

Aqueous extracts from *Acalypha gaumeri* and *Bonellia flammea* for leaf blight control in chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium*)

Extractos acuosos de *Acalypha gaumeri* y *Bonellia flammea* para el control del tizón foliar en crisantemo (*Chrysanthemum morifolium*)

Arely Anayansi Vargas-Díaz, Laboratorio de Bioprocesos, CONACYT–Colegio de Postgraduados, Campus Campeche, Carretera Federal Haultunchén-Edzna km 17.5. Sihochac, Champotón, Campeche, CP 24450, México; Jairo Cristóbal-Alejo*, Instituto Tecnológico de Conkal. Conkal, Yucatán, México, km 16.3 antigua carretera Mérida-Motul. Conkal, Yucatán, CP 97345, México; Blondy Canto-Canché, María Marcela Gamboa-Angulo, Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., Calle 43 No. 130 x 30 y 32, col. Chuburná de Hidalgo, Mérida, Yucatán, CP 97205, México. *Corresponding author: jairoca54@hotmail.com

Received: September 13, 2021.

Accepted: December 20, 2021.

Vargas-Díaz AA, Cristóbal-Alejo J, Canto-Canché B and Gamboa-Angulo MM. 2022. Aqueous extracts from *Acalypha gaumeri* and *Bonellia flammea* for leaf blight control in chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium*). Mexican Journal of Phytopathology 40(1): 40-58.

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2109-1>

First DOI publication: December 27, 2021.

Primera publicación DOI: 27 de Diciembre, 2021.

Abstract. The chrysanthemum is the second most important cut flower in the world, however, its quality and commercial value is affected by the leaf blight produced by *Alternaria* spp. The objective of this work was to evaluate the causal agent of leaf blight in Chrysanthemum, and its control with aqueous extracts of *Acalypha*

Resumen. El crisantemo es la segunda flor de corte más importante en el mundo, sin embargo, su calidad y valor comercial es afectado por el tizón foliar causado por *Alternaria* spp. El objetivo del presente trabajo consistió en identificar el agente causal del tizón foliar en crisantemo y su control con extractos acuosos de *Acalypha gaumeri* y *Bonellia flammea* en campo. Se realizó la colecta e identificación del hongo a partir de hojas y tallos de plantas de crisantemo. Posteriormente, se hizo la identificación molecular y prueba de patogenicidad en plantas de crisantemo. En campo, se evaluaron los tratamientos con aplicaciones semanales de: T1: extracto de corteza de *B. flammea*, T2: extracto de raíz de *A. gaumeri*, T3: control negativo (agua) y T4: fungicida Captan®. Previamente a la aplicación de los tratamientos, se inocularon las plantas del hongo aislado (2.5×10^6 esporas

gaumeri and *Bonellia flammea*. The fungus was collected and identified from leaves and stems of chrysanthemum plants. Subsequently, molecular identification and pathogenicity tests were performed on chrysanthemum plants. In the field, treatments were evaluated with weekly applications of: T1: *B. flammea* bark extract, T2: *A. gaumeri* root extract, T3: negative control (water) and T4: Captan® fungicide. Prior to the application of the treatments, plants were inoculated with the isolated fungus (2.5×10^6 spores mL⁻¹) and severity was evaluated. *Alternaria chrysanthemi* was identified as the causal agent. Based on the severity percentage, the lowest averages of the area under the disease progress curve, the lowest rates of apparent infection, the lowest intensity of the disease and the greater effectiveness in controlling the disease were observed for T2 (165, 0.017, 8 and 67%, respectively) followed by T1 (186, 0.022, 13 y 50 %, respectively) and T4 (179, 0.023, 14 y 45%, respectively), observing a significantly different than negative control T3 (369, 0.025, 25 and 0%, respectively). Plant extracts have potential to be used as an alternative in the management of *Alternaria* leaf blight in chrysanthemum.

Key words: Pathosystem, disease, plants extract, *Alternaria chrysanthemi*.

The ornamental plant industry is growing every year (Silva *et al.*, 2018), although the environmental and technological influences of intensive production make the production of diseases-free plants difficult. Due to this, establishing efficient strategies to prevent and manage ornamental plant diseases is imperative (Barrera-Necha and Bautista-Baños, 2016). The chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium*) is one of the most important ornamental crops in the

mL⁻¹) y se evaluó severidad. *Alternaria chrysanthemi* se identificó como el agente causal del tizón foliar. Con base en el porcentaje de severidad, se observaron los menores promedios del área bajo la curva del progreso de la enfermedad, tasas de infección aparente, severidad final y mayor efectividad para controlar la enfermedad con el T2 (165, 0.017, 8 y 67%, respectivamente), seguido por T1 (186, 0.022, 13 y 50%, respectivamente) y T4 (179, 0.023, 14 y 45%), observando diferencia con respecto a T3 (369, 0.025, 25 y 0%, respectivamente). Los extractos evaluados presentan potencial para usarse como alternativa de manejo del tizón foliar de *Alternaria* en crisantemo.

Palabