientes fases:

- a) El aislamiento de una cepa de campo de *Alternaria chrysanthemi* y su conservación.
- b) La optimización de las condiciones de esporulación masiva en extracto de malta y medio-S.
- c) El establecimiento del bioensayo en microdilución para *A. chrysanthemi* y evaluación de los extractos seleccionados.
- d) Determinación de la CMI de los extractos activos.
- e) Evaluación de los mejores extractos mediante el bioensayo de dilución en agar.
- f) Obtención de cantidades adicionales del extracto a utilizar en la fase de campo.
- g) Análisis estadísticos de los resultados.

La etapa de campo consistió de las siguientes fases:

- a) Limpieza del área experimental.
- b) Siembra de esquejes de la variedad Polaris en bloques experimentales de 1 m de ancho x 12 m de largo.
- c) Aplicación de los extractos acuosos de raíz de *Acalypha gaumeri* y corteza de *Bonellia flammea* con sus respectivos controles.
- d) Evaluación de la severidad de la enfermedad.
- e) Análisis estadísticos de los resultados.

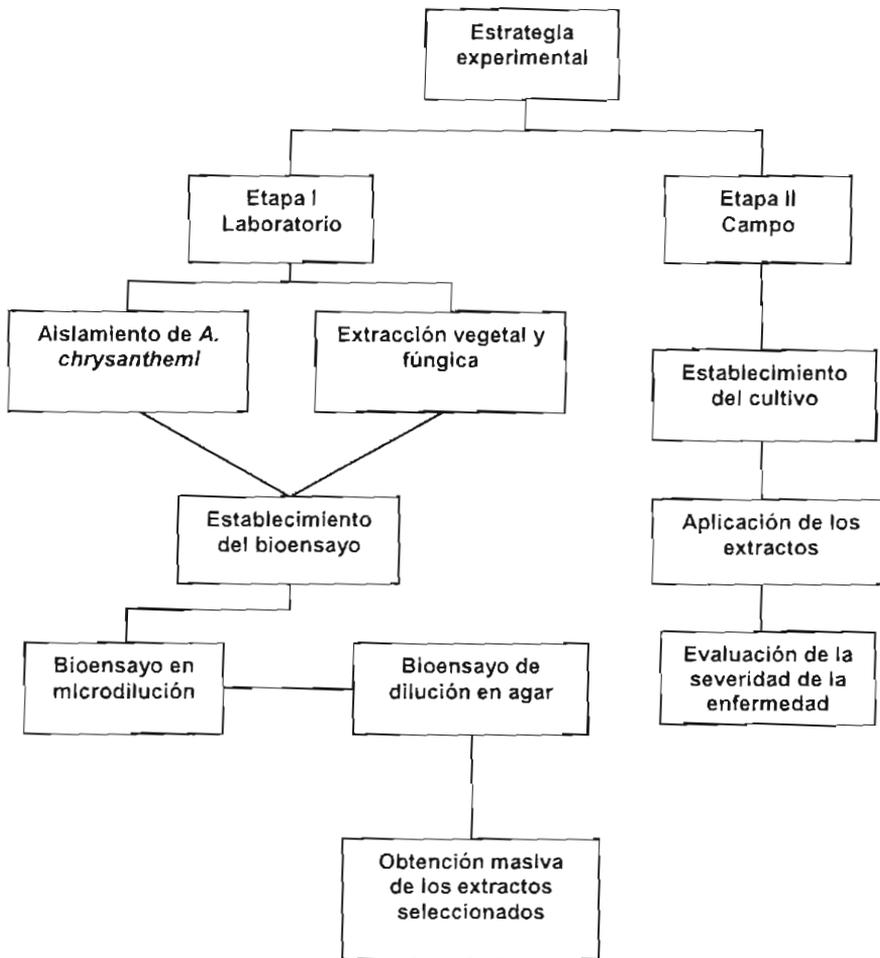


Figura 5. Diagrama de la estrategia experimental.

## Capítulo II

### Aislamiento de *Alternaria chrysanthemi* y establecimiento del bioensayo

#### 2.1 INTRODUCCIÓN

Existen muchas técnicas o metodologías para evaluar el potencial antimicrobiano de un compuesto natural. Los más usados son la bioautografía, difusión en disco y dilución en agar (Scorzoni *et al.*, 2007). Sin embargo, estas técnicas tienen ciertas desventajas, por ejemplo, la técnica de difusión en disco y la bioautografía no permiten evaluar simultáneamente un gran número de extractos a la vez, se utilizan cantidades mayores de muestra, además no permiten evaluar compuestos que no se difunden rápidamente dentro del agar, y existe una alta posibilidad de descomposición de los compuestos durante la realización del bioensayo (Hadacek & Greger, 2000; Scorzoni *et al.*, 2007).

El Comité Nacional para Estándares de Laboratorio Clínico norma en 1997 las condiciones para los ensayos de susceptibilidad para levaduras (M27-A) (NCCLS, 1997). Al ser estos organismos unicelulares, facilita los procesos de estandarización, pero ese no es el caso de los hongos filamentosos. Por lo tanto se requirió una modificación en las guías para la microdilución y la microdilución (M38) para hongos filamentosos (Espinel-Ingroff, 1998; Meletiadis *et al.*, 2002). A pesar de los muchos esfuerzos, la reproducibilidad entre laboratorios era baja, hasta que el NCCLS (Siglas en Inglés) en el 2002, propuso el método para hongos filamentosos (M38-A) (Espinel-Ingroff, 2003). La microdilución ofrece un gran potencial en comparación con otros bioensayos, entre las ventajas es que son rápidos de realizar, se analizan muchas muestras simultáneamente y las cantidades de muestra requeridas son en microgramos. 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 como el bioensayo de dilución en agar en medio sólido, pero no es el caso al medio líquido. Otra ventaja, es que los efectos de respuesta-concentración pueden estudiarse fácilmente por análisis de regresión para obtener la  $CI_{50}$  y  $CI_{90}$  (Hadacek & Greger, 2000). Con estos antecedentes, en este capítulo se estableció el bioensayo antifúngico en microdilución con *A. chrysanthemi* determinando los puntos críticos como la cantidad de inóculo, medio de cultivo, tiempo y temperatura de incubación, entre otros factores, con la finalidad de establecer las condiciones óptimas para el bioensayo, ya que en los documentos del NCCLS no se reporta bioensayo con el género de *Alternaria*.

## 2.2 OBJETIVOS

1. Aislar, identificar y conservar una cepa de campo de *Alternaria chrysanthemi* a partir de cultivos infestados con este patógeno.
2. Establecer las condiciones del bioensayo antifúngico en microdilución con *A. chrysanthemi*.

## 2.3 MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.3.1 Aislamiento de *Alternaria chrysanthemi*

Las hojas y tallos de plantas de crisantemo que presentaron signos y síntomas correspondientes a un tizón foliar se colectaron en la Unidad Florícola Nichte-Ha, perteneciente al municipio de Chocholá, Yucatán. A partir de este material infectado se hicieron cortes de aproximadamente un  $\text{cm}^2$ , abarcando zonas sanas y enfermas; posteriormente se desinfectaron en una solución de hipoclorito de sodio al 2 % durante 2 min., se lavaron en agua destilada, se inocularon (de cuatro a cinco cortes) en cajas Petri conteniendo Papa dextrosa Agar (PDA) y se incubaron a  $23 \pm 1^\circ\text{C}$  en oscuridad (Villanueva-Couoh, *et al.*, 2005). Después de 15 días, las colonias de hongos que crecieron se purificaron por cultivos monospóricos (Figura 6).

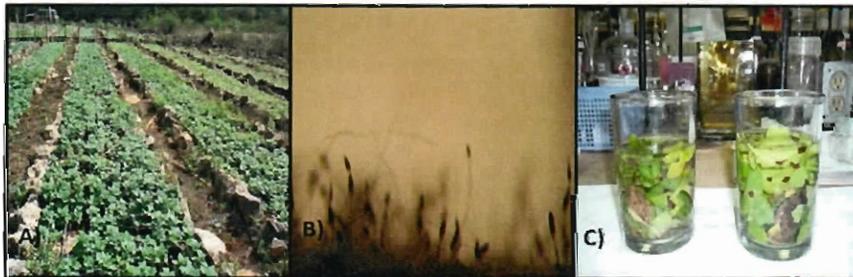


Figura 6. A) Plantas de crisantemo en campo, B) Esporas de *Alternaria chrysanthemi* en el material infectado y C) Desinfección del material vegetal.

#### 2.3.1.1 Purificación de la cepa de *Alternaria chrysanthemi* por cultivos monospóricos

Para realizar el cultivo monospórico, cajas Petri conteniendo medio extracto de malta se marcaron con cuatro círculos en los cuatro puntos cardinales. Con la ayuda de un estereoscopio se observó la presencia de esporas en el material vegetal infectado y con una aguja entomológica se transfirieron varias esporas a uno de los círculos de la caja Petri. Posteriormente, una espora se transfirió a cada uno de los círculos restantes. Después de tres

días, las esporas germinadas (con micelio) se transfirieron a cajas individuales (espora/caja Petri), los cuales se incubaron a  $23 \pm 1^\circ\text{C}$ .

### **2.3.1.2 Identificación del fitopatógeno *Alternaria chrysanthemi***

La identificación del hongo *A. chrysanthemi* se hizo mediante microcultivos, utilizando las claves de Barnett y Hunter (1999). Asimismo, se realizaron mediciones del ancho y largo de 100 conidios con la ayuda de un microscopio (Estándar Modelo K7) y con aumento 400x.

### **2.3.1.3 Conservación de la cepa**

La cepa purificada de *Alternaria chrysanthemi* se cultivó en:

- a) Medio extracto de malta en tubos Eppendorf inclinados a partir de cultivos de 10 días de edad, los cuales se incubaron a  $4^\circ\text{C}$  en oscuridad.
- b) En glicerol/agua (25:75) a partir de cultivos de 10 días de edad, los cuales se incubaron a  $4^\circ\text{C}$  en oscuridad.
- c) Los fragmentos de agar con el patógeno se conservaron en agua estéril a temperatura ambiente.
- d) En ampollitas de vidrio previamente esterilizadas conteniendo 1.5 mL de leche Svelty al 20%, se le agregó un mL de la suspensión homogénea de esporas y se tapó con un algodón esteril. Las ampollitas se colocaron en una liofilizadora marca Labconco por 3 días. Posteriormente, las ampollitas se cerraron, se etiquetaron y se conservaron en el congelador (Smith & Onions, 1994).
- d) Se realizaron cultivos padres en tubos cónicos para centrifuga (marca Falcon) conteniendo medio extracto de malta, los cuales se inocularon con el fitopatógeno con 10 días de edad y se incubaron a  $4^\circ\text{C}$  en oscuridad. Estos se utilizaron para obtener las esporas empleadas en el bioensayo en microdilución.

### **2.3.2 Inducción de la esporulación de *Alternaria chrysanthemi***

Para inducir la esporulación de *Alternaria chrysanthemi* se utilizó la metodología establecida por Shahin y Shepard (1979), haciendo modificaciones en el medio inicial. Una suspensión de micelio (0.8 mL) se inoculó en cajas Petri conteniendo extracto de malta y se incubaron por tres días, en oscuridad a  $23^\circ\text{C}$ . Antes de que apareciera el micelio aéreo, el medio se cortó en cuadros de aproximadamente  $4\text{ mm}^2$  y se depositaron en la superficie del medio-S. Posteriormente se adicionó agua destilada estéril (2 mL) hasta cubrir los cuadros, manteniéndolos a  $18^\circ\text{C}$  en oscuridad, por siete días.

### 2.3.3 Establecimiento del bioensayo en microdilución

#### 2.3.3.1 Suspensión de Esporas

Una solución salina al 0.85% con 0.05% de tween 20 (15 mL) se adicionó a la superficie del cultivo del patógeno. Posteriormente, con ayuda de un portaobjetos se removieron las esporas y el micelio de la caja. La solución se filtró a través de un colador estéril (5 cm de diámetro, malla de 1 mm) y una segunda filtración se realizó con una doble capa de tela de gasa. Las esporas del filtrado resultante se contabilizaron\* con ayuda de la cámara de Neubauer (10  $\mu$ L). La suspensión de esporas se ajustó a una concentración final de  $2.5 \times 10^4$  esporas/mL (De la Rosa, 2007) (Figura 7).

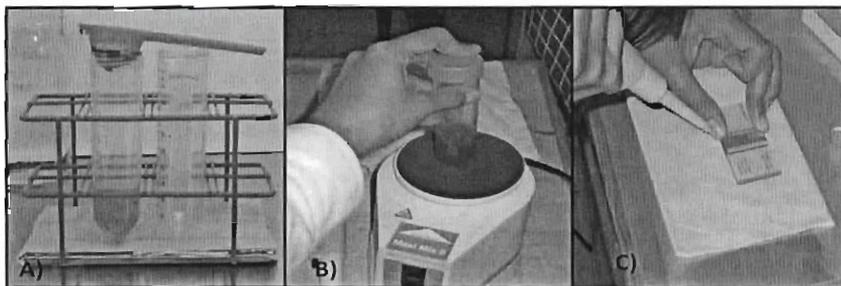


Figura 7. a) Filtración b) homogenización de esporas en el Vortex y c) conteo de esporas en la cámara de Neubauer.

\*No. de esporas  $\times$  mL = Esporas en cuatro cuadrantes (16 cuadros cada cuadrante) / 4 (cuadrantes)  $\times$  0.1 (grosor del cubreobjetos)  $\times$  1000  $\times$  la dilución

#### 2.3.3.2 Prueba antifúngica con los diferentes extractos para el bioensayo en microdilución

##### a) Extractos orgánicos

Los extractos fúngicos y vegetales se disolvieron en dimetilsulfóxido (DMSO) y se transfirieron a una microplaca estéril de 96 pozos. A continuación, a todos los pozos de la microplaca se les adicionó 100  $\mu$ L de medio RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute) marca Sigma. Posteriormente, al primer pozo de cada columna se le adicionaron 90  $\mu$ L de medio RPMI 1640 (20 mM HEPES y L-glutamina, sin  $\text{NaHCO}_3$ ) y 10  $\mu$ L del extracto orgánico (40  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ). Un volumen total de 100  $\mu$ L de esta mezcla homogénea se transfirieron al segundo pozo y así sucesivamente hasta el pozo No. 3, logrando de esta manera reducir la concentración inicial en cada pozo. Finalmente, se adicionaron 100  $\mu$ L de la suspensión de esporas ( $2.5 \times 10^4$  esporas/mL) del hongo fitopatógeno en cada pozo para obtener un volumen total de 200  $\mu$ L con una concentración final de 1000, 500 y 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  del extracto y 2.5, 1.25 y 0.62% del DMSO. Como control negativo de crecimiento se empleó el medio RPMI 1640, el fitopatógeno y DMSO al 2.5

% (suspensión de esporas en RPMI 1640); y como control positivo se utilizó DMSO al 25%. Las microplacas se incubaron a 23 °C en oscuridad por 96 horas. Las pruebas se realizaron por cuadruplicado y se observaron a las 48 y 96 horas.

### b) Extractos acuosos

En el caso de los extractos acuosos se realizó el mismo procedimiento descrito anteriormente. En cada pozo se depositó 100 µL de medio RPMI 1640, posteriormente se adicionaron 100 µL del extracto acuoso y 100 µL de medio RPMI 1640, se mezclaron homogéneamente y se transfirieron 100 µL al segundo pozo. Las concentraciones finales evaluadas de material vegetal seco fueron 30, 15 y 7.5 g/L correspondientes al 3, 1.5 y 0.75 %, respectivamente.

#### 2.4.3.3 Lectura de la microplaca

La lectura se realizó de manera visual mediante la escala numérica establecida por el Comité Nacional para Estándares de Laboratorio Clínico (NCCLS) (Tabla 5). Primero se verificó que en los controles de medio RPMI 1640 con el fitopatógeno, la germinación y crecimiento micelial hubieran sido exitosos (control negativo) (4); por el contrario estos parámetros se inhiben con el DMSO al 25 % (control positivo) (0).

**Tabla 5.** Escala numérica de la inhibición del crecimiento en el bioensayo de microdilución en microplaca (NCCLS, 2002).

PARÁMETRO DE MEDIDAS	ESCALA
Ninguna reducción del crecimiento	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
Completamente claro, sin ningún crecimiento comparando con el control negativo	0

El porcentaje de inhibición de la germinación y del crecimiento micelial se determinó mediante la fórmula de Abbott, con los valores obtenidos del crecimiento, determinados mediante la escala establecida por el NCCLS (Tabla 5). Fórmula de Abbott:

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

## 2.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El trabajo se inició con el aislamiento de la cepa patogénica de *A. chrysanthemi*, la cual se obtuvo a partir de hojas infectadas de cultivos de crisantemo en el estado de Yucatán, esta cepa se purificó empleando la técnica de cultivos monospóricos en medio papa dextrosa agar (PDA).

Una vez purificada la cepa se identificó por taxonomía tradicional mediante las características morfológicas de los conidios y las colonias cultivadas en el medio PDA y extracto de malta. En el primer medio, las colonias se observaron algodonosas de un color blanquecino a café palido. Asimismo, en el medio extracto de malta las colonias se observaron aterciopeladas o velutinosas, inicialmente de color olivo en los bordes y tornadose a un color grisáceo con la edad; al reverso de la caja se observaron de color negro (Figura 8). Camargo *et al.* (2000) reportó que las colonias en PDA y en jugo V-8 (JV8A) se observaron de color pardo claro a blanquecino; de igual forma indicó que la estructura y el color varía en los diferentes medios. Ellis (1993), reportó que las colonias en su mayor parte, son efusas, algodonosas, de color gris a marrón oscuro.

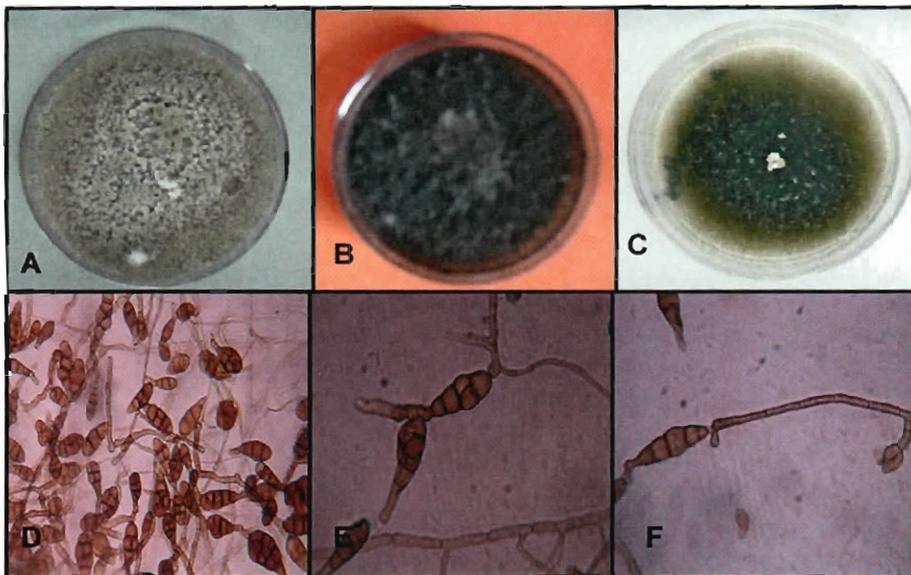


Figura 8. A) Crecimiento en medio PDA con 28 días, B) Crecimiento en extracto de malta con 28 días, C) Crecimiento en extracto de malta con 15 días, D) Conidios de *A. chrysanthemi*, E) Germinación de una espora y F) Conidióforo con espora.

Los conidios de *A. chrysanthemi* presentaron una forma obclavada o cilíndrica de color oscuro, los cuales se encuentran constreñidos a nivel septo. En su morfometría, los conidios presentaron una longitud de 52  $\mu$  por 15  $\mu$  de diámetro en la parte más ancha, a veces hasta un tercio de la

longitud del conidio; con un promedio de cinco septas transversales y una longitudinal (Figura 8). Esta descripción coincide con la literatura y confirma la identidad del aislamiento como perteneciente a la especie *A. chrysanthemi* (Barnett & Hunter, 1999).

En el presente trabajo, el problema principal se debió a la inducción de la esporulación de *A. chrysanthemi*. Está reportado que las especies de *Alternaria* son difíciles de esporular *in vitro*, requieren de técnicas especiales (Carvalho *et al.*, 2008). Por tal razón se probaron diferentes condiciones de cultivo como temperatura, luz y medio de esporulación para obtener el mayor número de esporas de *A. chrysanthemi* requerido en el bioensayo en microdilución. Para esto se evaluaron los medios de PDA, Agar maíz, infusión de hojas de crisantemo y extracto de malta, obteniendo con este último el mayor número de esporas con  $2 \times 10^4$  esporas/mL. Sin embargo, esta cantidad no cubrió la demanda necesaria para la realización de los bioensayos en microdilución. Para *Alternaria* se han utilizado además de los medios mencionados, papa agar, avena agar, jugo V8, jugo V-8 más Carbonato de Calcio ( $\text{CaCO}_3$ ), agar sacarosa  $\text{CaCO}_3$  (Vloutoglou *et al.*, 1999; Queiroz *et al.*, 2004; Guerrero-Rodríguez *et al.*, 2007), y la inducción de la esporulación utilizando el medio-S, enriquecido con  $\text{CaCO}_3$ , Sacarosa y agar (Shahin & Shepard, 1979). Este último se evaluó cambiando el medio primario PDA por extracto de malta, debido a que con el medio PDA produce una gran cantidad de micelio interfiriendo al filtrar las esporas para obtener el inóculo final para el bioensayo en microdilución. Con este método se obtuvo una carga final de  $2.5 \times 10^6$  esporas/mL y posteriormente se ajustó a  $2.5 \times 10^4$  esporas/mL para el bioensayo.

Una vez establecida la metodología para la obtención de las esporas se procedió a establecer el bioensayo en microdilución. La técnica utilizada fue con base en la reportada por Comité Nacional para Estándares de Laboratorio Clínico (NCCLS, M38-P). Sin embargo, se realizaron algunas modificaciones ya que para cada patógeno existen parámetros o condiciones óptimas requeridas para la evaluación reproducible. Dentro de los parámetros a estandarizar (Espinel *et al.*, 1997; Li *et al.*, 2000; Santos & Hamdan, 2005) para su reproducibilidad se encontraron los siguientes:

El medio sintético recomendado y que se utilizó fue el RPMI-1640 con glutamina y sin bicarbonato sódico, tamponado con ácido 3-(N-morfolino)-propansulfónico (MOPS) 0,165 M, ajustado a pH  $7 \pm 0,1$  y suplementado con glucosa 18 g/L (producto ya comercial marca Sigma). Los resultados con *A. chrysanthemi* confirmaron los reportes de que el medio RPMI-1640 tiene un efecto positivo en el cultivo debido a su composición rica en nutrientes (Gil-Lamaignere *et al.*, 2005; Meletiadis *et al.*, 2001).

El tiempo de incubación se determina según si el microorganismo es de lento o de rápido crecimiento. El periodo de incubación de *A. chrysanthemi*

es de 96 horas; la lectura se realizó a las 48 horas observando la germinación, y posteriormente a las 96 horas el porcentaje de crecimiento micelial. Otro factor importante de incubación es la oscuridad; ya que en laboratorio se observó que la cepa aislada requiere de oscuridad para germinar y esporular. La temperatura de incubación para cada patógeno es muy importante ya que altera la viabilidad y velocidad de crecimiento (Egervärn *et al.*, 2005); para *A. chrysanthemi* la temperatura óptima de incubación recomendada es de 23 °C.

Estudios precedentes con bacterias y levaduras demuestran claramente que el tamaño del inóculo es también importante para determinar la concentración mínima inhibitoria de un compuesto (Egervärn *et al.*, 2005; Gehrt *et al.*, 1995; Lass-Flörl *et al.*, 2003; Petrikkou *et al.*, 2001). La cantidad de inóculo se contabilizó con un hemacitrometro evaluando diferentes concentraciones ( $1 \times 10^3$ ,  $5 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^4$ ,  $2.5 \times 10^4$ ,  $5 \times 10^4$ , y  $1 \times 10^5$  esporas/mL). El incremento del tamaño del inóculo causa el incremento de la CMI del extracto, por tal razón se estableció con base en las pruebas realizadas ya la literatura, que la concentración de  $2.5 \times 10^4$  esporas/mL es una concentración intermedia y válida para este género (Pujol *et al.*, 2000).

Las concentraciones evaluadas de los extractos (250, 500 y 1000 µg/mL) se determinaron con base en los reportes establecidos en la literatura. En el caso de los extractos orgánicos, la concentración a evaluar es superior al de los metabolitos puros o fraccionados, ya que en este se pueden encontrar una gran variedad de metabolitos y posiblemente el principio activo en cantidades muy bajas (Wenqiang *et al.*, 2006; Muto *et al.*, 2006).

El control positivo en el bioensayo se determinó seleccionando tres fungicidas comerciales: Tecto<sup>MR</sup>, Mirage<sup>MR</sup> y Derosal 500D<sup>MR</sup>, comúnmente usados en campo. El fungicida comercial Tecto<sup>MR</sup> no inhibió el crecimiento de *A. chrysanthemi* a las concentraciones recomendadas, y al incrementar las concentraciones, la solubilidad bajaba con repercusiones en la visibilidad en el pozo. Los fungicidas Mirage<sup>MR</sup> y Derosal 500D<sup>MR</sup> se disolvieron en agua, y mezclas de DMSO-agua y etanol-agua más tween 20. Estas soluciones de fungicidas se aplicaron en las microplacas a las concentraciones de 200, 100, 50, 25, 12.5 y 6.25 µg/ml. Ambos fungicidas mostraron inhibición en algunas concentraciones de esporas, sin embargo, no se observó una inhibición total ya que la formulación de los fungicidas impedía la visibilidad en los pozos por medio del precipitado de los mismos. Por tal razón se decidió utilizar DMSO al 25 % como control positivo, ya que se obtuvieron resultados claros de la inhibición total de la germinación y por lo consiguiente del crecimiento micelial.

En general, el desarrollo y estandarización de los bioensayos en microdilución con hongos filamentosos están centrados en patógenos de humanos tales como, *Alternaria geophila*, *Aspergillus flavus*, *A. fumigatus*,

*A. terreus*, *Candida glabrata*, *C. krusei*, *Chaetomium globosum*, *C. atrobrunneum*, *C. nigricolor*, *Pseudallescheria boydii*, *Rhizopus oryzae*, *Scedosporium prolificans* y *Ulocladium chartarum*, entre otros (Balajee & Marr, 2002; Espinel-Ingroff *et al.*, 2001; Gehrt *et al.*, 1995; Meletiadis, *et al.*, 2003; Pujol *et al.*, 2000; Serena *et al.*, 2003; Quindós *et al.*, 2008).

Los fitopatógenos reportados con esta técnica aún son pocos, entre ellos se encuentran a *A. alternata*, *A. citri*, *A. tenuis*, *Aspergillus niger*, *Botrytis cinérea*, *Cochliobolus lunatus*, *Colletotrichum acutatum*, *C. fragariae*, *C. gloeosporioides*, *Fusarium oxysporum*, *Gibberella fujikuroi*, *pestalotia* spp *Phomopsis viticola*, *P. obscurans*, *P. sojae*, *Penicillium notatum* y *Fusarium mango* (Espinoza *et al.*, 2008; Hadacek & Greger, 2000; Hormazabal & Piontelli, 2009; Ordoñez *et al.*, 2006, Wedge & Smith, 2006). Las metodologías para estandarización del bioensayo en microdilución no solo son prometedoras para la investigación clínica, sino también para la fitopatología y ecotoxicología. Por tal razón, establecer bioensayos con hongos fitopatógenos es de gran importancia, ya que este método proporciona muchas ventajas, entre ellas, la cantidad del compuesto a utilizar es menor en comparación con otros bioensayos, la concentración es conocida en cada pozo, de igual manera se reduce la cantidad de medio al utilizar una microplaca, entre otras (Hadacek & Greger, 2000).

Con este trabajo se contribuye a la estandarización del bioensayo en microdilución para la especie *Alternaria chrysanthemi*, el agente causal del tizón en crisantemo.

## 2.5 CONCLUSIONES

La cepa patógena de *A. chrysanthemi* se aisló y purificó de campo.

El bioensayo antifúngico en microdilución para evaluar extractos orgánicos y acuosos sobre *A. chrysanthemi*, se estableció a nivel *in vitro* de manera rápida, confiable y con bajas cantidades de muestra.

Este trabajo corresponde al primer reporte del bioensayo en microplaca para este patógeno.

## 2.6 BIBLIOGRAFÍA

- Balajee, S. A. and K. A. Marr (2002). *Conidial viability assay for rapid susceptibility testing of Aspergillus species*. Journal of Clinical Microbiology, 40(8), 2741-2745.
- Barnett, H. L., and B. B. Hunter (1999). *Illustrated genera of Imperfect fungi*. Burgess Publishing Company. Minneapolis, Minnesota, USA. 218 p.
- Camargo S., V. García y R. Muciño (2000). *¿Que 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.
- Carvalho, D. D. C., E. Alves, T. R. S. Batista, R. B. Camargos and E. A. G. L. Lopes (2008). *Comparison of methodologies for conidia production by Alternaria alternate from citrus*. Brazilian Journal of Microbiology, 39, 792-798.
- De la Rosa, G. S. (2007). *Evaluación del potencial antimicrobiano de microorganismos aislados de cenotes de la Península de Yucatán*. Tesis de Doctorado en Ciencias y Biotecnología en Plantas. Centro de Investigación Cientifican de Yucatán. 59-144-147 p.
- Egervärn, M., H. Lindmark, S. Roos, G. Huys and S. Lindgren (2005). *Effects of inoculum size and incubation time on broth microdilution susceptibility testing of lactic acid bacteria*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 51(1), 394–396.
- Ellis, M. B. (1993). *Dematiaceous Hyphomycetes*. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England. CAB INTERNATIONAL. 465 p.
- Espinel, I. A., M. Kerkering, P. R. Goldson and S. Shadomy (1997). *Comparison study of broth macrodilution and microdilution antifungal susceptibility tests*. Journal of Clinical Microbiology, 29(6), 1089-1094.
- Espinel-Ingroff, A. (1998). *In vitro activity of the new triazole voriconazole (UK-109,496) against opportunistic filamentous and dimorphic fungi and common and emerging yeast pathogens*. Journal of Clinical Microbiology, 36 (1), 198-202.
- Espinel-Ingroff, A. (2003). *Evaluation of broth microdilution testing parameters and agar diffusion etest procedure for testing susceptibilities of Aspergillus spp. to caspofungin acetate (MK-0991)*. Journal of Clinical Microbiology, 41(1), 403–409.

- Espinel-Ingroff, A., M. Bartlett, V. Chaturvedi, M. Ghannoum, C. K. Hazen, M. A. Pfaller, M. Rinaldi, and T. J. Walsh (2001). *Optimal susceptibility testing conditions for detection of azole resistance in Aspergillus spp.: NCCLS collaborative evaluation*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 45, 1828-1835.
- Espinoza, C., G.G. Viniegra, O. Loera, B. Velásquez and A. Trigos (2008). Antifungal activity of several fungi against plant pathogens. *Micología Aplicada Internacional*, 20 (002), 63-67.
- Gehrt, A., J. Peter, P. A Pizzo and T. Walsh (1995). *Effect of increasing inoculum sizes of pathogenic filamentous fungi on MICs of antifungal agents by broth microdilution method*. Journal of Clinical Microbiology, 33 (5), 1302-1307.
- Gil-Lamaignere, C., R. Hess, S. Salvenmoser, K. Heyn, R. Kappe and F-M C. Müller (2005). *Effect of media composition and in vitro activity of posaconazole, caspofungin and voriconazole against zygomycetes*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 55, 1016–1019.
- Guerrero-Rodríguez, E., S. Solís-Gaona, F. D. Hernández-Castillo, A., Flores-Olivas y V. Sandoval-López (2007). *Biologica in vitro de extractos de Flourensia cernua D.C. en patógenos de postcosecha: Alternaria alternate (Fr.: Fr.) Keissl., Colletotrichum gloeosporioides (Penz.) Penz. y Sacc. y Penicillium digitatum (Pers.: Fr.) Sacc.* Revista Mexicana de Fitopatología, 25(1), 48-53.
- Hadacek, F. and H. Greger (2000). *Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice*. Phytochemical Analysis, 11, 137-147.
- Hormazabal, E. and E. Piontelli (2009) *Endophytic fungi from chilean native gymnosperms: antimicrobial activity against human and phytopathogenic fungi*. World Journal Microbiol Biotechnology, 25, 813–819.
- Lass-Flörl, C., C. Speth, G. Kofler, M. P. Dierch, E. Gunsilius and R. Würzner (2003). *Effect of increasing inoculum sizes of Aspergillus hyphae on MICs and MFCs of antifungal agents by broth microdilution method*. International Journal of Antimicrobial Agents, 21, 229-233.
- Li, R. K., C. M. Elie, G. E. Clayton and M. A. Ciblak (2000). *Comparasion a new colorimetric assay with the NCCLS broth microdilution method (M-27A) for antifungal drug MIC determination*. Journal of Clinical Microbiology, 38(6), 2334-2338.

- Meletiadis, J., J. F. G. M. Meis, J. W. Mouton and P. E. Verweij (2001). *Analysis of growth characteristics of filamentous fungi in different nutrient media*. Journal of Clinical Microbiology, 32(9), 478–484.
- Meletiadis, J., J. W. Mouton, J. F. G. M. Meis, B. A. Bouman, P. E. Verweij, and the EUROFUNG Network (2002). *Comparison of the etest and the sensititre colorimetric methods with the NCCLS proposed standard for antifungal susceptibility testing of Aspergillus species*. Journal of Clinical Microbiology, 40 (8), 2876–2885.
- Muto, M., V. Mulabagal, H.-C. Huang, H. Takahashi, H.-S. Tsay and J.-W. Huang (2006). *Toxicity of black nightshade (Solanum nigrum) extracts on Alternaria brassicicola, causal agent of black leaf spot of Chinese cabbage (Brassica pekinensis)*. Journal Phytopathology, 154, 45–50.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards (1997). *Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard M27-A*. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards (2002). *Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi*. Approved standard M38-A. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA.
- Ordóñez, R. M., A. A. Ordóñez, J. E. Sayago, M. I. Nieva-Moreno, and M. I. Isla (2006). *Antimicrobial activity of glycosidase inhibitory protein isolated from Cyphomandra betacea Sendt. fruit*. Peptides, 27(6), 1187-1191.
- Petrikkou, E., J. L. Rodriguez-Tudela, M. Cuenca-Estrella, A. Gómez, A. Molleja, and E. Mellado (2001). *Inoculum Standardization for Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi Pathogenic for Humans*. Journal of Clinical Microbiology, 39(4), 1345-1347.
- Pujol, I., C. Aguilar, J. Gené and J. Guarro (2000). *In vitro antifungal susceptibility of Alternaria spp. and Ulocladium spp.* Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 46, 323-342.
- Queiroz, F. M., U. G. Batista, y S. H. Bromnschenkel (2004) *Avaliação de meios de cultura no crescimento micelial e esporulação de Alternaria brasiliensis*. Fitopatologia Brasileira, 29, 541-543.
- Quindós, G., L. O. Sánchez-Vargas, M. Villar-Vidal, E. Eraso, M. Alkorta and J. L. Hernández-Almaraz (2008). *Activities of fluconazole and voriconazole against bloodstream isolates of Candida glabrata and Candida krusei: a 14-year study in a Spanish tertiary medical centre*. International Journal of Antimicrobial Agents, 31, 266–271.

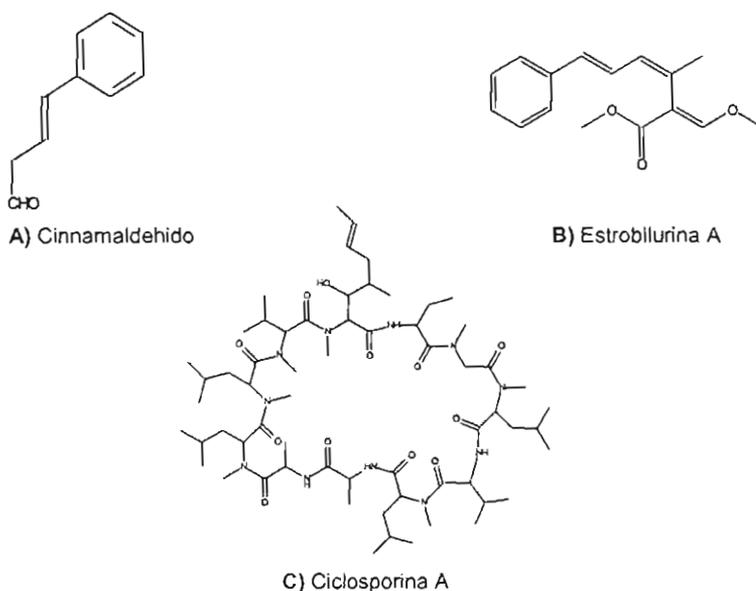
- Scorzoni, L., T. Benaducci, A. M. Fusco, D. H. Siqueira, V. B. Da Silva and M. J. S. Mendes (2007). *The use of standard methodology for determination of antifungal activity of natural products against medical yeasts Candida sp and Cryptococcus sp.* Brazilian Journal of Microbiology, 38, 391-397.
- Santos, D. A. and J. S. Hamdan (2005). Evaluation of broth microdilution antifungal susceptibility testing conditions for *Trichophyton rubrum*. Journal of Clinical Microbiology 43(4), 1917–1920.
- Serena, C., M. Ortoneda, J. Capilla, J. Pastor, D. A. Sutton, M. G. Rinaldi, and J. Guarro (2003). *In vitro activities of new antifungal agents against Chaetomium spp. and inoculum standardization.* Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 47, 3161-3164.
- Shahin E. A. and J. E. Shepard (1979). *An efficient technique for inducing profase sporulation of Alternaria species.* Phytopathology, 69, 618-620.
- Smith, D. and A. H. S. Onions (1994). *The preservation and maintenance of living fungi.* International Mycological Institute and Institute of CAB INTERNATIONAL. 37-38 p.
- Villanueva-Couoh, E., B. M. Sánchez, A. J. Cristóbal y S. J. Tún (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(1), 49-56.
- Vloutoglou, I., B. D. L. Fitt and J. A. Lucas (1999). *Infection of linseed by Alternaria linicola; effects of inoculum density, temperature, leaf wetness and light regime.* European Journal of Plant Pathology, 105, 585–595.
- Wenqiang, G., L. Shufen, Y. Ruixiang and H. Yanfeng (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(11), 992-998.
- Wedge, D. E. and B. J. Smith (2006). "Discovery and evaluation of natural product-based fungicides for disease control of small fruits" in *Allelochemicals: Biological Control of Plant Pathogens and Diseases in Natural product based fungicides.* Inderjit and K.G. Mukerji (Eds). Printed in the Netherlands. 1-14 p.

## Capítulo III

### Evaluación antifúngica de extractos a nivel laboratorio

#### 3.1 INTRODUCCIÓN

El rápido crecimiento de las poblaciones en el mundo demanda mayor producción de alimentos. A su vez, esta actividad agrícola se puede perder hasta en un 20 % debido al ataque de patógenos (Dubey *et al.*, 2009; Hadacek & Greger, 2000). Ante este panorama, es necesario aumentar las técnicas de producción agrícola, así como también las medidas de control de los fitopatógenos. Entre las alternativas de control se encuentra el uso de productos naturales derivados de plantas y hongos (Montes-Belmont *et al.*, 2000; Gunatilaka, 2006). El cinnamaldehído (nombre comerciales: Vertigo o Cinnacura) es uno de los principales ejemplos de productos naturales derivados de plantas con actividad fungicida y con uso en la agricultura actualmente, cuyo nombre químico es el 3-Fenil-2-propenal (Figura 9A). Dicho compuesto se aisló de las semillas frescas de *Cassia tora* L. y es usado para controlar enfermedades causadas por *Verticillium fungicola*, *Rhizoctonia*, especies de *Pythium*, *Sclerotinia homeocarpa* y *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans* (Copping & Duke, 2007). Por otra parte, entre los productos derivados de hongos se encuentra la estrobilurina A (Figura 9B), producido por la especie *Strobilurus tenacellus*. Debido a la su alta volatilidad e inestabilidad fotoquímica, se sintetizaron derivados fotoestables, conocidos a nivel comercial como Azoxistrobina y Kresoxim-metil (Knight *et al.*, 1997). A partir de las estrobulinas, los productos comerciales empleados para la protección de cultivos contra fitopatógenos hasta el momento, solo se han realizado con levaduras, tal es el caso del producto comercial conocido como KeyPlex 350 creado por empresas Morse, a base de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Sin embargo la composición química de este producto no está claramente definida y su inclusión en el mercado no ha sido bien aceptada (Copping & Duke, 2007). Asimismo, se han aislado metabolitos de hongos con actividad fungicida *in vitro*, como la ciclosporina A (Figura 9C), aislado de una cepa no patogénica de *Fusarium oxysporum*, con una buena actividad contra el fitopatógeno *Sclerotinia sclerotiorum* (Rodríguez *et al.*, 2006).



**Figura 9.** A) Estructura del cinnamaldehído aislado de *Cassia tora* L., B) Estructura de La estrobilurina A y C) Estructura de la ciclosporina aislada de *Fusarium oxysporum* (Copping & Duke, 2007; Knight et al., 1997; Rodríguez et al., 2006).

Por otra parte, los productos naturales derivados de hongos son utilizados en la medicina para la producción de antibióticos principalmente, tal es el caso de la penicilina, cefalosporina C, griseofulvina, entre otros (Herrera & Ulloa, 1998; Gutiérrez-Lugo *et al.*, 2002; Misiek & Hoffmeister, 2007). Asimismo son una buena fuente de pigmentos importantes como la astaxantina y el  $\beta$ -caroteno (Sandmann & Misawa, 2002). En la agricultura se están empleando como bioherbicidas, los productos Casst® elaborados con la especie *Alternaria cassiae*, LuBao # 1 con *Colletotrichum gloeosporioides*, DeVine con *Phytophthora palmivora* y MYX-1200 a partir de *Fusarium lateritium* (Tengerdy & Szakács, 1998). De igual forma se utilizan como bioinsecticidas, como son los productos comerciales Engerlingspilz, Betel y Melocont obtenidos a partir de *Beauveria brongniarti* (Anke & Sterner, 2002).

A pesar de los hallazgos mencionados, existen muy pocos reportes del uso de extractos de hongos con actividad fungicida en la agricultura. El contar con moléculas novedosas, cuyas estructuras posean sitios de acción diferentes, es una necesidad urgente en la agricultura para contrarrestar las pérdidas económicas causadas por fitopatógenos (Hadacek & Greger, 2000).

El descubrimiento y desarrollo de un nuevo fungicida puede costar alrededor de 12 millones de euros (Meeting in Biopesticides, 2009). A pesar de esto, existen compañías que financian la búsqueda, principalmente para producir nuevos fungicidas que sean exitosos en la agricultura mundial y que su uso sea seguro, al consumidor y al ambiente (Hadacek & Greger, 2000).

Un monitoreo automatizado, rápido y eficiente es de gran importancia para determinar nuevos fungicidas (Major, 1995). Aunque, generalmente en los lugares con una gran biodiversidad, no se cuenta con infraestructura para un monitoreo automatizado. Tal es el caso de la península de Yucatán, una región tropical sumamente rica en especies vegetales y de microorganismos potenciales para ser explorados (Méendez, 2003; De la Rosa, 2007). De allí la importancia de que en lugares cercanos a la diversidad por estudiar se establezca técnicas que permitan determinar de manera rápida y precisa la capacidad fungicida de un extracto. En el presente capítulo se evaluaron 37 extractos naturales mediante los bioensayos en microdilución y dilución en agar, con el fin de identificar algún extracto para el control de *Alternaria chrysanthemi*, y así contribuir a la búsqueda de productos naturales con capacidad antifúngica.

### **3.2 OBJETIVOS**

1. Evaluar *in vitro* mediante los bioensayos en microdilución y dilución en agar la acción inhibitoria de los extractos fúngicos y vegetales del banco de la Unidad de Biotecnología contra *A. chrysanthemi*.
2. Determinar la concentración inhibitoria 50 y 90 de los extractos con mayor actividad antifúngica contra *A. chrysanthemi*.

### **3.3 MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.3.1 Recolección de las especies vegetales**

Las plantas seleccionadas con antecedentes antifúngicos (Tabla 6) se recolectaron en diferentes localidades de la Península de Yucatán. Las hojas, tallos y raíces de las plantas se secaron por dos días en una estufa de lámparas y se fragmentaron en un molino de cuchillas, marca Brabender (Gamboa-Angulo *et al.*, 2008).

**Tabla 6.** Plantas seleccionadas y evaluadas contra *Alternaria chrysanthemi*. (Cristóbal-Alejo *et al.*, 2006; Gamboa-Angulo *et al.*, 2008).

Especie	Parte vegetal	Clave	mg de extracto etanólico / g de planta seca	Lugar de colecta	Nombre maya
<i>Acalypha gaumeri</i> Pax & K. Hoffm.	Raíz	ACR	27.4 mg/g	Chichén Itzá, Yucatán	Sak ch'ilib tux
<i>Ambrosia hispida</i> Pursh	Hoja	AHH	162 mg/g	Chelem, Yucatán	X-much'kok
<i>Bonellia flammea</i> (Millsp. ex Mez) B.Ståhl & Källersjö	Tallo-raíz	AHTR	40.5 mg/g	Chichén Itza, Yucatán	Sink'in K'aax
	Hoja	BFH	143.3 mg/g		
<i>Calea urticifolia</i> Mill. DC.	Corteza	BFC	62.2 mg/g	Chichén Itzá, Yucatán	Xikin
	Raíz	CUR	87.4 mg/g		
<i>Croton chichenensis</i> Lundell	Tallo	CCT	58.5 mg/g	Dzemul, Yucatán	Ek Balam
<i>Furcraea cahum</i> Trel	Raíz	CCR	46.3 mg/g	Chuburná, Yucatán	Kaajum
<i>Randia obcordata</i> S. Watson	Raíz	FCR	26.41 mg/g	Dzibichaltún, Yucatán	Pay oochil
<i>Trichilia minutiflora</i> Standl.	Tallo	ROT	17.2 mg/g	Felipe Carrillo Puerto, Yucatán	Tsimin ché
<i>Vitex gaumeri</i> Greenm	Tallo	TMT	50.6 mg/g	Dzemul, Yucatán	Ya'axnik
	Hoja	VGH	133.9 mg/g		

A todas las plantas mencionadas en la tabla se les realizó su extracción acuosa

### **3.3.1.1 Extracción etanólica de plantas**

Las hojas, tallos y raíces se secaron por dos días en una estufa de lámparas y se fragmentaron en un molino de cuchillas. Una vez secas y molidas (50 g) se maceraron con etanol destilado (100 ml) a temperatura ambiente, proceso que se repitió tres veces. El disolvente se evaporó a presión reducida en un rotaevaporador (marca Büchi modelo 451) equipado con un baño de agua a 40 °C para obtener el extracto crudo seco de cada especie vegetal (Gamboa-Angulo *et al.*, 2008).

### **3.3.1.2 Extracción acuosa de plantas**

El material vegetal (30 g) se extrajo en agua destilada en ebullición por 20 minutos (500 mL). Ya fría la infusión, se filtró a través de papel filtro Whatman N° 1 y se aforó a 1L con agua destilada, que corresponde al extracto acuoso, a una concentración del 3 % (Herrera, 2007). El extracto obtenido se esterilizó por filtración, con filtros Millipore de 0.45 µm.

### **3.3.2 Cultivos fúngicos en arroz**

Los hongos se cultivaron en agar papa dextrosa (PDA) y se incubaron a 25°C, con un fotoperíodo de 12/12 horas de luz/oscuridad. Una vez que estos cubrieron la superficie de la caja se adicionó 5 mL de solución salina y con ayuda de un portaobjeto estéril se desprendieron las esporas. El líquido sobrenadante correspondió a la suspensión de esporas, las cuales se inocularon (1 mL) en frascos con 20 g de arroz fermentado y se mantuvieron por 40 días a 26 °C con fotoperíodo de 12/12 horas de luz/oscuridad (Höller 2002).

Los extractos orgánicos evaluados, de cepas fúngicas aisladas de cenotes se presentan en la Tabla 4.

#### **3.3.2.1 Extracción con AcOEt de micelio fúngico**

Después del período de crecimiento, la masa micelial se fragmentó con la ayuda de una espátula y se maceró a temperatura ambiente con AcOEt por 24 horas, dos veces y la tercera extracción con el disolvente a aproximadamente 50 °C, por media hora. El disolvente se elimina a presión reducida en un rotaevaporador con baño de agua a 40 °C, obteniendo el extracto crudo seco (Pittayakhajonwut *et al.*, 2008).

### **3.3.3 Bioensayo antifúngico en microdilución**

El bioensayo se realiza como se describe en el capítulo 2.

#### **3.3.3.1 Tratamientos evaluados**

Un total de 35 extractos se evaluaron en el bioensayo antifúngico, 11 extractos fúngicos, 12 extractos vegetales etanólicos y 12 extractos vegetales acuosos. Como control positivo se utilizó el DMSO al 25 % y el

cultivo del patógeno como control negativo. Por cada tratamiento (extracto) se realizaron cuatro repeticiones.

### **3.3.3.2 Análisis estadístico**

Los datos obtenidos se analizaron mediante el paquete computacional SAS para Windows versión 8.11 para lo cual se realizó un análisis de varianza y prueba de comparación de medias (Tukey  $\alpha = 0.05$ ).

Las concentraciones efectivas 50 y 90 ( $CI_{50}$  y  $CI_{90}$ ) de cada tratamiento que causaron la reducción del 50 % y 90 % de inhibición, se calculó con los valores de los porcentajes de inhibición transformados a Probit, mientras las dosis se transformaron a logaritmo base diez (Throne *et al.*, 1995).

### **3.3.4 Determinación de la concentración mínima fungicida (CMF)**

La concentración mínima inhibitoria se determinó realizando lecturas de manera visual, siguiendo la escala propuesta por el NCCLS 2002 (Tabla 5). Primero se verificó que en los controles con medio RMPI 1640 y el fitopatógeno, el crecimiento (germinación) sea exitoso (control negativo, 4); y paralelamente la inhibición del crecimiento micelial (germinación) con el DMSO al 25% (control positivo, 0). La CMI se determinó como la concentración del primer pozo de la microplaca en la cual no se observaba crecimiento después del periodo de incubación.

### **3.3.5 Determinación de la actividad fungicida o fungistática de los extractos**

A partir de la mezcla homogénea de un micropozo en los cuales se observó poco o nulo crecimiento, se transfirieron 20  $\mu$ L en cajas Petri con medio PDA y se incubaron a 23°C por 48 horas. Finalmente se registró el crecimiento (acción fungistática) o inhibición del mismo (acción fungicida).

### **3.3.6 Bioensayo de dilución en agar**

El extracto vegetal etanólico se disolvió en DMSO (< 0.5 %) y se adicionó al medio de cultivo estéril enfriado aproximadamente a 50 °C, con agitación constante para obtener una mezcla homogénea de extracto crudo/DMSO/medio a las concentraciones de 1000 y 500  $\mu$ g/mL. En el caso del extracto vegetal acuoso, este se filtró previamente mediante una membrana estéril (Millipore de 0.45  $\mu$ m) antes de adicionarlo al medio de cultivo y se evaluó a 30 g/L (3%) y 15 g/L (1.5%). Un volumen de aproximadamente 20 mL de la mezcla extracto crudo/DMSO/ medio se depositó en cada caja Petri. Posteriormente, se dejaron en observación por 48 horas para comprobar su esterilidad. Trascurrido este periodo, las cajas se inocularon con un disco invertido de agar (0.6 cm de diámetro) conteniendo el fitopatógeno y permanecieron en incubación a 18 °C aproximadamente en oscuridad, hasta que el control negativo (fitopatógeno en DMSO/medio) cubrió toda la superficie de la caja Petri. Como control

positivo se utilizó Mirage 45 CE a una concentración de 200 µg/mL; se realizaron cuatro repeticiones por tratamiento. El diámetro del crecimiento micelial se midió diariamente en direcciones perpendiculares (Wenqiang *et al.*, 2006).

### 3.3.6.1 Determinación del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial

Para determinar el porcentaje de crecimiento micelial a cada muestra se sustrajo los 0.6 mm de diámetro del disco de inoculación inicial a el diámetro total del crecimiento micelial. Posteriormente el diámetro de crecimiento de la muestra se resta el diámetro del control negativo, considerado como un 100 % del crecimiento micelial y se aplica la formula de Abbott (Abou, 2002).

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

Control negativo = Crecimiento micelial total del patógeno en medio PDA/DMSO (0.5%) menos el diámetro del disco inicial (0.6 mm).

### 3.3.6.2 Determinación de la concentración de esporas de cada tratamiento evaluado por mL

A cada una de las cajas Petri correspondiente a cada uno de los tratamientos se le agregaron 5 mL de agua destilada estéril. Posteriormente, con la ayuda de un portaobjeto estéril se raspó la superficie del medio y con una micropipeta se extrajo la suspensión de esporas. La solución obtenida (solución madre), se depositó en viales, se agitó durante 2 minutos en un vortex y una alícuota de 10 µL (solución de esporas) se transfirieron a la cámara de Neuvauer (hematocitómetro) (Méndez, 2003). Finalmente, se determinó la concentración de esporas de cada extracto evaluado por mL mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Número de esporas / mL} = \frac{\text{Número de esporas contadas}}{4 \times 0.1 \times 1000 \times \text{dilución}}$$

Profundidad de la cámara: 0.1 mm

Área contada: 4 cuadrantes

### 3.3.6.3 Análisis estadístico

Los datos obtenidos se analizaron mediante el paquete computacional SAS para Windows versión 8.11 para lo cual se realizó un análisis de varianza y prueba de comparación de medias (Tukey  $\alpha = 0.05$ ).

### 3.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.4.1 Bioensayo antifúngico en microdilución

La evaluación de la actividad antifúngica de los extractos vegetales contra *A. chrysanthemi* se realizó primero mediante el bioensayo en microdilución. Los resultados permitieron detectar a los extractos vegetales de las especies de *A. gaumeri*, *B. flammea* y los extractos fúngicos de *Fusarium incarnatum* y *Zygosporium minus* con actividad contra *A. chrysanthemi*. Al realizar el análisis de varianza del porcentaje de inhibición de la germinación de las esporas y del crecimiento micelial de los extractos contra este fitopatógeno, se observaron diferencias estadísticas altamente significativas ( $P \leq 0.01$ ) con respecto a los controles (Apéndice 1, Tabla 2A 3A 4A y 5A).

En general, los dos extractos de la raíz de *Acalypha gaumeri* (ACR-A y ACR-E), así como los extractos acuosos de *Bonellia flammea* corteza y hoja (BFC-A y BFH-A, respectivamente) mostraron los mayores porcentajes de inhibición contra *A. chrysanthemi*.

La comparación múltiple de medias Tukey ( $P = 0.05$ ) en el porcentaje de inhibición de la germinación de las esporas a las 48 horas separó al extracto etanólico de la raíz de *A. gaumeri* a una concentración de 1000  $\mu\text{g/mL}$  (ACR-EM) con un porcentaje de inhibición del 81.25 %. Seguido por los extractos acuosos al 3 % (ACR-AM), 1.5 % (ACR-AQ) y etanólico de la misma planta a una concentración de 500  $\mu\text{g/mL}$  (ACR-EQ). Por último el extracto acuoso al 3 % de la corteza de *B. flammea* (BFC-AM) mostró un porcentaje de inhibición del 75 %, al igual que los extractos anteriormente mencionados. Con un menor porcentaje de inhibición de la germinación entre 62-68 % se detectaron a los extractos de *A. gaumeri* raíz, etanólico al 250  $\mu\text{g/mL}$  (ACR-ED) y acuoso al 0.75 % (ACR-AD); los extractos acuosos de *B. flammea* corteza al 3 % (BFH-AM) y al 1.5 % (BFC-AQ). El resto de los extractos presentaron porcentajes de inhibición de la geminación menores a 60 %. Los respectivos controles presentaron los resultados esperados (Tabla 7).

En cuanto a la comparación múltiple de medias Tukey ( $P = 0.05$ ) en el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial a las 96 horas permitió separar nuevamente al extracto ACR-EM, por presentar el mayor porcentaje de inhibición con un 75 %. Seguidamente se encuentran los extractos ACRE-AM y BFC-AM, con un porcentaje de inhibición de 68.75 y 62.50 %, respectivamente. Los extractos ACR-AQ y ACR-EQ mostraron un porcentaje de inhibición de 56.25 y 50.75%, respectivamente. Con menores porcentajes de inhibición se encuentran los extractos BFH-AM, BFC-AQ y los extractos fúngicos de las cepas *Fusarium incarnatum* (SRH47) y *Zygosporium minus* (SRH94), con un 50 % de inhibición de la germinación para todos los extractos (Tabla 7). Se determinaron como activos aquellos extractos que presentaron porcentajes de inhibición  $\geq 50$  %.

Tabla 7. Extractos vegetales y fúngicos contra *Alternaria chrysanthemi* a las 48 y 96 horas de exposición en el bioensayo en microdilución.

Extracto	Tipo de extracto	Concentración	MVS* (mg/mL)	Inhibición (%)	
				Germinación	Crecimiento micelial
<b>Orgánicos</b>		<b>µg/mL</b>			
<i>Fusarium incarnatum</i> (SRH47)	Acetato de etilo	1000	37	53.75 cdef	50.00 def
<i>Zygosporium minus</i> (SRH94)	Acetato de etilo	1000	55.5	53.75 cdef	50.00 def
<i>Acalypha gaumeri</i> (ACR-EM)	Etanólico	1000	36.5	81.25 ab	75.00 b
<i>Acalypha gaumeri</i> (ACR-EQ)	Etanólico	500	18.3	75.00 bc	50.75 def
<i>Acalypha gaumeri</i> (ACR-ED)	Etanólico	250	9.1	68.75 bc	38.75 hi
<b>Acuosos</b>		<b>% (g/L)</b>			
<i>Acalypha gaumeri</i> (ACRE-AM)	Acuoso	3 % (30)	30	75.00 bc	68.75 bc
<i>Acalypha gaumeri</i> (ACR-AQ)	Acuoso	1.5 % (15)	15	75.00 bc	56.25 cdef
<i>Acalypha gaumeri</i> (ACR-AD)	Acuoso	0.75 % (7.5)	7.5	62.50 bcde	37.50 efg
<i>Bonellia flammea</i> (BFH-AM)	Acuoso	3 % (30)	30	62.50 bcde	50.00 def
<i>Bonellia flammea</i> (BFC-AM)	Acuoso	3 % (30)	15	75.00 bc	62.50 bcde
<i>Bonellia flammea</i> (BFC-AQ)	Acuoso	1.5 % (15)	7.5	62.50 bcde	50.00 def
Patógeno + RMPI + DMSO	---	---	---	0.00 i	0.00 k
DMSO	---	25 %	---	100.00 a	100.00 a

Las medias con la misma letra entre columnas son estadísticamente iguales de acuerdo con la prueba de Tukey (P = 0.05). \* MVS: material vegetal seco requerido/mL de extracto ACR: corresponde a la clave de la planta *Acalypha gaumeri* raíz, EM: extracto etanólico (E) y la concentración probada 1000 µg/mL (M). AM: extracto acuoso (A) y la concentración probada 30 g/L (M). Los tratamientos que no presentaron inhibición se omitieron de la tabla (Apéndice 1, Tabla 1A).

### 3.4.2 Determinación de la $CI_{50}$ y $CI_{90}$ en los extractos vegetales y fúngicos

Para determinar la capacidad de los extractos de inhibir el crecimiento de *A. chrysanthemi*, se calculó la  $CI_{50}$  y  $CI_{90}$  de cada uno de los que presentaron alguna actividad fungicida a las 96 horas mediante el análisis Probit (Apéndice II, 2.1 2.2 2.3 y 2.4).

Los resultados de los extractos permitieron detectar a ACR-EM como el mejor extracto, por presentar los menores valores, con una  $CI_{50}$  de 559.05  $\mu\text{g/mL}$  y  $CI_{90}$  1741.00  $\mu\text{g/mL}$  (Tabla 8).

Los extractos fúngicos SRH47 y SRH94 presentaron una  $CI_{50}$  de 934.82 y 886.54  $\mu\text{g/mL}$  y una  $CI_{90}$  de 2,239.00 y 3,180.00  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente (Tabla 8).

Tabla 8.  $CI_{50}$  y  $CI_{90}$  de los extractos orgánicos contra *Alternaria chrysanthemi*

Extracto	$CI_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	$CI_{90}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )
ACR-E	559.05	1,741.00
SRH47	934.82	2,239.00
SRH94	886.54	3,180.00

ACR-A: extracto acuoso raíz de *Acalypha gaumeri*, SRH47: extracto fúngico y SRH94: extracto fúngico

Por otra parte, el mejor extracto acuoso correspondió al extracto ACR-A con una  $CI_{50}$  de 621.06  $\mu\text{g/mL}$  y  $CI_{90}$  de 5,586  $\mu\text{g/mL}$  (Tabla 9).

Tabla 9.  $CI_{50}$  y  $CI_{90}$  de los extractos acuosos contra *Alternaria chrysanthemi*

Extracto	$CI_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	$CI_{90}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )
ACR-A	621.06	5,586
BFC-A	1,540	13,957
BFH-A	6,210	29,710

ACR-A: extracto acuoso de la raíz de *Acalypha gaumeri*, BFC-A: extracto acuoso de la corteza de *Bonellia flammea* y ABH-A: extracto acuoso de la hoja de *Bonellia flammea*.

### 3.4.3 Determinación de la actividad fungicida o fungistática y la concentración mínima fungicida de los mejores extractos

La concentración mínima fungicida (CMF) del mejor extracto ACR-E se determinó aumentando la concentración (4 000, 2 000 y 1000  $\mu\text{g/mL}$ ). Los extractos acuosos se evaluaron nuevamente a la misma concentración (30  $\text{g/L}$  de material vegetal) y solo se determinó la actividad fungicida o fungistática.

El extracto ACR-E a la concentración de 1000  $\mu\text{g/mL}$  presentó actividad fungistática, ya que al transferir 20  $\mu\text{l}$  del pozo a un medio libre de extracto se

observó crecimiento micelial. La CMF de ACR-E fue de 2000 µg/mL o 2 mg/mL, concentración a la cual se observó nulo crecimiento (Figura 10).

Los extractos acuosos ACR-A y BFC-A demostraron actividad fungistática a la concentración de 30 g/L (Figura 10).

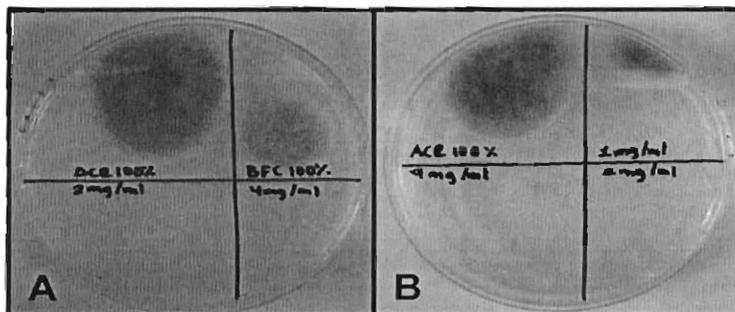


Figura 10. Determinación de la actividad fungicida o fungistática A) Extracto acuoso ACR al 3 % (100 %), extracto acuoso BFC al 3 % (100 %), y extracto etanólico ACR a (2 mg/mL y 4 mg/mL), y B) extracto acuoso ACR al 3 % (100 %) y extracto etanólico ACR (1, 2 y 4 mg/mL).

### 3.4.4 Bioensayo de dilución en agar

Los mejores extractos en el bioensayo en microdilución se evaluaron mediante en el bioensayo de dilución en agar, para obtener otros parámetros indicativos del efecto del extracto contra *A. chrysanthemi*, como son la inhibición de la esporulación y inhibición del crecimiento micelial.

#### 3.4.4.1 Efectividad de los extractos vegetales contra *Alternaria chrysanthemi*

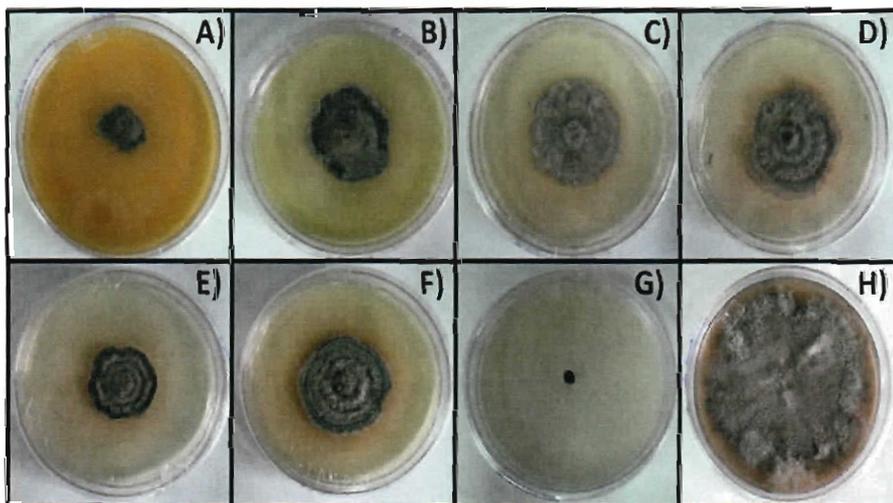
Al realizar los análisis de varianza de la efectividad (E) de los extractos vegetales en *Alternaria chrysanthemi* se observaron diferencias estadísticas altamente significativas ( $p \leq 0.01$ ) entre tratamientos (Apéndice I, Tabla 6A y 7A).

El extracto con mayor efectividad para inhibir el crecimiento micelial de *Alternaria chrysanthemi*, correspondió a ACR-EM con un 78.12 %, según la comparación múltiple de medias Tukey ( $P = 0.05$ ). Asimismo los extractos BFC-AM y ACR-AM presentaron un 56.85 y 50.92 % de efectividad respectivamente. El resto de los extractos evaluados mediante este bioensayo presentaron porcentajes de efectividad menores al 50 % (Tabla 10). El control positivo o fungicida comercial (Mirage 48CE) mostró un 100 % de efectividad (Figura 11).

**Tabla 10.** Efectividad de los extractos incorporados al medio de cultivo (PDA) contra *Alternaria chrysanthemi*

Planta	Concentración (%)	Clave	Efectividad (E%)
<i>Acalypha gaumeri</i>	3 %	ACR-AM	50.92 c
	1.5 %	ACR-AQ	43.3 e
	3.6 %*	ACR-EM	78.12 b
	1.8 %**	ACR-EQ	47.03 de
<i>Bonellia flammea</i>	3 %	BFH-AM	44.98 de
	3 %	BFC-AM	56.85 c
Testigos		CONTPOS	100 a
		CONTNEG	0.00 f

Las medias con la misma letra son estadísticamente iguales de acuerdo con la prueba de Tukey (P = 0.05). \* Equivalente a 1000 µg/mL y \*\* Equivalente a 500 µg/mL. CONTPOS: Mirage 48 CE y CONTNEG: Fitopatígeno + DMSO.



**Figura 11.** Efecto fungicida de los extractos vegetales sobre el crecimiento micelial de *Alternaria chrysanthemi* A) ACR etanólico (1000 µg/mL), B) ACR etanólico (500 µg/mL), C) ACR acuoso (3 %), D) ACR acuoso (1.5 %), E) BFC acuoso (3 %), F) BFH acuoso (3 %), G) Control positivo (Mirage 48CE) y H) Control negativo (Crecimiento).

#### 3.4.4.2 Densidad de esporulación y porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de *Alternaria chrysanthemi*

Con relación a las variables densidad de esporulación y efectividad de la inhibición de los extractos vegetales en *A. chrysanthemi* se encontraron diferencias altamente significativas ( $p \leq 0.01$ ) con respecto a los controles (Apéndice I, Tabla 8A 9A 10A y 11A), pero no hubo diferencia estadística entre los extractos evaluados.

En general, los resultados permitieron detectar tendencias en los extractos BFC-AM y BFH-EM con menores densidades de esporulación de *A. chrysanthemi* con 6666 y 9166 esporas/mL y por lo tanto, los mayores porcentajes de efectividad con 81.95 % y 81.93 %, respectivamente. Con menores porcentajes de efectividad se encontraron los extractos de *A. gaumeri*, entre ellos, ACR-EM y ACR-EQ con una efectividad de 77.80 % y una densidad de 13333 esporas/mL. Los extractos acuosos ACR-AM y ACR-AQ mostraron una densidad de 12550 y 15000 esporas/mL y una efectividad de 76.80 y 75 % respectivamente (Tabla 11).

Tabla 11. Efectividad de los extractos incorporados al medio de cultivo (PDA) sobre la densidad de esporulación *A. chrysanthemi*.

Clave del extracto	MVS (mg/mL)	Concentración	Densidad de esporas (mL)	Inhibición de la esporulación (E %)
ACR-AM	30 mg/mL	3 % (30 g/L)	12500 b	76.80 b
ACR-AQ	15 mg/mL	1.5 % (15 g/L)	15000 b	75.00 b
ACR-EM	36.5 mg/mL	1000 µg/mL	13333 b	77.80 b
ACR-EQ	18.3 mg/mL	500 µg/mL	13333 b	77.80 b
BFH-AM	30 mg/mL	3 % (30 g/L)	9166 b	81.93 b
BFC-AM	15 mg/mL	3 % (30 g/L)	6666 b	81.95 b
CONTPOS			0 c	100 a
CONTNEG			60833 a	0 c

Nota: Las medias con la misma letra entre columnas son estadísticamente iguales de acuerdo con la prueba de Tukey ( $P = 0.05$ ). E: efectividad.

### 3.4.5 Discusión

La inhibición del crecimiento micelial de un hongo fitopatógeno, así como la capacidad de esporular y a su vez la germinación de esporas son parámetros que se miden y se consideran de importancia en la búsqueda de productos naturales efectivos en el control de enfermedades fúngicas.

Con la finalidad de determinar más parámetros indicativos de la actividad de los extractos contra *Alternaria chrysanthemi* en crisantemo, se utilizaron dos bioensayos, el de microdilución y el de dilución en agar. En ambos bioensayos se determinó el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial; en el primer bioensayos, este parámetro se midió por la capacidad del extracto de reducir la germinación de las esporas y a su vez del éxito, al inhibir el crecimiento hifal. Adicionalmente, mediante el bioensayo de dilución en agar se determinó el porcentaje de esporulación o bien el porcentaje de inhibición de la esporulación del hongo.

El análisis integral de los resultados permitió detectar al extracto etanólico de la raíz de *Acalypha gaumeri* (ACR-EM) como el más efectivo, con un porcentaje  $\geq 75$  % en todos los parámetros evaluados. Asimismo, los

extractos vegetales acuosos de BFC-AM y ACR-AM presentaron una actividad  $\geq 50$  % en todos los parámetros evaluados.

El extracto acuoso de la raíz de *Acalypha gaumeri* presentó un mayor efecto inhibitorio en el crecimiento micelial en el bioensayo en microdilución que en dilución en agar. La diferencia en los porcentajes de inhibición, no es grande y se puede deber al inóculo primario, ya que en el bioensayo en microdilución se utilizan esporas y dependiente del efecto del extracto sobre ellas se puede observar o no crecimiento micelial. Por el contrario, en el bioensayo de dilución en agar el inóculo primario es un disco de agar que puede contener micelio y/o esporas (datos observados en la Tabla 6 y 9).

Los extractos acuosos de hoja y corteza de *B. flammea* (BFH-AM y BFC-AM, respectivamente) presentaron una mayor tendencia a inhibir la esporulación, que los extractos de la raíz de *A. gaumeri*. Por otra parte, los dos extractos de raíz de *Acalypha* presentaron mayor tendencia a inhibir la germinación de las esporas.

Los extractos vegetales acuosos de BFC-AM y ACR-AM se evaluaron al 3% (30 g de MVS/L.) demostrando un porcentaje de inhibición del crecimiento micelial mediante el bioensayo de dilución en agar de 56.85 y 50.92 % respectivamente, contra *A. chrysanthemi*. El uso de extractos acuosos ha sido documentado, como es el caso de *Artemisia camphorata* y *Cymbopogon citratus* cuyos extractos acuosos al 20 % y 40 % se evaluaron contra *Alternaria solani*. Los resultados mostraron que no hubo inhibición en el crecimiento micelial, pero se observó la reducción en la esporulación en más del 90% en las concentraciones evaluadas (Itako *et al.*, 2008).

El extracto etanólico de la raíz de *A. gaumeri* a una concentración de 1000  $\mu\text{g/mL}$  presentó una buena inhibición contra *A. chrysanthemi* con un porcentaje mayor del 75 % en ambos bioensayos. Aba (2005) evaluó los extractos etanólicos de *Eugenia caryophyllus* contra *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani* y *Botritis cinérea* a una concentración de 5000  $\mu\text{g/mL}$  logrando una inhibición de 41.10, 51.1 y 0 %, respectivamente.

Al extrapolar las concentraciones utilizadas en los bioensayos a la cantidad de material vegetal seco extraído, se observó que en los extractos acuosos se emplearon 30 mg/mL, una cantidad de materia prima menor a la utilizada en el extracto etanólico ACR-EM con 36.5 mg/mL. Estos datos dieron más bases para hacer de estos extractos acuosos, más viables para evaluarlos en campo, por su fácil extracción y manipulación, además de no existir diferencia estadística significativa con respecto al extracto ACR-EM. Esto permite suponer que en principio, pueden utilizarse cantidades más bajas de materia prima para el control de hongos, que los reportados en la literatura por Itako *et al.* (2008), indicando mayor potencial para ser evaluados en campo.

Al ser *A. gaumeri* una planta endémica de la Península de Yucatán, existen pocos reportes de su actividad antifúngica y aun ninguno en cuanto a su fitoquímica. Méndez (2003) evaluó el extracto etanólico de la raíz de *A. gaumeri* contra *Colletotrichum gloeosporioides*, obteniendo una efectividad del 44.25 %. Los porcentajes de inhibición de ACR-EM (1000 µg/ml) contra *Alternaria chrysanthemi* son más altos en comparación con *C. gloeosporioides*. Gamboa-Angulo (2008), encontró que los extractos etanólicos de dicha planta inhibieron un 94 % a *Alternaria tagetica*, 44 % a *C. gloeosporioides*, 51 % a *Fusarium oxysporum* y un 14 % a *Rhizopus* sp. También el extracto etanólico de hoja y tallo de *A. gaumeri* presentó una actividad nematocida contra *Meloidogyne incognita* con un porcentaje de mortalidad del 95 % a 500 ppm (Cristóbal-Alejo, et al., 2006).

A nivel general se han reportado otras especies pertenecientes al mismo género con propiedades fungicidas como *A. hispida*, *A. indica* y *A. wilkesina*, (Akinde, 1986; Alade & Irobi, 1993; Adesina et al., 2000; Jebakumar et al., 2008; Ogundaini, 2005; Oladunmoye, 2006; Ikewuchi & Anyadiegwu, 2008) (Tabla 11). De igual forma existen especies que no poseen actividad antifúngica, como es el caso de *A. hederacea* (Canales, et al., 2008). Fitoquímicamente se han reportado diferentes metabolitos clasificados en diferentes familias químicas, como terpenos, policétidos y flavonoides principalmente (Tabla 12).

Tabla 12. Metabolitos reportados de *Acalypha* spp.

Planta	Autor	Compuestos aislados	Actividad biológica
<i>Acalypha macrostachya</i>	Siems, <i>et al.</i> , 1996	Friedolabdanos y curcumeno	No evaluado
<i>Acalypha indica</i> (planta completa)	Ma, <i>et al.</i> , 1997	Potassium brevifolincarboxilato, acaindinina, 1-0-galloilbeta-D-glucosa, 1,2,3,6-tetra-0- galloil-beta-D-glocose, corilagina, geraniina, acetonylgeraniina A, euphormisina M-2, ácido repandusínico A, ácido chebulagico, quercetina-3-0-beta-D-glucosido y rutina	No evaluado
<i>Acalypha indica</i> Linn (planta completa)	Hiremath, <i>et al.</i> , 1998	5,7-dihidroxi flavona (crisina) y 3,5,7-trihidroxi flavona (galangina)	No evaluado
<i>Acalypha hispida</i> (hoja)	Amakura, <i>et al.</i> , 1999	Acalyphidins M-1 y M-2, 1-0-galloyl-3,6-(R)-hexahidroxidifenol-4-0- brevifolincarboxil-beta-D glucose y geraniina	No evaluado
<i>Acalypha wilkesiana</i> y <i>Acalypha hispida</i> (hoja)	Adesina, <i>et al.</i> , 2000	Ácido gallico, corilagina y geraniina	No evaluado
<i>Acalypha communis</i>	Gutierrez-Lugo, <i>et al.</i> , 2002	Ácido 16- $\alpha$ -hidroximollico, ácido 15- $\alpha$ -hidroximollico y ácido 7- $\beta$ -6- $\beta$ -dihidroxi-1,23-dideoxijessico .	No evaluado
<i>Acalypha australis</i> (partes aéreas)	Zhongguo-Zhong, 2008	Emodina, beta-sitosterol, loliolide, 2,6-dimethoxi-1,4-benzoquinona, ácido nicotínico, ácido protocatechuico, daucosterol, ácido gálico, rutin, ácido succínico y brevifolina.	No evaluado
<i>Acalypha hispida</i> , <i>Acalypha racemosa</i> y <i>Acalypha marginata</i>	Iniaighe <i>et al.</i> , 2009	Fenoles, glucósidos, flavonoides, esteroides, saponinas y hidroxilantraquinonas	No evaluado
<i>Acalypha fruticosa</i>	Monthana <i>et al.</i> , 2008	Terpenoides, flavonoides y taninos	Bactericida: <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Micrococcus flavus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i>

Por otra parte se ha reportado que las especies de *A. fruticosa*, *A. indica*, *A. winlkesiana*, *A. hispida* y *A. siamensis* poseen propiedades bactericidas (Akinyemi *et al.*, 2005; Akinyemi *et al.*, 2006; Govindarajan *et al.*, 2008; Monthana *et al.*, 2008; Duraipandiyan *et al.*, 2006; Ejechi, 2001; Wiarta *et al.*, 2004). Govindarajan *et al.* (2008) reportó que *A. indica* presenta una remarcable actividad larvicida y ovicida contra *Anopheles stephensi*, vector de la malaria.

En cuanto a *Bonellia flammaea* existen reportes de su actividad fungicida, Rodríguez y Peña (2003) evaluó mediante el bioensayo de disco el extracto metanólico raíz al 1 y 5 % contra *Alternaria tagetica*, *Aspergillus niger*, *Fusarium* sp. y *C. gloeosporioides*, detectando actividad antifúngica contra las cepas de *C. gloeosporioides* y *Fusarium* sp. Sin embargo, no se encontró actividad contra *A. tagetica*. Cabe mencionar que el extracto acuoso de corteza y hoja de *B. flammaea* presentó actividad contra *Alternaria* sp. Vera (2004) reportó que el extracto de la raíz de esta misma planta presentó actividad contra *Candida albicans* y *Saccharomyces cerevisiae* con una zona de inhibición de 5.15 y 7.15 mm respectivamente. Este mismo autor reportó la actividad del extracto contra *Trichophyton mentagrophytes*, hongo patógeno de animales domésticos. Sánchez-Medina, (2007) reportó que la actividad antifúngica se debe al metabolito sakurososaponina (Figura 12), aislado del extracto crudo de la raíz de *B. flammaea*. Las saponinas son una familia diversa de metabolitos secundarios producidos por varias especies de plantas (Muto *et al.*, 2006). Pueden ser utilizadas como insecticidas, antibióticos, fungicidas y fármacos. Se sugiere que estos compuestos en la planta proveen protección contra el ataque de fitopatógenos (Sparg *et al.*, 2004). El preciso mecanismo de acción de las saponinas no es bien entendido, se deduce que la actividad fungicida se debe a la habilidad de las saponinas de formar complejos con los esteroides de la membrana celular de los hongos, causando una pérdida en la integridad de la misma, mediante la formación de poros (Morrissey & Osbourn, 1999).

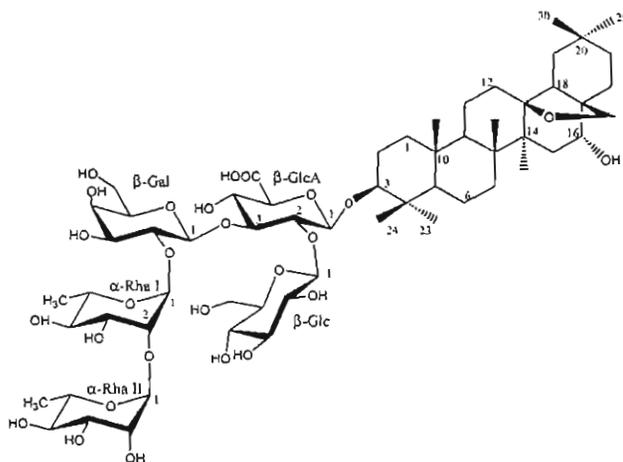


Figura 12. Estructura química de la sakurososaponina (Sánchez-Medina, 2007)

En cuanto a otras especies de *Bonellia*, Rodríguez *et al.* (1965) aisló de los frutos de *Bonellia pungens* (antes *Jacquinia pungens*) el ácido jacquinico. Bhattacharyya *et al.* (1999) aisló de *B. ruscifolia* a el triterpeno Dimetil oleana-13(18),15(16)-dieno-3 $\beta$ ,28-diacetato. El mismo autor aisló a el triterpeno Oleana-12(13),15(16)-dieno-3 $\alpha$ ,28-diil diacetato de la misma planta (Bhattacharyya *et al.*, 2000).

Al no existir muchos reportes de la actividad antifúngica de *Acalypha gaumeri* y *Bonellia flammea* es de gran importancia realizar evaluaciones e identificar el o los principios activos responsables de la actividad fungicida, y aún más determinar su potencial en campo.

### 3.5 CONCLUSIONES

El mayor efecto inhibitorio en *A. chrysanthemii* se observó con el extracto etanólico de la raíz de *A. gaumeri* a una concentración de 1000  $\mu\text{g/mL}$ , en las dos pruebas de susceptibilidad evaluadas.

Los extractos acuosos al 100 % de la raíz de *A. gaumeri* y corteza de *B. flammea* demostraron inhibición a una concentración probada (3%) menor en comparación con otros reportes.

*A. gaumeri* es una planta que en sus dos extractos, tanto acuoso como etanólico, presento propiedades fungicidas contra *A. chrysanthemii*, siendo un candidato potencial para continuar siendo estudiado en campo.

De las 11 cepas fúngicas evaluadas solo dos presentaron una moderada actividad contra *A. chrysanthemii*, las cuales corresponden a *Fusarium incarnatum* (SRH47) y *Zygosporium minus* (SRH94).

### 3.6 BIBLIOGRAFÍA

- Aba, A. A. A. (2005). *Antifungal activity of some extracts against some plant pathogenic fungi*. Pakistan Journal of Biological Sciences, 8(3), 413-417.
- Abou, J. Y., H. Sobh and A Salemh (2002). *Antimycotic activities of selected plant flora, A wild in lebanon, agains phytopathogenic fungi*. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 50(11), 3208-3213.
- Adesina, S. K., O. Idowu, A. O. Ogundaini, H. Oladimeji, T. A. Olugbade, G. O. Onawunmi and M. Pais (2000). *Antimicrobial constituents of the leaves of Acalypha wilkesiana and Acalypha hispida*. Phytotherapy research, 14(5), 371-374.
- Adesina, S. K., O. Idowu, A. O. Ogundaini, H. Oladimeji, T. A. Olugbade, G. O. Onawunmi and M. Pais, (2000). *Antimicrobial constituents of the leaves of Acalypha wilkesiana and Acalypha hispida*. Phytotherapy Research, 14(8), 371-374.
- 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. 362-363 pp.
- Akinyemi, K. O., O. K. Oluwa and 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*. Afr. Journal Traditional, Complementary and Alternative Medicine, 3 (4), 13–22.
- Akinyemi, K., O. Oladapo, C. Okwara, C. Ibe and K. Fasure (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
- Alade, P. I. and O. N. Irobi (1993). *Antimicrobial activities of crude leaf extracts of Acalypha wilkesiana*. Journal of Ethnopharmacology, 39(3), 171-174.
- Amakura, Y., M. Miyake, H. Itoh, A. Murakaku, Y. Itoh, C. F. Lu, L. L. Yang, K. Y. Yen, T. Okuda, and T. Yoshida (1999). *Tannins and related polyphenols of euphorbiaceous plants- Part 16-Acalyphidins M-1, M-2 and D-1, ellagitannins from Acalypha hispida*. Phytochemistry, 50 (4), 667-675.
- Anke, S. and O. Sterner (2002). "Insecticidal and nematicidal metabolites from fungi", in the Mycota. A comprehensive treatise on fungi

- experimental systems for basic and applied research. X Industrial Applications, Esser, K. and J.W. Bennett (eds). Springer-Verlag, New York. pp. 109-127.
- Bhattacharyya, K., T. Kar, P. K. Dutta, G. Bocelli and L. Righi (1999) *Acta Crystallographica Section C. Crystal Structure Communications*, 55(6), 992-994.
- Bhattacharyya, K., T. Kar, P. K. Dutta, B. Achari, G. Bocelli and L. Righi (2000). *Acta Crystallographica Section C. Crystal Structure Communications*, 56(2), e60-e61.
- 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 hederácea*. Revista Latinoamericana de Química. Suplemento especial. Quinta Reunión Nacional de Investigación en productos Naturales, Guadalajara, Jalisco. 90 p.
- Copping, L. G. and 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 and M. M. Angulo-Gamboa (2006). *In vitro sensitivity of Meloidogyne incognita to extracts from natives yucatecan plants*. *Nematopica*, 36(1), 89-97.
- Dubey, N. K. A. Kumar, P. Singh and R. Shukla (2009). *Exploitation of natural compounds in eco-friendly management of plant pests in Recent developments in management of plant disease*. Gisi, U., I. Chet and M. L. Gullino. Editor Springer Netherlands. 181-198 p.
- De la Rosa, G. S. (2007). *Evaluación del potencial antimicrobiano de microorganismos aislados de cenotes de la Península de Yucatán*. Tesis de Doctorado en Ciencias y Biotecnología en Plantas. Centro de Investigación Científica de Yucatán. 144-147 p.
- Duraipandiyan, V., M. Ayyanar and S. Ignacimuthu (2006). *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 6, 35.
- Ejечи, B. O. (2001). *Wood biodeterioration control potential of Acalypha hipida leaf phenolic extract in combination with Trichoderma viride culture filtrate*. *Word Journal of Microbiology & biotechnology*, 17, 561-565.
- Gamboa-Angulo, M., A. J. Cristóbal, B. L. Medin, R. F. Chi, G. R. Mendéz, P. P. Sima and P. May (2008). *Antigungal properties of selected*

- plants from the Yucatán peninsula, Mexico. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 24, 1955-1959.
- Govindarajan M, A. Jebanesan, D. Reetha, R. Amsath, T. Pushpanathan and 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 and 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.
- Gunatilaka, A. A. L. (2006). *Natural products from plant-associated microorganisms: distribution, structural diversity, bioactivity, and implications of their occurrence.* *Journal of Natural Products*, 69(3), 509-526.
- Gutierrez-Lugo, M. T., M. P. Sigh, W. M. Maiese and B. N. Timmermann (2002). *New antimicrobial cycloartane triterpenes from Acalypha communis.* *Journal of Natural Products*. 65(6): 872-875.
- Hadacek, F. and H. Greger (2000). *Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice.* *Phytochemical Analysis*, 11, 137-147.
- Herrera, P. E. (2007). *Actividad nematostática de extractos fúngicos y vegetales contra Meloidogine incognita (Kofoid &White.) Chitwood.* Instituto Tecnológico de Conkal. Tesis para obtener el grado de Maestra en Ciencias en Horticultura Tropical. Conkal, Yuc. 24 p.
- Herrera, T. y M. Ulloa (1998). *El reino de los hongos. Micología básica aplicada.* Ed. UNAM-Fondo de Cultura Económica. México. D.F. 19-50, 375-385, 398-421, 461-481.
- Hiremath, S. P., K. Rudresh and S. Badami (1998). *Flavonoids of Acalypha indica Linn.* *Indian journal of heterocyclic chemistry*, 8(2), 163-164.
- Höller, U., J.B. Gloer and D.T. Wicklow (2002). *Biologically active poliketides metabolite from an undetermined fungicolous hyphomycetes resembling Cladosporium.* *Journal of Natural Products*, 65, 876-882.  
<http://www.biomedcentral.com/1472-6882/6/35>.
- Ikewuchi, J. C. and A. Anyadiiegwu (2008). *Effect of Acalypha wilkesiana Muell Arg on plasma sodium and potassium concentration of normal rabbits.* *Pakistan Journal of Nutrition*, 7(1), 130-132.

- Iniaghe, O. M., S. O. Malomo and J. O. Adebayo (2009). *Proximate composition and phytochemical constituents of leaves of some Acalypha Species*. Pakistan Journal of Nutrition, 8 (3), 256-258.
- Itako, A., K. Schwan-Estrada, J. Tolentino, J. Stangarin y M. Silva (2008). *Atividade antifúngica e proteção do tomateiro por extratos de plantas medicinais*. Tropical Plant Pathology, 33(3), 241-244.
- Jebakumar, R. D. S., S. Kallidass and J. Vimalan (2008). *Isolation, identification and study of antimicrobial property of a bioactive compound in an Indian medicinal plant Acalypha indica (Indian-nettle)*. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 21, 1231-1236.
- Knight, S. C., V. M. Anthony, A. M. Brady, A. J. Greenland, S. P. Heaney, D. C. Murray, K. A. Powell, M. A. Schulz, C. A. Spinks, P. A. Worthington, and D. Youle (1997). Rationale and perspectives on the development of fungicides. Annual Reviews Phytopathology, 35, 349-72
- Ma, Y. T., J. I. Chiang, J. H. Lin and F. L. Hsu (1997). *Phenolics from Acalypha indica*. Journal of the Chinese Chemical Society, 44 (5), 449-502.
- Major, J. S. (1995). *Current screening practices in the pharmaceutical industry*. Proceedings of Brighton Crop Protection Conference on Weeds, 1, 89-96.
- Méndez, G. R. (2003). *Sensibilidad a bencimidazoles y propiedades fungicidas de plantas nativas de la península de Yucatán en Colletotrichum gloeosporioides penz*. Tesis para obtener el grado de Maestría en Horticultura Tropical. Instituto Tecnológico de Conkal. 88-93-61 p.
- Misiek, M. and D. Hoffmeister (2007). *Fungal genetics, genomics, and secondary metabolites in pharmaceutical sciences*. Planta Med. 73: 103-115.
- Montes-Belmont, R., V. Cruz-Cruz, G. Martínez-Martínez, G. Sandaval-García, R. García-Licona, S. Zilch-Domínguez, L. Bravo-Luna, K. Bermúdez-Torres y H. E. Flores-Moctezuma (2000). *Propiedades antifúngicas en plantas superiores. Análisis retrospectivo de investigaciones*. Revista Mexicana de Fitopatología, 18(2), 125-131.
- Morrissey J. P. and A. E. Osbourn (1999). *Fungal resistance to plant antibiotics as a mechanism of pathogenesis*. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 63 (3), 708-724.

- Mothana, R. A. A., S. A. A. Abdo, S. Hasson and F. M. N. Althawab (2008). *Antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activities and phytochemical screening of some Yemeni medicinal plants*. eCAM Advance Access published January, 28, 1-8.
- Muto, M., V. Mulabagal, H.-C. Huang, H. Takahashi, H.-S. Tsay and J.-W. Huang (2006). *Toxicity of black nightshade (Solanum nigrum) extracts on Alternaria brassicicola, causal agent of black leaf spot of Chinese cabbage (Brassica pekinensis)*. Journal Phytopathology, 154, 45–50.
- 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.
- 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.
- 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.
- Pittayakhajonwut, P., P. Sohsomboon, A. Dramaee, R. Suvannakad, S. Lapanum and M. Tantichareon (2008). *Antimycobacterial substances from Phaeosphaeria sp. BCC8292*. Planta Medica, 74, 281-286.
- Rodríguez, F. A. y L. M. Peña (2003). *Detección y purificación de metabolitos bioactivos de la especie Jacquinia flammea del Estado de Yucatán*. En: Memoria del II Congreso de Estudiantes del Verano. 3 de octubre de 2003. Universidad Autónoma de Yucatán. Programa de Impulso y orientación a la investigación priori. p. 231-232.
- Rodríguez, M. A., G. Cabrera and A. Godeas (2006). *Cyclosporine A from a nonpathogenic Fusarium oxysporum and Sclerotinia sclerotiorum*. Journal of Applied Microbiology, 100, 575–586.
- Rodríguez-Hahn, L., C. Sánchez and J. Romo (1965). *Isolation and structures of jacquinic acid*. Tetrahedron, 21, 1735-1740.
- Sánchez-Medina, A. (2007). *Phytochemical and pharmacological studies of some endemic Yucatecan medicinal plants*. Ph.D. Thesis. University of Greenwich.

- Sandmann, G. and N. Misawa (2002). *Fungal carotenoids*. In: *The Mycota X: Industrial applications*. Osiewacz, H.D. (Volume editor). Springer. Germany. 247-262.
- Siems, K., J. Jakupovic, V. Castro and L. Poveda (1996). *Constituents of two Acalypha species*. *Phytochemistry*, 41(3):851-853.
- Sparg, S. G., M. E. Light and S. J. Van (2004). *Biological activities and distribution of plant saponins*. *Journal Ethnopharmacol*, 94, 219-243.
- Tengendy, R. P. and G. Szakács (1998). *Review. perspectives in agrobiotechnology*. *Journal of Biotechnology*, 66, 91-99.
- Throne, J., D. Weaver and J. Baker (1995). *Probit analysis: assessing goodness-of-fit based on backtransformation and residuals*. *Journal of Economic Entomology*, 88(5), 1513-1516.
- Vera, K. B. (2004). *Evaluación de la actividad biológica en plantas medicinales nativas de la Península de Yucatán*. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias y Biotecnología de Plantas. Centro de Investigación Científica de Yucatán. 64-109 p.
- Wenqiang, G., L. Shufen, Y. Ruixiang and 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.
- Wiarta, C., A. Hannah, M. Yassim, H. Hamimah and M. Sulaiman. (2004). *Antimicrobial activity of Acalypha siamensis Oliv. ex Gage*. *Journal of Ethnopharmacology*, 95, 285-286.
- Zhongguo-Zhong, Y. Z. (2008). *Chemical constituents of aerial part of Acalypha australis*. *Journal of Stored Products Research*, 33(12), 1415-1417.

## Capítulo IV

### Evaluación a nivel de campo

#### 4.1 INTRODUCCIÓN

En el cultivo de crisantemo es importante cuidar la calidad fitosanitaria y eliminar deficiencias para incrementar la productividad (Bauer, 1992). El daño estético es de vital importancia al momento de la comercialización del producto, ya que cualquier síntoma de ataque de plagas o enfermedades en las flores y follaje reduce la calidad, lo cual disminuye el precio, sin importar si hay o no reducción en el volumen de producción (Canul, 2005). Los principales fitopatógenos del crisantemo son *Puccinia horiana*, *Alternaria chrysanthemi* y *A. alternata*, *Ascochyta* sp., *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani* y *Septoria chrysanthemi*. Entre ellos, *A. chrysanthemi* es reconocido como el principal fitopatógeno del crisantemo, aparece desde el inicio del cultivo en el follaje, afectando la calidad de la flor y reduciendo la vida de anaquel a través de la reducción del proceso fotosintético de la planta. Actualmente, el control de hongos fitopatógenos requiere de técnicas alternativas, el uso de extractos vegetales con propiedades fungicidas y antimicrobianas tiene un papel importante en un sistema ecológico integrado de producción agrícola para el control de enfermedades (Guerrero-Rodríguez *et al.*, 2007). Con el fin de contribuir a la búsqueda de productos naturales para controlar *A. chrysanthemi* y que además sean amigables con el ambiente, en el presente trabajo se evaluaron en campo dos extractos naturales acuosos: raíz de *Acalypha gaumeri* y corteza de *Bonellia flammea*, estas plantas se seleccionaron con base en los resultados obtenidos en las dos pruebas *in vitro* realizadas con el mismo patógeno en laboratorio. Ambos extractos demostraron inhibir al patógeno *A. chrysanthemi* en un porcentaje  $\geq 50$  %, en todos los parámetros evaluados. Asimismo, ambos extractos no demostraron diferencia estadística con respecto al extracto etanólico de *A. gaumeri* (ACR-EM). Este último extracto no se evaluó en campo por falta de disponibilidad de material vegetal. Otro factor importante por el que se decidió evaluar los extractos acuosos es por su fácil extracción y manipulación en campo.

#### 4.2 OBJETIVO

Evaluar en campo en cultivos de crisantemo (*Dendranthema grandiflorum*) los extractos con mayor actividad antifúngica contra *Alternaria chrysanthemi*.

## **4.3 MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.3.1 Ubicación del área experimental**

El trabajo se llevó a cabo en la Unidad Limones Cheé en el área Florícola Ulu'umil lool, en el municipio de Maní, Yucatán. Se utilizaron esquejes de *Dendranthema grandiflorum* Ramat (Cv. Polaris Yellow) de 20 días de edad provenientes de la Unidad Florícola "Nicté-Ha" pertenecientes al municipio de Chocholá, Yucatán.

### **4.3.2 Establecimiento del experimento en campo**

El trasplante se realizó a los 20 días después de la siembra, cuando las plantas alcanzaron entre 8-10 cm. de altura. Estas se trasplantaron en camas de 1 m de ancho x 12 m de largo, utilizando un sustrato de tierra roja, abono orgánico de bovinaza y grava, con una proporción de 2:2:1, respectivamente.

### **4.3.3 Tratamientos**

El número de tratamientos se obtuvieron con base en los resultados obtenidos en las pruebas *in vitro*; se evaluaron dos extractos acuosos: raíz de *Acalypha gaumeri* y Corteza de *Bonellia flammea* (30 g/L). Paralelamente se evaluaron con dos testigos, agua y el fungicida comercial (Captan 2 g/L).

### **4.3.4 Diseño experimental**

Para la evaluación de los extractos se utilizaron dos camas (correspondientes a dos bloques por cama) obteniendo un total de cuatro bloques con cuatro repeticiones por tratamiento. Parcelas de 1 m de ancho y 1.5 m de largo se emplearon para cada repetición (Figura 13).

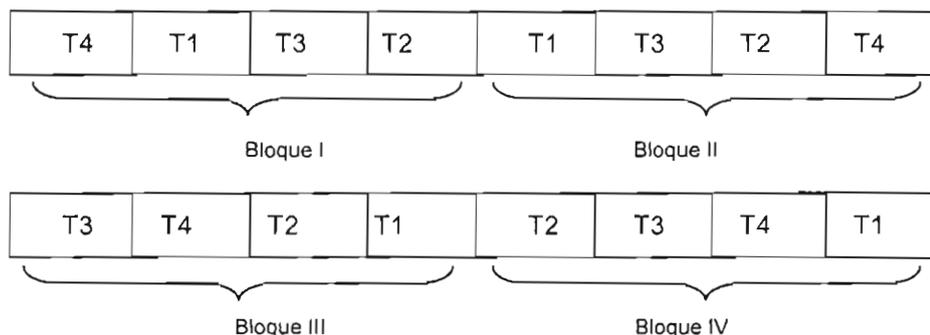


Figura 13. Distribución de los tratamientos en bloques al azar .  $T_1$ = *Bonellia flammea*,  $T_2$ = *Acalypha gaumeri*,  $T_3$ = *Testigo (agua)*,  $T_4$ = *Captan*.

#### 4.3.5 Aplicaciones de los extractos

Las aspersiones del extracto se realizaron semanalmente, cuando se detectaron los primeros síntomas (después de la inoculación con el fitopatógeno aislado) y cuando las condiciones fueron propicias para el progreso de la enfermedad, por un período de siete semanas. Se realizaron siete aplicaciones con la ayuda de una bomba de mochila de 5 L.

#### 4.3.6 Intensidad de la enfermedad

##### 4.3.6.1 Parámetros epidemiológicos a medir

La evaluación de la severidad del tizón foliar se inició cuando se detectaron los primeros síntomas de la enfermedad en el cultivo. A partir de esa fecha y después de la primera aplicación, las evaluaciones se realizaron semanalmente. El porcentaje de área foliar afectado por la enfermedad se registró con una escala logarítmica diagramática para tizón foliar (Villanueva-Couoh *et al.*, 2004) (Figura 14), tomando un total de 20 hojas por repetición y un total de siete evaluaciones. Con los porcentajes de severidad se construyeron curvas del progreso de la enfermedad (Campbell & Madden, 1990) y se estimaron los siguiente parámetros epidemiológicos:

$Y_{final}$ . Estimación del porcentaje la severidad de la enfermedad al final del cultivo.

**Área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE)**. Parámetro estimado mediante el método de integración trapezoidal (Campbell & Mandden, 1990).

**Efectividad del extracto**. Medias obtenidas mediante la prueba Abbot, para determinar la eficacia del extracto en campo.

**Número de botones.** Promedio del total de botones contados en las cinco plantas centrales seleccionadas por tratamiento, de las cuatro repeticiones al final del cultivo.

**Diámetro del racimo.** Promedio total del diámetro del racimo de los botones, en las cinco plantas centrales seleccionadas por tratamiento.

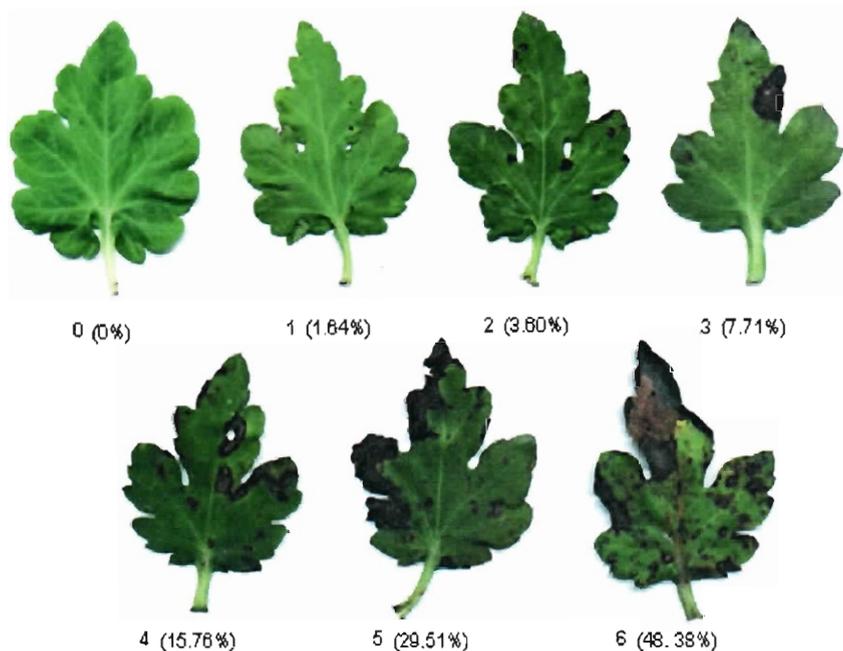


Figura 14. Escala logarítmica diagramática de severidad en el patosistema *Chrysanthemum morifolium*-*Alternaria chrysanthemi* (Villanueva-Couoh, 2005).

#### 4.3.7 Análisis de datos

Los datos obtenidos de los parámetros epidemiológicos, así como las variables agronómicas, se sometieron a el paquete computacional SAS para Windows versión 8.11 mediante un análisis de varianza y prueba de comparación de medias (Tukey  $p = 0.05$ ) (Steel & Torrie, 1986).

## 4.4 RESULTADOS

### 4.4.1 Intensidad de la enfermedad causada por el agente *Alternaria chrysanthemi* y el efecto del extracto acuoso en campo

Con los registros de la severidad de la enfermedad se construyeron curvas del progreso de la enfermedad durante el desarrollo del cultivo (Figura 15), para poder ajustarlos a modelos epidemiológicos. El Área Bajo la Curva del Progreso de la enfermedad (ABCPE) se estimó mediante el método de integración trapezoidal. Asimismo se estimó la severidad de la enfermedad en porcentaje al final del cultivo ( $Y_{final}$ ).

Las curvas ABCPE mostraron que la enfermedad se presenta en el cultivo a los 37 días después del trasplante (ddt) (Figura 15).

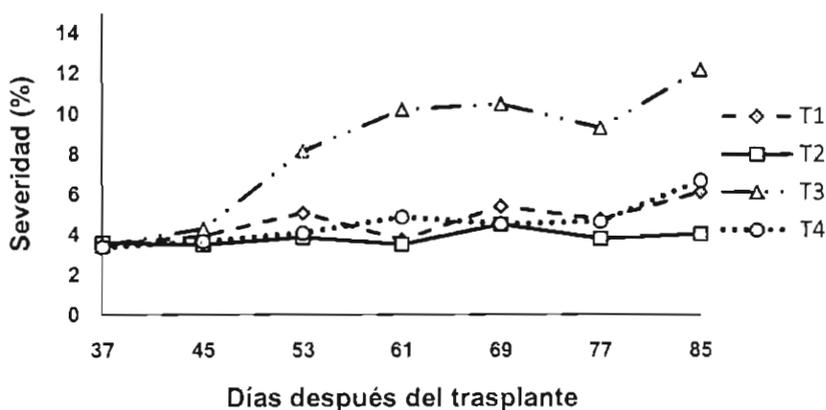


Figura 15. Curvas del Progreso de la enfermedad en el cultivo de crisantemo con tizón foliar causado por el agente *A. chrysanthemi*,  $T_1$ = *Bonellia flammea*,  $T_2$ = *Acalypha gaumeri*,  $T_3$ = Testigo (agua),  $T_4$ = Captan.

La severidad inicial según el análisis de varianza no demostró diferencia estadística significativa entre los tratamientos, lo que indicó que la presencia y el nivel del inóculo en el experimento es uniforme (Apéndice V, Tabla 12A). La severidad de la enfermedad a los ocho días después de la primera aplicación (dda) al detectar la presencia de la enfermedad nuevamente no demostró diferencia estadística significativa entre tratamientos (Apéndice V, Tabla 13A). Sin embargo, el tratamiento  $T_2$  correspondiente al extracto acuoso de la raíz de *A. gaumeri* presentó el menor porcentaje de severidad, con 7.48 %\*(severidad real) y un 3.62 % (escala). La severidad a los 32 días después de la primera aplicación separó nuevamente al tratamiento  $T_2$  por presentar el menor porcentaje de severidad con un 9.28 %\* y un 4.49 %. Estadísticamente no existió diferencia entre los extractos ( $T_1$  y  $T_2$ ) y el fungicida comercial Captan ( $T_4$ ), por el contrario se detectó diferencia

estadística significativa con respecto al tratamiento T<sub>3</sub> correspondiente al testigo (Agua) por presentar un porcentaje de severidad de 21.66 %\* y un 10.48 % (Apéndice V, Tabla 14A) (Tabla 13).

Tabla 13. Severidad de la enfermedad evaluada en el patosistema *Alternaria chrysanthemi-Chrysanthemum morifolium*.

Trat.	Severidad (%) inicial 37 ddt	Severidad (%) 8 dda	Severidad (%) 32 dda	Severidad (%) final 48 dda
T <sub>1</sub>	3.46 a	3.93 a	5.40 b	6.10 b
T <sub>2</sub>	3.56 a	3.62 a	4.49 b	4.00 b
T <sub>3</sub>	3.44 a	4.27 a	10.48 a	12.17 a
T <sub>4</sub>	3.35 a	3.65 a	4.51 b	6.67 b
DMS	0.463	0.031	0.610	0.072

Las medias con la misma letra entre columnas son estadísticamente iguales de acuerdo con la prueba de Tukey (P = 0.05) DMS= Diferencia mínima significativa). T<sub>1</sub>= *Bonellia flammea*, T<sub>2</sub>= *Acalypha gaumeri*, T<sub>3</sub>= Testigo (agua), T<sub>4</sub>= Captan. dda= días después de la primera aplicación. ddt= días después del trasplante. \*Nota: Los resultados de la severidad expresados en la tabla son en base a la escala establecida por Villanueva-Couoh, *et al.*, 2005. Los porcentajes de severidad mencionados en el texto son transformados considerando el 48.38 % (clase 6) de la escala como un 100 % de severidad.

El análisis de varianza para la estimación de la Y<sub>final</sub> a los 85 ddt y a los 48 dda indicó diferencia estadística significativa (Apéndice IV y V, Tabla 15A) separando al tratamiento T<sub>3</sub> como el tratamiento con mayor severidad con un 25.15 %\* y un 12.17 %. El menor porcentaje de severidad se encuentra en el tratamiento T<sub>2</sub> con un 8.27 %\* y 4.00 %, seguido por el tratamiento T<sub>1</sub> correspondiente al extracto de la corteza de *Bonellia flammea* con un 12.61 %\* y 6.10 % y por último al tratamiento T<sub>4</sub> correspondiente al fungicida captan, con un 13.79\* % y 6.67 % de severidad (Tabla 12).

Los resultados del ABCPE permitieron detectar al tratamiento T<sub>2</sub> con el menor promedio de infección con 165.28 %/día. Asimismo, correspondió al tratamiento con menor severidad y por lo tanto, el más efectivo para controlar la enfermedad. Los tratamientos T<sub>4</sub> y T<sub>1</sub> presentaron un ABCPE de 179 y 185.84 %/día, respectivamente. El tratamiento T<sub>3</sub> demostró el mayor ABCPE con un 398.94 %/día (Figura 16) (Apéndice III).

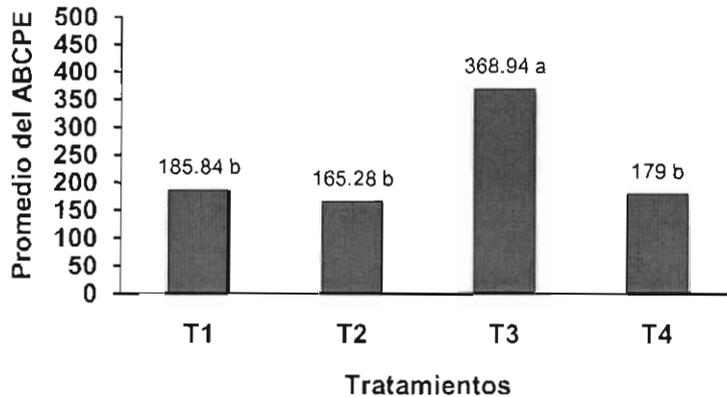


Figura 16. Promedio del Área Bajo la Curva del Progreso de la Enfermedad (ABCPE), T<sub>1</sub>= Bonellia flammea, T<sub>2</sub>= Acalypha gaumeri, T<sub>3</sub>= Testigo (agua), T<sub>4</sub>= Captan.

#### 4.4.2 Efectividad del extracto al reducir la severidad en campo

Según el análisis de varianza, el tratamiento con mayor efectividad a los ocho días después de la primera aplicación con un 15.13 %, pertenece al T<sub>2</sub>, seguido por los tratamientos T<sub>4</sub> y T<sub>1</sub> con 14.54 y 7.98 %, respectivamente (Figura 17). Asimismo a los 32 dda el tratamiento T<sub>2</sub> mostró mayor efectividad para controlar la enfermedad con un 57.10 %. En la última evaluación a los 48 dda el tratamiento T<sub>2</sub> fue nuevamente el más efectivo para controlar la enfermedad con un 67.11%, seguido por los tratamientos T<sub>1</sub> y T<sub>4</sub> con un 49.88 y 45.22 de efectividad. En todas la evaluaciones no se observó diferencia estadística entre los extractos y el fungicida comercial, pero si se observó con respecto al testigo agua (Apéndice V, Tabla 16A 17A y 18A).

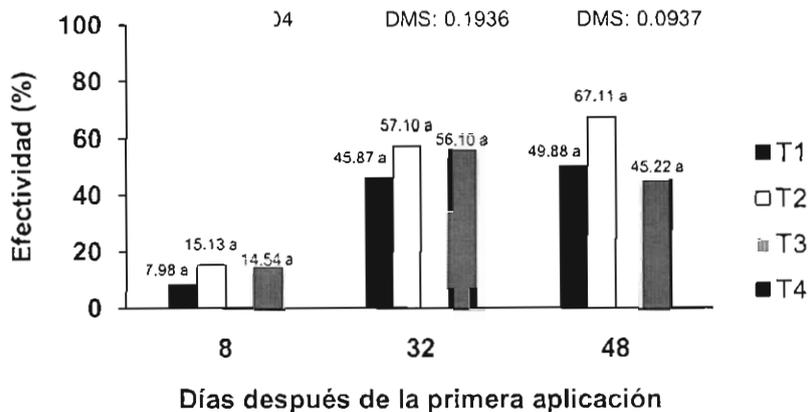


Figura 17. Efectividad de los tratamientos en la severidad de la enfermedad, DMS: diferencia estadística significativa, T<sub>1</sub>= *Bonellia flammea*, T<sub>2</sub>= *Acalypha gaumeri*, T<sub>3</sub>= Testigo (agua), T<sub>4</sub>= *Captan*

#### 4.4.3 Variables agronómicas

El análisis de varianza para el número de botones no reportó diferencia estadística significativa entre los tratamientos, de acuerdo a la comparación múltiples de medias (Tukey=0.05) (Apéndice V, Tabla 19A) (Figura 18). Sin embargo, el *Captan* (T<sub>4</sub>) presentó el mayor número de botones florales con 19.35 botones/planta, seguido por *A. gaumeri* con 16.3 botones/planta.

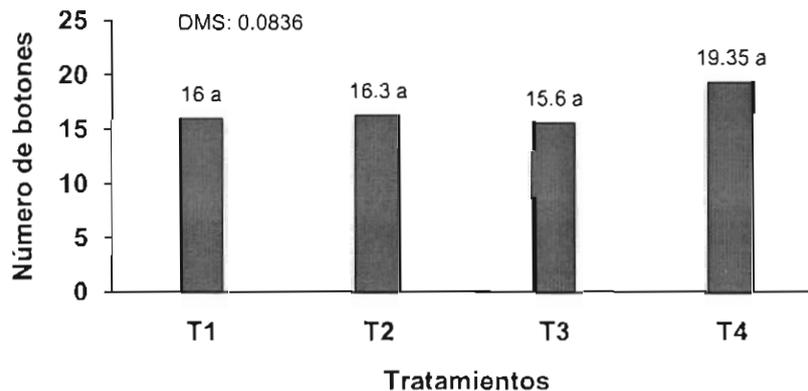


Figura 18. Efecto de los tratamientos sobre el número de botones florales en plantas de *crisantemo* a los 85 ddt, T<sub>1</sub>= *Bonellia flammea*, T<sub>2</sub>= *Acalypha gaumeri*, T<sub>3</sub>= Testigo (agua), T<sub>4</sub>= *Captan*.

El análisis de varianza del diámetro del racimo floral, tampoco exhibió diferencia estadística significativa entre los tratamientos (Figura 19) (Apéndice V, Tabla 20A). Las plantas con mayor diámetro de racimo floral correspondieron a las plantas tratadas con el extracto de *Bonellia flammea* (T<sub>1</sub>) con 15.1 cm. El tratamiento con menor diámetro de racimo floral correspondió al testigo agua (T<sub>3</sub>) con 12.9 cm.

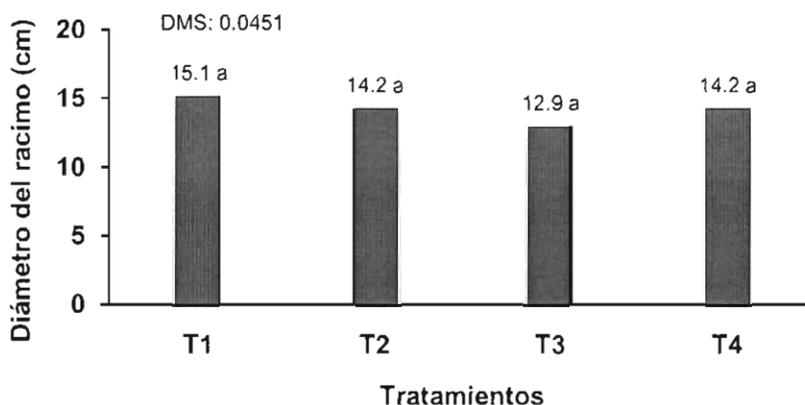


Figura 19. Efecto de los tratamientos en el diámetro del racimo de los botones florales en plantas de crisantemo a los 85 ddt, T<sub>1</sub>= *Bonellia flammea*, T<sub>2</sub>= *Acalypha gaumeri*, T<sub>3</sub>= Testigo (agua), T<sub>4</sub>= Captan.

#### 4.5 DISCUSIÓN

En general, los extractos acuosos de la raíz de *A. gaumeri* y la corteza de *B. flammea*, fueron capaces de reducir la severidad de la enfermedad. Entre estos, el extracto de *A. gaumeri* presentó una mayor tendencia a controlar la enfermedad con un 67.11 % de inhibición y en el ABCPE mostró la menor infección con 165.28 %/día. Los extractos acuosos de la raíz de *A. gaumeri* y la corteza de *Bonellia flammea* demostraron ser igual de efectivos para controlar a la enfermedad que el control químico captan.

*A. chrysanthemi* ha sido reportado como uno de los patógenos más importantes en el crisantemo, el cual alcanza una severidad de 50 % y una incidencia de hasta 57 % (Cabrera *et al.*, 2004).

En las estrategias para el control de *A. chrysanthemi*, Canul en el (2005) evaluó la intensidad de la enfermedad inducida por este patógeno en cultivares (Cv. Polaris Yellow y Cv. Polar) de crisantemo como respuesta a diferentes niveles de ácido salicílico, como una alternativa para evitar el uso de fungicidas, ya que se cree que induce la resistencia sistémica adquirida (RSA) produciendo enzimas que pueden degradar células de hongos, ambos cultivares son susceptibles al tizón foliar causado por *A. chrysanthemi* obteniendo en el segundo estrato una severidad final ( $Y_{final}$ ) en

la variedad Cv. Polaris Yellow de 25.75 %, con una concentración de  $10^{-10}$  M de ácido salicílico; comparando con el control no hubo diferencia estadística (27.61 % de severidad). Por el contrario el extracto de *A. gaumeri* demostró una severidad final de 4.00 %, observándose diferencia estadística significativa con respecto al testigo (agua), demostrando la propiedad antiparasitaria del extracto contra el hongo.

Existen pocos reportes de extractos naturales evaluados en campo contra fitopatógenos. Entre estos, el extracto acuoso de *Achyranthes japonica* y de *Rumex crispus* contra *Erysiphe graminis* f sp *hordei* en invernadero a una concentración de 300 g de material vegetal por litro de agua (30 %), logrando inhibir a *Erysiphe graminis* un 62 % y 67 % con *A. japonica* y *R. crispus* respectivamente (Kim et al., 2004). La aplicación del extracto acuoso de la raíz de *A. gaumeri* a la concentración de 30 g de material vegetal seco por litro de agua (3 %) mostró mayor capacidad de inhibir *A. chrysanthemi* en el campo a los 48 días después de la primera aplicación, a pesar de utilizar una concentración 10 veces menor.

Los resultados indican que las aplicaciones foliares del extracto acuoso de *A. gaumeri* reducen la severidad de la enfermedad. Con estos resultados prometedores es importante realizar más evaluaciones, como cuando existen condiciones favorables para la proliferación del patógeno (Fletcher, 1984), como son temperaturas óptimas de 25 a 28 °C y una humedad relativa de un 70 % para expresar una patogenicidad total (Bautista, 2002).

#### **4.6 CONCLUSIONES**

Los parámetros permitieron detectar que el extracto acuoso de la raíz de *A. gaumeri* y la corteza de *B. flammea* son igual de efectivos para controlar *A. chrysanthemi* comparados con el producto comercial captan.

El análisis global de los datos indica que los extractos acuosos de la raíz de *A. gaumeri* y la corteza de *B. flammea*, tienen un gran potencial para continuar siendo estudiados por su capacidad antifúngica en el control de *A. chrysanthemi* en campo.

#### 4.7 BIBLIOGRAFÍA

- Bauer, de la I Ma. de L. (1992). *Fitopatología*. Ed. Limusa-Noriega. Colegio de Postgraduados, Montecillo, México. 384 p.
- Bautista, M. N., L. J. Alvarado, P. J. C. Chavarría y A. H. Sánchez (2002). *Manejo fitosanitario de ornamentales*. Primera edición. Colegio de Postgraduados, Instituto de Fitosanidad. 237 p.
- Cabrera, M. G., Alvarez, R. E., Sosa de Castro, N. T., Sosa, L. A. (2004). *Patógenos de Chrysanthemum sp. En cultivos de las provincias de Corrientes y Chaco, Argentina*. Universidad Nacional del Noreste. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas. Resumen A028.
- Campell, C. L., and L. V. Madden (1990). *Introduction to plant disease epidemiology*, John Wiley and Sons. New York, USA. 532 p.
- Canul R. G. (2005). *Inducción floral en crisantemo (Chrysanthemum morifolium Ramat.) con ácido salicílico*. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias en Horticultura Tropical. Instituto Tecnológica de Conkal. 4 p.
- Fletcher, J. T. (1984). *Diseases of greenhouse plants*. University of Illinois Press. Segunda edition. Urbana, Chicago, USA. 150-165 p.
- Guerrero-Rodríguez, E., S. Solís-Gaona, F. D. Hernández-Castillo, A., Flores-Olivas y V. Sandoval-López. (2007). *Biológica in vitro de extractos de Flourensia cernua D.C. en patógenos de postcosecha: Alternaria alternate (Fr.: Fr.) Keissl., Colletotrichum gloeosporioides (Penz.) Penz. y Sacc. y Penicillium digitatum (Pers.: Fr.) Sacc.* Revista Mexicana de Fitopatología, 25(1), 48-53.
- Kim, J. C., G. J. Choi, S. W. Lee, J. S Kim, K. Y. Chung and K. Y. Cho (2004). *Screening extracts of Achryranthes japonica and Rumex crispus for activity against various plant pathogenic fungi and control of powdery mildew*. Pest Management Science, 60, 803-808.
- Rugutt, J. K., A. N. Ngigi, K. J. Rugutt and P. K. Ndalut (2006). *Native Kenyan plants as possible alternatives to methyl bromide in soil fumigation*. Phytomedicine, 13, 576–583
- Steel, R. D. G. y J. H. Torrie, (1986). *Bioestadística. Principios y procedimientos*. Segunda edición. Ed. Mc Graw-Hill. México D.F. 622 p.
- Villanueva-Couoh, E., B. M. Sánchez., A. J. Cristóbal y S. J. Tún (2005). *Diagnóstico y alternativas de manejo químico del tizón foliar (Aternaria chrysanthemi Simmons y Crosier) del crisantemo (Chrysanthemum morifolium Ramant.) Kitamura en Yucatán, México*. Revista Mexicana de Fitopatología, 23(1), 49-56.

## Capítulo V

### Conclusiones generales y perspectivas

#### 5.1 CONCLUSIONES

Las especies de *Alternaria* son patógenos de plantas de importancia agrícola cuyo control es a base de productos químicos. Actualmente las investigaciones están dirigidas hacia la búsqueda de productos naturales amigables con el ambiente. Yucatán es un estado con una gran diversidad en su microflora y macroflora. A pesar de esto, poco se ha estudiado en cuanto a su potencial metabólico en el control de hongos. Por otra parte, las investigaciones están centradas en pruebas *in vitro* y muy pocas a nivel de campo.

Este trabajo presenta tres vertientes, primero el aislamiento y establecimiento del bioensayo antifúngico en microdilución, segundo la evaluación antifúngica de los extractos contra *Alternaria chrysanthemi* en laboratorio y por último la evaluación en campo de los extractos más activos.

En la primera parte se aisló una cepa de *A. chrysanthemi* a partir de material vegetal infectado en campo; la purificación se realizó mediante cultivos monospóricos y se identificó por taxonómica tradicional.

El trabajo aporta el establecimiento de un bioensayo antifúngico en microdilución para el hongo filamentoso *A. chrysanthemi*. Este bioensayo se estableció de manera confiable con el fin de evaluar extractos, acuosos y etanólicos de plantas, así como extractos orgánicos fúngicos.

En la segunda parte, los resultados demostraron que el extracto etanólico de la raíz de *Acalypha gaumeri*, tiene la tendencia de producir el mayor efecto inhibitorio (<75 %) sobre el crecimiento de *A. chrysanthemi*, a una concentración de 1000 µg/mL en las dos pruebas de susceptibilidad evaluadas.

Los extractos acuosos de la corteza de *Bonellia flammea* y raíz de *A. gaumeri* demostraron una buena inhibición contra *A. chrysanthemi* a una concentración (3%) menor en comparación con otros reportes.

*A. gaumeri* es una planta cuyo extractos, tanto acuoso como etanólico, presentaron propiedades inhibitorias contra *A. chrysanthemi* en las evaluaciones *in vitro*, indicando que es un candidato altamente promisorio para continuar siendo estudiado en campo.

El extracto etanólico y acuoso de la raíz de *A. gaumeri* y los extractos acuosos de la corteza y hoja de *B. flammea* inhibieron la germinación y esporulación de *A. chrysanthemi*, sin observar diferencia estadística significativa entre los extractos.

Los extractos de la raíz de *A. gaumeri*, tanto acuoso como etanólico, presentaron una mayor tendencia a inhibir la germinación de las esporas que los extractos de *B. flammea*. Asimismo los extractos acuosos de hoja y corteza de *B. flammea* (BFH-AM y BFC-AM, respectivamente) demostraron una tendencia a presentar una mayor actividad antiesporulante que los extractos de *A. gaumeri*.

Los extractos fúngicos evaluados en este estudio presentaron una moderada actividad en las concentraciones evaluadas, por lo que no fueron considerados como candidatos para el control de *A. chrysanthemi*.

En la última parte, los extractos acuosos de la raíz de *A. gaumeri* y de la corteza de *B. flammea* se evaluaron en campo contra *A. chrysanthemi*.

Los resultados obtenidos *in vivo* con los extractos de *A. gaumeri* y *B. flammea* correlacionaron con los obtenidos *in vitro*. Ambos extractos mediante los parámetros evaluados redujeron a nivel de campo la severidad de la enfermedad causada por *A. chrysanthemi* en cultivos de crisantemo.

El producto químico comercial (Captán) fue igual de efectivo para controlar *A. chrysanthemi*, según los parámetros evaluados, que los extractos acuosos de *A. gaumeri* y *B. flammea*.

## 5.2 PERSPECTIVAS

Los extractos etanólico y acuoso de la raíz de *Acalypha gaumeri* y el acuoso de *B. flammea*, demostraron una buena capacidad para inhibir al patógeno *in vitro*, de igual forma los extractos acuosos evaluado en campo redujo la severidad de la enfermedad causada por *A. chrysanthemi*. Es muy importante realizar más evaluaciones para validar los resultados, en particular cuando las condiciones sean las más óptimas para el desarrollo de la enfermedad.

Estos resultados indican una alta probabilidad de que los extractos de *A. gaumeri* y *B. flammea* sean utilizados a futuro en campo. Ambas plantas son consideradas nativas y endémicas de la región peninsular, por lo que es altamente prioritario la propagación de las plantas en sus diferentes formas, así como verificar la continua producción de sus principios activos. Aunado a lo anterior también deben realizarse los estudios fitoquímicos para la identificación de los metabolitos responsables de la actividad, pruebas de citotoxicidad, validación y optimización de las aplicaciones.

## APÉNDICE

**Tabla 1A.** Porcentaje de inhibición de *A. chrysanthemi* Simons & Crosier. con los diferentes extractos a las 48 y 96 horas en el bioensayo de microdilución.

Trat.	Extracto	Clave	Inhibición (%)	
			48 hr	96 hr
T <sub>1</sub>	SRH13 fúngico (1000 µg/mL)	SRH13M	31.25 defg	0.00 k
T <sub>2</sub>	SRH13 fúngico (500 µg/mL)	SRH13Q	0.00 i	0.00 k
T <sub>3</sub>	SRH13 fúngico (250 µg/mL)	SRH13D	0.00 i	0.00 k
T <sub>4</sub>	SRH34 fúngico (1000 µg/mL)	SRH34M	18.75 fghi	0.00 k
T <sub>5</sub>	SRH34 fúngico (500 µg/mL)	SRH34Q	0.00 i	0.00 k
T <sub>6</sub>	SRH34 fúngico (250 µg/mL)	SRH34D	0.00 i	0.00 k
T <sub>7</sub>	SRH47 fúngico (1000 µg/mL)	SRH47M	53.75 bcdef	50.00 cdef
T <sub>8</sub>	SRH47 fúngico (500 µg/mL)	SRH47Q	31.25 defg	25.00 gh
T <sub>9</sub>	SRH47 fúngico 250 µg/mL)	SRH47D	25.00 efgh	0.00 k
T <sub>10</sub>	SRH52 fúngico (1000 µg/mL)	SRH52M	50.00 bcdef	37.50 efg
T <sub>11</sub>	SRH52 fúngico (500 µg/mL)	SRH52Q	18.75 fghi	0.00 k
T <sub>12</sub>	SRH52 fúngico (250 µg/mL)	SRH52D	0.00 i	0.00 k
T <sub>13</sub>	SRH73 fúngico (1000 µg/mL)	SRH73M	6.25 hi	0.00 k
T <sub>14</sub>	SRH73 fúngico (500 µg/mL)	SRH73Q	0.00 i	0.00 e
T <sub>15</sub>	SRH73 fúngico (250 µg/mL)	SRH73D	0.00 i	0.00 e
T <sub>16</sub>	MRH45 fúngico (1000 µg/mL)	MRH45M	50.00 bcdef	0.00 k
T <sub>17</sub>	MRH45 fúngico (500 µg/mL)	MRH45Q	25.00 efgh	0.00 k
T <sub>18</sub>	MRH45 fúngico (250 µg/mL)	MRH45D	0.00 i	0.00 k
T <sub>19</sub>	MRH42 fúngico (1000 µg/mL)	MRH42M	0.00 i	0.00 k
T <sub>20</sub>	MRH42 fúngico 500 µg/mL)	MRH42Q	0.00 i	0.00 k
T <sub>21</sub>	MRH42 fúngico (250 µg/mL)	MRH42D	0.00 i	0.00 k
T <sub>22</sub>	SRH81 fúngico (1000 µg/mL)	SRH81M	43.75 cdef	0.00 k
T <sub>23</sub>	SRH81 fúngico (500 µg/mL)	SRH81Q	25.00 efgh	0.00 k
T <sub>24</sub>	SRH81 fúngico (250 µg/mL)	SRH81D	0.00 i	0.00 k
T <sub>25</sub>	SRH91 fúngico (1000 µg/mL)	SRH91M	43.75 cdef	0.00 k
T <sub>26</sub>	SRH91 fúngico (500 µg/mL)	SRH91Q	25.00 efgh	0.00 k
T <sub>27</sub>	SRH91 fúngico (250 µg/mL)	SRH91D	0.00 i	0.00 e
T <sub>28</sub>	SRH94 fúngico (1000 µg/mL)	SRH94M	53.75 bcdef	50.00 cdef
T <sub>29</sub>	SRH94 fúngico (500 µg/mL)	SRH94Q	37.50 cdefg	37.50 efg
T <sub>30</sub>	SRH94 fúngico (250 µg/mL)	SRH94D	12.5 ghi	12.50 ij
T <sub>31</sub>	SRH95 fúngico (1000 µg/mL)	SRH95M	18.75 fghi	0.00 k
T <sub>32</sub>	SRH95 fúngico (500 µg/mL)	SRH95Q	0.00 i	0.00 k
T <sub>33</sub>	SRH95 fúngico (250 µg/mL)	SRH95D	0.00 i	0.00 k
T <sub>34</sub>	ACR vegetal (1000 µg/mL)	ACR-EM	81.25 ab	75.00 b
T <sub>35</sub>	ACR vegetal (500 µg/mL)	ACR-EQ	75.00 bc	50.75 efg
T <sub>36</sub>	ACR vegetal (250 µg/mL)	ACR-ED	68.75 bc	38.75 hi
T <sub>37</sub>	AHH vegetal (1000 µg/mL)	AHH-EM	18.75 fghi	0.00 k
T <sub>38</sub>	AHH vegetal (500 µg/mL)	AHH-EQ	0.00 i	0.00 k
T <sub>39</sub>	AHH vegetal (250 µg/mL)	AHH-ED	0.00 i	0.00 k
T <sub>40</sub>	AHTR vegetal (1000 µg/mL)	AHTR-EM	12.5 ghi	6.25 jk
T <sub>41</sub>	AHTR vegetal (500 µg/mL)	AHTR-EQ	0.00 i	0.00 k

Continuación

T <sub>42</sub>	AHTR vegetal (250 µg/mL)	AHTR-ED	0.00 i	0.00 k
T <sub>43</sub>	CUT vegetal (1000 µg/mL)	CUT-EM	12.50 ghi	0.00 k
T <sub>44</sub>	CUT vegetal (500 µg/mL)	CUT-EQ	12.50 ghi	0.00 k
T <sub>45</sub>	CUT vegetal (250 µg/mL)	CUT-ED	0.00 i	0.00 k
T <sub>46</sub>	CUR vegetal (1000 µg/mL)	CUR-EM	25.00 efgh	6.25 jk
T <sub>47</sub>	CUR vegetal (500 µg/mL)	CUR-EQ	25.00 efgh	0.00 k
T <sub>48</sub>	CUR vegetal 250 µg/mL)	CUR-ED	12.50 ghi	0.00 k
T <sub>49</sub>	CCT vegetal (1000 µg/mL)	CCT-EM	0.00 i	0.00 k
T <sub>50</sub>	CCT vegetal (500 µg/mL)	CCT-EQ	0.00 i	0.00 k
T <sub>51</sub>	CCT vegetal (250 µg/mL)	CCT-ED	0.00 i	0.00 k
T <sub>52</sub>	FCR vegetal (1000 µg/mL)	FCR-EM	0.00 i	0.00 k
T <sub>53</sub>	FCR vegetal (500 µg/mL)	FCR-EQ	0.00 i	0.00 k
T <sub>54</sub>	FCR vegetal (250 µg/mL)	FCR-ED	0.00 i	0.00 k
T <sub>55</sub>	ROT vegetal (1000 µg/mL)	ROT-EM	25.00 efgh	0.00 k
T <sub>56</sub>	ROT vegetal (500 µg/mL)	ROT-EQ	18.75 fghi	0.00 k
T <sub>57</sub>	ROT vegetal (250 µg/mL)	ROT-ED	0.00 i	0.00 k
T <sub>58</sub>	TMT vegetal (1000 µg/mL)	TMT-EM	25.00 efgh	0.00 k
T <sub>59</sub>	TMT vegetal (500 µg/mL)	TMT-EQ	18.75 fghi	0.00 k
T <sub>60</sub>	TMT vegetal (250 µg/mL)	TMT-ED	0.00 i	0.00 k
T <sub>61</sub>	VGH vegetal (1000 µg/mL)	VGH-EM	25.00 efgh	0.00 k
T <sub>62</sub>	VGH vegetal (500 µg/mL)	VGH-EQ	6.25 hi	0.00 k
T <sub>63</sub>	VGH vegetal (250 µg/mL)	VGH-ED	0.00 i	0.00 k
T <sub>64</sub>	BFH vegetal (1000 µg/mL)	BFH-EM	25.00 efgh	0.00 k
T <sub>65</sub>	BFH vegetal (500 µg/mL)	BFH-EQ	6.25 hi	0.00 k
T <sub>66</sub>	BFH vegetal (250 µg/mL)	BFH-ED	0.00 i	0.00 k
T <sub>67</sub>	BFC vegetal (1000 µg/mL)	BFC-EM	25.00 efgh	0.00 k
T <sub>68</sub>	BFC vegetal (500 µg/mL)	BFC-EQ	6.25 bc	0.00 k
T <sub>69</sub>	BFC vegetal (250 µg/mL)	BFC-ED	0.00 i	0.00 k
T <sub>70</sub>	ACR acuoso 3% (30 g/L de m.v)	ACR-AM	75.00 bc	68.75 bc
T <sub>71</sub>	ACR acuoso 1.5% (15 g/L de m.v)	ACR-AQ	75.00 bc	56.25 cdef
T <sub>72</sub>	ACR acuoso 0.75% (7.5 g/L de m.v)	ACR-AD	62.50 bcde	37.50 efg
T <sub>73</sub>	AHH acuoso 3% (30 g/L de m.v)	AHH-AM	6.25 hi	0.00 k
T <sub>74</sub>	AHHacuoso 1.5% (15 g/L de m.v)	AHH-AQ	0.00 i	0.00 k
T <sub>75</sub>	AHH acuoso 0.75% (7.5 g/L de m.v)	AHH-AD	0.00 i	0.00 k
T <sub>76</sub>	AHTR acuoso 3% (30 g/L de m.v)	AHTR-AM	25.00 efgh	12.50 ij
T <sub>77</sub>	AHTR acuoso 1.5% (15 g/L de m.v)	AHTR-AQ	12.50 ghi	0.00 k
T <sub>78</sub>	AHTR acuoso 0.75% (7.5 g/L de m.v)	AHTR-AD	12.50 ghi	0.00 k
T <sub>79</sub>	CUR acuoso 3% (30 g/L de m.v)	CUR-AM	56.25 bcde	37.5 efg
T <sub>80</sub>	CUR acuoso 1.5% (15 g/L de m.v)	CUR-AQ	43.75 cdef	25.00 gh
T <sub>81</sub>	CUR acuoso 0.75% (7.5 g/L de m.v)	CUR-AD	25.00 efgh	25.00 gh
T <sub>82</sub>	CCT acuoso 3% (30 g/L de m.v)	CCT-AM	0.00 i	0.00 k
T <sub>83</sub>	CCT acuoso 1.5% (15 g/L de m.v)	CCT-AQ	0.00 i	0.00 k
T <sub>84</sub>	CCT acuoso 0.75% (7.5 g/L de m.v)	CCT-AD	0.00 i	0.00 k
T <sub>85</sub>	FCR acuoso 3% (30 g/L de m.v)	FCR-AM	0.00 i	0.00 k
T <sub>86</sub>	FCR acuoso 1.5% (15 g/L de m.v)	FCR-AQ	0.00 i	0.00 k
T <sub>87</sub>	FCR acuoso 0.75% (7.5 g/L de m.v)	FCR-AD	0.00 i	0.00 k
T <sub>88</sub>	ROT acuoso 3% (30 g/L de m.v)	ROT-AM	0.00 i	0.00 k
T <sub>89</sub>	ROT acuoso 1.5% (15 g/L de m.v)	ROT-AQ	0.00 i	0.00 k
T <sub>90</sub>	ROT acuoso 0.75% (7.5 g/L de m.v)	ROT-AD	0.00 c	0.00 k

Continuación				
T <sub>91</sub>	TMT acuoso 3% (30 g/L de m.v)	TMT-AM	12.50 ghi	0.00 k
T <sub>92</sub>	TMT acuoso 1.5% (15 g/L de m.v)	TMT-AQ	0.00 i	0.00 k
T <sub>93</sub>	TMT acuoso 0.75% (7.5 g/L de m.v)	TMT-AD	0.00 i	0.00 k
T <sub>94</sub>	VGH acuoso 3% (30 g/L de m.v)	VGH-AM	0.00 i	0.00 k
T <sub>95</sub>	VGH acuoso 1.5% (15 g/L de m.v)	VGH-AQ	0.00 i	0.00 k
T <sub>96</sub>	VGH acuoso 0.75% (7.5 g/L de m.v)	VGH-AD	0.00 i	0.00 k
T <sub>97</sub>	BFH acuoso 3% (30 g/L de m.v)	BFH-AM	62.50 bcde	50.00 cdef
T <sub>98</sub>	BFH acuoso 1.5% (15 g/L de m.v)	BFH-AQ	56.25 bcde	31.25 fgh
T <sub>99</sub>	BFH acuoso 0.75% (7.5 g/L de m.v)	BFH-AD	31.25 defg	12.50 ij
T <sub>100</sub>	BFC acuoso 3% (30 g/L de m.v)	BFC-AM	75.00 bc	62.50 bcde
T <sub>101</sub>	BFC acuoso 1.5% (15 g/L de m.v)	BFC-AQ	62.50 bcde	50.00 cdef
T <sub>102</sub>	BFC acuoso 0.75% (7.5 g/L de m.v)	BFC-AD	50.00 bcdef	31.25 bcde
T <sub>103</sub>	Patógeno + RMPI + DMSO	CONTNEG	0.00 l	0.00 k
T <sub>104</sub>	DMSO (25%)	CONTPOS	100.00 a	100.00 a

Los tratamientos con la misma letra no son significativamente diferentes entre columnas

**Tabla 2A.** Análisis de varianza de la efectividad por tratamiento (extractos) en la inhibición de crecimiento micelial de *A. chrysanthemi* Simons & Crosier. en el bioensayo antifúngico en microdilución a las 48 horas.

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	Fc.	Pr>F
Tratamiento	103	56.063	0.544	30.50	<.0001
Error	312	5.569	0.018		
Total	415	61.632			

C.V. = 42.714

**Tabla 3A.** Medias de la efectividad por tratamiento (extractos) en la inhibición de crecimiento micelial de *A. chrysanthemi* Simons & Crosier. en el bioensayo antifúngico en microdilución a las 48 horas

Tratamientos	Clave	Medias	Agrupación Tukey
T <sub>104</sub>	CONTPOS	1.57080	A
T <sub>34</sub>	ACR-EM	1.17810	AB
T <sub>70</sub>	ACR-AM	1.04720	BC
T <sub>35</sub>	ACR-EQ	1.04720	BC
T <sub>100</sub>	BFC-AM	1.04720	BC
T <sub>71</sub>	ACR-AQ	1.04720	BC
T <sub>36</sub>	ACR-ED	1.04720	BC
T <sub>72</sub>	ACR-AD	0.91630	BCDE
T <sub>97</sub>	BFH-AM	0.91630	BCDE
T <sub>101</sub>	BFC-AQ	0.91630	BCDE
T <sub>79</sub>	CUR-AM	0.85085	BCDE
T <sub>98</sub>	BFH-AQ	0.85085	BCDE
T <sub>28</sub>	SRH94M	0.85085	BCDE
T <sub>8</sub>	SRH47Q	0.85085	BCDE
T <sub>10</sub>	SRH52M	0.78540	BCDEF

Continuación

T <sub>16</sub>	MRH45M	0.78540	BCDEF
T <sub>102</sub>	BFC-AD	0.78540	BCDEF
T <sub>7</sub>	SRH47M	0.71995	CDEF
T <sub>25</sub>	SRH91M	0.71995	CDEF
T <sub>80</sub>	CUR-AQ	0.71995	CDEF
T <sub>22</sub>	SRH81M	0.71995	CDEF
T <sub>20</sub>	SRH94Q	0.65450	CDEFG
T <sub>1</sub>	SRH13M	0.58905	DEFG
T <sub>90</sub>	BFH-AD	0.58905	DEFG
T <sub>17</sub>	MRH45Q	0.52360	EFGH
T <sub>23</sub>	SRH81Q	0.52360	EFGH
T <sub>76</sub>	AHTR-AM	0.52360	EFGH
T <sub>55</sub>	ROT-EM	0.52360	EFGH
T <sub>48</sub>	CUR-EM	0.52360	EFGH
T <sub>9</sub>	SRH47D	0.52360	EFGH
T <sub>47</sub>	CUR-EQ	0.52360	EFGH
T <sub>81</sub>	CUR-AD	0.52360	EFGH
T <sub>87</sub>	BFC-EM	0.52360	EFGH
T <sub>58</sub>	TMT-EM	0.52360	EFGH
T <sub>61</sub>	VGH-EM	0.52360	EFGH
T <sub>64</sub>	BFH-EM	0.52360	EFGH
T <sub>28</sub>	SRH91Q	0.52360	EFGH
T <sub>69</sub>	TMT-EQ	0.39270	FGHI
T <sub>31</sub>	SRH95M	0.39270	FGHI
T <sub>11</sub>	SRH52Q	0.39270	FGHI
T <sub>37</sub>	AHH-EM	0.39270	FGHI
T <sub>66</sub>	ROT-EQ	0.39270	FGHI
T <sub>4</sub>	SRH34M	0.39270	FGHI
T <sub>48</sub>	CUR-ED	0.26180	GHI
T <sub>43</sub>	CUT-EM	0.26180	GHI
T <sub>91</sub>	TMT-AM	0.26180	GHI
T <sub>30</sub>	SRH94D	0.26180	GHI
T <sub>77</sub>	AHTR-AQ	0.26180	GHI
T <sub>78</sub>	AHTR-AD	0.26180	GHI
T <sub>40</sub>	AHTR-EM	0.26180	GHI
T <sub>44</sub>	CUT-EQ	0.26180	GHI
T <sub>82</sub>	VGH-EQ	0.13090	HI
T <sub>13</sub>	SRH73M	0.13090	HI
T <sub>85</sub>	BFH-EQ	0.13090	HI
T <sub>73</sub>	AHH-AM	0.13090	HI
T <sub>2</sub>	SRH13Q	0.00000	I
T <sub>3</sub>	SRH13D	0.00000	I
T <sub>5</sub>	SRH34Q	0.00000	I
T <sub>6</sub>	SRH34D	0.00000	I
T <sub>12</sub>	SRH52D	0.00000	I
T <sub>14</sub>	SRH73Q	0.00000	I
T <sub>15</sub>	SRH73D	0.00000	I
T <sub>18</sub>	MRH45D	0.00000	I
T <sub>19</sub>	MRH42M	0.00000	I
T <sub>20</sub>	MRH42Q	0.00000	I
T <sub>21</sub>	MRH42D	0.00000	I
T <sub>24</sub>	SRH81D	0.00000	I
T <sub>27</sub>	SRH91D	0.00000	I

Continuación

T <sub>32</sub>	SRH95Q	0.00000	
T <sub>33</sub>	SRH95D	0.00000	
T <sub>38</sub>	AHH-EQ	0.00000	
T <sub>39</sub>	AHH-ED	0.00000	
T <sub>41</sub>	AHTR-EQ	0.00000	
T <sub>42</sub>	AHTR-ED	0.00000	
T <sub>45</sub>	CUT-ED	0.00000	
T <sub>49</sub>	CCT-EM	0.00000	
T <sub>50</sub>	CCT-EQ	0.00000	
T <sub>51</sub>	CCT-ED	0.00000	
T <sub>52</sub>	FCR-EM	0.00000	
T <sub>53</sub>	FCR-EQ	0.00000	
T <sub>54</sub>	FCR-ED	0.00000	
T <sub>57</sub>	ROT-ED	0.00000	
T <sub>60</sub>	TMT-ED	0.00000	
T <sub>63</sub>	VGH-ED	0.00000	
T <sub>68</sub>	BFH-ED	0.00000	
T <sub>68</sub>	BFC-EQ	0.00000	
T <sub>69</sub>	BFC-ED	0.00000	
T <sub>74</sub>	AHH-AQ	0.00000	
T <sub>75</sub>	AHH-AD	0.00000	
T <sub>82</sub>	CCT-AM	0.00000	
T <sub>83</sub>	CCT-AQ	0.00000	
T <sub>84</sub>	CCT-AD	0.00000	
T <sub>85</sub>	FCR-AM	0.00000	
T <sub>86</sub>	FCR-AQ	0.00000	
T <sub>87</sub>	FCR-AD	0.00000	
T <sub>88</sub>	ROT-AM	0.00000	
T <sub>89</sub>	ROT-AQ	0.00000	
T <sub>90</sub>	ROT-AD	0.00000	
T <sub>92</sub>	TMT-AQ	0.00000	
T <sub>93</sub>	TMT-AD	0.00000	
T <sub>94</sub>	VGH-AM	0.00000	
T <sub>95</sub>	VGH-AQ	0.00000	
T <sub>96</sub>	VGH-AD	0.00000	
T <sub>103</sub>	CONTNEG	0.00000	

Los tratamientos con la misma letra no son significativamente diferentes  
**DMS= 0.413**

**Tabla 4A.** Análisis de varianza de la efectividad por tratamiento (extractos) en la inhibición del crecimiento micelial de *A. chrysanthemi* Simons & Crosier, en el bioensayo antifúngico en microdilución a las 96 horas.

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	Fc.	Pr>F
<b>Tratamiento</b>	105	39.220	0.381	54.59	<.0001
<b>Error</b>	310	2.176	0.007		
<b>Total</b>	415	41.396			

C.V.= 55.994

**Tabla 5A.** Medias de la efectividad por tratamiento (extractos) en la inhibición de crecimiento micelial *A. chrysanthemi* Simons & Crosier. en el bioensayo antifúngico en microdilución a las 96 horas.

Tratamientos	Clave	Medias	Agrupación Tukey
T <sub>104</sub>	CONTPOS	1.57080	A
T <sub>34</sub>	ACR-EM	1.04720	B
T <sub>70</sub>	ACR-AM	0.98175	BC
T <sub>100</sub>	BFC-AM	0.91630	BCDE
T <sub>71</sub>	ACR-AQ	0.85085	CDEF
T <sub>101</sub>	BFC-AQ	0.78540	CDEF
T <sub>97</sub>	BFH-AM	0.78540	CDEF
T <sub>35</sub>	ACR-EQ	0.78540	CDEF
T <sub>28</sub>	SRH94M	0.78540	CDEF
T <sub>7</sub>	SRH47M	0.78540	CDEF
T <sub>72</sub>	ACR-AD	0.65450	EFG
T <sub>79</sub>	CUR-AM	0.65450	EFG
T <sub>10</sub>	SRH52M	0.65450	EFG
T <sub>29</sub>	SRH94Q	0.65450	EFG
T <sub>98</sub>	BFH-AQ	0.58905	FGH
T <sub>102</sub>	BFC-AD	0.58905	FGH
T <sub>80</sub>	CUR-AQ	0.52360	GH
T <sub>8</sub>	SRH47Q	0.52360	GH
T <sub>81</sub>	CUR-AD	0.52360	GH
T <sub>36</sub>	ACR-ED	0.39270	HI
T <sub>76</sub>	AHTR-AM	0.26180	IJ
T <sub>99</sub>	BFH-AD	0.26180	IJ
T <sub>30</sub>	SRH94D	0.13090	JK
T <sub>46</sub>	CUR-EM	0.13090	JK
T <sub>40</sub>	AHTR-EM	0.13090	JK
T <sub>67</sub>	BFC-EM	0.00000	K
T <sub>1</sub>	SRH13M	0.00000	K
T <sub>2</sub>	SRH13Q	0.00000	K
T <sub>3</sub>	SRH13D	0.00000	K
T <sub>4</sub>	SRH34M	0.00000	K
T <sub>5</sub>	SRH34Q	0.00000	K
T <sub>8</sub>	SRH34D	0.00000	K
T <sub>9</sub>	SRH47D	0.00000	K
T <sub>11</sub>	SRH52Q	0.00000	K
T <sub>12</sub>	SRH52D	0.00000	K
T <sub>13</sub>	SRH73M	0.00000	K
T <sub>14</sub>	SRH73Q	0.00000	K
T <sub>15</sub>	SRH73D	0.00000	K
T <sub>16</sub>	MRH45M	0.00000	K
T <sub>17</sub>	MRH45Q	0.00000	K
T <sub>18</sub>	MRH45D	0.00000	K
T <sub>19</sub>	MRH42M	0.00000	K
T <sub>20</sub>	MRH42Q	0.00000	K
T <sub>21</sub>	MRH42D	0.00000	K
T <sub>22</sub>	SRH81M	0.00000	K
T <sub>23</sub>	SRH81Q	0.00000	K
T <sub>24</sub>	SRH81D	0.00000	K
T <sub>25</sub>	SRH91M	0.00000	K

Continuación

T <sub>26</sub>	SRH91Q	0.00000	K
T <sub>27</sub>	SRH91D	0.00000	K
T <sub>31</sub>	SRH95M	0.00000	K
T <sub>32</sub>	SRH95Q	0.00000	K
T <sub>33</sub>	SRH95D	0.00000	K
T <sub>37</sub>	AHH-EM	0.00000	K
T <sub>38</sub>	AHH-EQ	0.00000	K
T <sub>39</sub>	AHH-ED	0.00000	K
T <sub>41</sub>	AHTR-EQ	0.00000	K
T <sub>42</sub>	AHTR-ED	0.00000	K
T <sub>43</sub>	CUT-EM	0.00000	K
T <sub>44</sub>	CUT-EQ	0.00000	K
T <sub>45</sub>	CUT-ED	0.00000	K
T <sub>47</sub>	CUR-EQ	0.00000	K
T <sub>48</sub>	CUR-ED	0.00000	K
T <sub>49</sub>	CCT-EM	0.00000	K
T <sub>50</sub>	CCT-EQ	0.00000	K
T <sub>51</sub>	CCT-ED	0.00000	K
T <sub>52</sub>	FCR-EM	0.00000	K
T <sub>53</sub>	FCR-EQ	0.00000	K
T <sub>54</sub>	FCR-ED	0.00000	K
T <sub>55</sub>	ROT-EM	0.00000	K
T <sub>56</sub>	ROT-EQ	0.00000	K
T <sub>57</sub>	ROT-ED	0.00000	K
T <sub>58</sub>	TMT-EM	0.00000	K
T <sub>59</sub>	TMT-EQ	0.00000	K
T <sub>60</sub>	TMT-ED	0.00000	K
T <sub>61</sub>	VGH-EM	0.00000	K
T <sub>62</sub>	VGH-EQ	0.00000	K
T <sub>63</sub>	VGH-ED	0.00000	K
T <sub>64</sub>	BFH-EM	0.00000	K
T <sub>65</sub>	BFH-EQ	0.00000	K
T <sub>66</sub>	BFH-ED	0.00000	K
T <sub>68</sub>	BFC-EQ	0.00000	K
T <sub>69</sub>	BFC-ED	0.00000	K
T <sub>73</sub>	AHH-AM	0.00000	K
T <sub>74</sub>	AHH-AQ	0.00000	K
T <sub>75</sub>	AHTR-AD	0.00000	K
T <sub>77</sub>	AHTR-AQ	0.00000	K
T <sub>78</sub>	AHTR-AD	0.00000	K
T <sub>82</sub>	CCT-AM	0.00000	K
T <sub>83</sub>	CCT-AQ	0.00000	K
T <sub>84</sub>	CCT-AD	0.00000	K
T <sub>85</sub>	FCR-AM	0.00000	K
T <sub>86</sub>	FCR-AQ	0.00000	K
T <sub>87</sub>	FCR-AD	0.00000	K
T <sub>88</sub>	ROT-AM	0.00000	K
T <sub>89</sub>	ROT-AQ	0.00000	K
T <sub>90</sub>	ROT-AD	0.00000	K
T <sub>91</sub>	TMT-AM	0.00000	K
T <sub>92</sub>	TMT-AQ	0.00000	K
T <sub>93</sub>	TMT-AD	0.00000	K
T <sub>94</sub>	VGH-AM	0.00000	K

Continuación			
T <sub>95</sub>	VGH-AQ	0.00000	K
T <sub>96</sub>	VGH-AD	0.00000	K
T <sub>103</sub>	CONTNEG	0.00000	K

Los tratamientos con la misma letra no son significativamente diferentes. DMS = 0.25

**Tabla 6A.** Análisis de varianza de la efectividad de los extractos vegetales sobre el crecimiento micelial de *A. chrysanthemi* Simons & Crosier. en el bioensayo de dilución en agar.

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	Fc.	Pr>F
Tratamiento	7	5.316	0.759	877.29	0.0001
Error	4	0.021	0.00086		
Total	23	5.337			

C.V.= 3.614

**Tabla 7A.** Medias de la efectividad de los tratamiento (extractos) sobre la inhibición de crecimiento micelial de *A. chrysanthemi* Simons & Crosier. en el bioensayo de dilución en agar con Tukey (P=0.05).

Tratamiento	Clave	Efectividad (%)	Agrupación Tukey
T <sub>105</sub>	CONTPOS	100	A
T <sub>34</sub>	ACR-EM	78.12	B
T <sub>100</sub>	BFC-AM	56.85	C
T <sub>70</sub>	ACR-AM	50.92	C
T <sub>35</sub>	ACR-EQ	47.03	DE
T <sub>97</sub>	BFH-AM	44.98	DE
T <sub>71</sub>	ACR-AQ	43.30	E
T <sub>103</sub>	CONTNEG	0	F

Valores con la misma letra son estadísticamente iguales de acuerdo con la prueba de Tukey (P=0.05) DMS = 0.069

**Tabla 8A.** Análisis de varianza del efecto de los extractos vegetales sobre la densidad de esporas de *A. chrysanthemi* Simons & Crosier.

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	Fc.	Pr>F
Tratamiento	7	3.438	0.491	80.81	0.0001
Error	24	0.146	0.006		
Total	31	3.583			

C.V.= 14.993

**Tabla 9A.** Medias con Tukey (P=0.05) de la densidad de esporas de *A. chrysanthemi* Simons & Crosier. en presencia de los extractos vegetales

Tratamiento	Clave	Densidad de esporas (mL)	Agrupación Tukey
T <sub>103</sub>	CONTNEG	60833	A
T <sub>71</sub>	ACR-AQ	15000	B
T <sub>70</sub>	ACR-AM	12500	B
T <sub>35</sub>	ACR-EQ	13333	B
T <sub>34</sub>	ACR-EM	10833	B
T <sub>97</sub>	BFH-AM	9166	B
T <sub>100</sub>	BFC-AM	6666	B
T <sub>105</sub>	CONTPOS	0	C

Valores con la misma letra son estadísticamente iguales de acuerdo con la prueba de Tukey (P=0.05) DMS = 0.183

**Tabla 10A.** Análisis de varianza de los extractos vegetales en la densidad de esporulación de *A. chrysanthemi* Simons & Crosier.

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	Fc.	Pr>F
Tratamiento	7	3.438	0.491	80.81	0.0001
Error	24	0.146	0.006		
Total	31	3.583			

C.V= 7.417

**Tabla 11A.** Medias con Tukey (P=0.05). de la efectividad en la densidad de esporas de *A. chrysanthemi* Simons & Crosier. de los extractos vegetales

Tratamiento	Clave	Efectividad (%)	Agrupación Tukey
T <sub>105</sub>	CONTPOS	100	A
T <sub>100</sub>	BFCH2OM	81.95	B
T <sub>97</sub>	BFHH2OM	81.92	B
T <sub>34</sub>	ACREtOHM	77.8	B
T <sub>35</sub>	ACREtOHQ	77.8	B
T <sub>70</sub>	ACRH2OM	76.8	B
T <sub>71</sub>	ACRH2OQ	75	B
T <sub>103</sub>	CONTNEG	0	C

Valores con la misma letra son estadísticamente iguales de acuerdo con la prueba de Tukey (P=0.05) DMS = 0.183.

## Apéndice II

### 2.1 Programa de análisis Probit para conocer la concentración Inhibitoria ( $CI_{50}$ y $CI_{90}$ ) del extracto SRH47

```
Data probit;
Input concentración cresitot porcinihi;
Cards;
1000          100          50
1000          100          50
1000          100          50
1000          100          50
500           100          25
500           100          25
500           100          25
500           100          25
250           100          0
250           100          0
250           100          0
250           100          0
```

```
;
Proc probit log10 inverseci;
Model porcinihi/cresitot=concentración;
run;
```

### 2.2 Programa de análisis Probit para conocer la concentración inhibitoria ( $CI_{50}$ y $CI_{90}$ ) del extracto SRH52.

```
Data probit;
Input concentración cresitot porcinihi;
Cards;
1000          100          50
1000          100          25
1000          100          50
1000          100          25
500           100          0
500           100          0
500           100          0
500           100          0
250           100          0
250           100          0
250           100          0
250           100          0
```

```
;
Proc probit log10 inverseci;
Model porcinihi/cresitot=concentración;
run;
```

**2.3 Programa de análisis Probit para conocer la concentración inhibitoria (CI<sub>50</sub> y CI<sub>90</sub>) del extracto SRH94.**

```
Data probit;
Input concentración cresitot porcinhi;
Cards;
1000          100          50
1000          100          50
1000          100          25
1000          100          25
500           100          50
500           100          50
500           100          25
500           100          25
250           100          0
250           100          0
250           100          25
250           100          0
;
Proc probit log10 inversecI;
Model porcihi/cresitot=concentración;
run;
```

**2.4 Programa de análisis Probit para conocer la concentración inhibitoria (CI<sub>50</sub> y CI<sub>90</sub>) del extracto ACREtOH.**

```
Data probit;
Input concentración cresitot porcinhi;
Cards;
1000          100          75
1000          100          75
1000          100          75
1000          100          75
500           100          25
500           100          50
500           100          50
500           100          50
250           100          0
250           100          25
250           100          25
250           100          25
;
Proc probit log10 inversecI;
Model porcihi/cresitot=concentración;
run;
```

### Apéndice III

3.1 Programa para analizar el Área Bajo la Curva del Progreso de la Enfermedad (ABCPE), para determinar el efecto de los extractos vegetales sobre la severidad de la enfermedad causada por *Alternaria chrysanthemi*.

Data abcpe;

Input trat rep eva tiempo y;

Cards;

1	1	0	0
1	2	0	0
1	3	0	0
.	.	.	.
.	.	.	.
1	4	56	7.238
2	1	0	0
2	2	0	0
2	3	0	0
.	.	.	.
.	.	.	.
2	4	56	5.541
3	1	0	0
3	2	0	0
3	3	0	0
.	.	.	.
.	.	.	.
3	4	56	17.064
4	1	0	0
4	2	0	0
4	3	0	0
.	.	.	.
.	.	.	.
4	4	56	7.177

;

proc print;

proc sort; by trat rep eva;

data abcpe; set abcpe;

segarea=((y+lag(y))/2)\*(tiem-lag(tiem));

if tiempo=15 then segarea=.;

proc sort; by trat rep eva;

proc print;

proc summary data= abcpe nway;

class trat rep eva; var segarea;

output out=totarea sum (segarea)=totarea;

run;

proc anova;

class trat rep eva;

model totarea=trat rep eva;

means trat/tukey Duncan snk;

run;

## Apéndice IV

### 4.1 Programa de $Y_{final}$ de *Alternaria chrysanthemi* en el cultivo de crisantemo.

```

Data yfin;
Input trat rep yfin;
y1= yfin/100;
y= sqrt (y1);
yf= arsin (y);
cards;
1 1 5.236
1 2 5.452
.
.
2 1 4.746
2 2 4.773
.
.
3 1 13.315
3 2 14.083
.
.
4 1 6.272
4 2 6.460
.
;
proc print;
proc glm;
class trat rep;
model yfin=trat;
means trat/tukey snk duncan;
run;

```

## Apéndice V

**Tabla 12A.** Análisis de varianza de la severidad inicial

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	Fc.	Pr>F
Tratamiento	3	0.731	0.244	5.02	0.017
Error	12	0.583	0.049		
Total	15	1.313			

C.V.= 7.068 R<sup>2</sup>= 0.556 X= 3.118

**Tabla 13A.** Análisis de varianza de la severidad a los ocho días después de la primera aplicación.

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	Fc.	Pr>F
Tratamiento	3	4.911	1.637	10.17	<0.001
Error	12	1.932	0.161		
Total	15	6.844			

C.V.= 12.072 R<sup>2</sup>= 0.718 X= 3.324

**Tabla 14A.** Análisis de varianza de la severidad a los 32 días después de la primera aplicación.

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	Fc.	Pr>F
Tratamiento	3	64.856	21.618	256.26	<0.0001
Error	12	1.012	0.084		
Total	15	65.867			

C.V.= 5.461 R<sup>2</sup>= 0.985 X= 5.319

**Tabla 15A.** Análisis de varianza de la severidad final

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	Fc.	Pr>F
Tratamiento	3	252.273	84.091	86.78	<0.0001
Error	12	11.629	0.969		
Total	15	263.902			

C.V.= 12.035 R<sup>2</sup>= 0.956 X= 8.179

**Tabla 16A.** Análisis de varianza de la efectividad a los ocho días después de la primera aplicación

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	Fc.	Pr>F
Tratamiento	3	0.830	0.277	19.44	< 0.0001
Error	12	0.171	0.014		
Total	15	1.000			

C.V.= 30.518 R<sup>2</sup>= 0.829 X= 0.391

**Tabla 17A.** Análisis de varianza de la efectividad a los 32 días después de la primera aplicación

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	Fc.	Pr>F
Tratamiento	3	2.693	0.898	105.54	<0.0001
Error	12	0.102	0.009		
Total	15	2.795			

C.V.= 13.027 R<sup>2</sup>= 0.963 X= 0.708

**Tabla 18A.** Análisis de varianza de la efectividad a los 48 días después de la primera aplicación

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	Fc.	Pr>F
Tratamiento	3	2.857	0.952	478.45	<0.0001
Error	12	0.024	0.002		
Total	15	2.881			

C.V.= 6.167 R<sup>2</sup>= 0.992 X= 0.723

**Tabla 19A.** Análisis de varianza del número de botones.

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	Fc.	Pr>F
Tratamiento	3	0.005	0.002	1.15	0.367
Error	12	0.019	0.002		
Total	15	0.025			

C.V.= 9.42 R<sup>2</sup>= 0.224 X= 0.423 DMS= 0.084

**Tabla 20A.** Análisis de varianza del diámetro del racimo.

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	Fc.	Pr>F
Tratamiento	3	0.002	.0007	1.53	0.2483
Error	12	0.006	0.0005		
Total	15	0.008			

C.V.= 5.585 R<sup>2</sup>= 0.276 = 0.384 DMS= 0.0451



**CICY**

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A.C.**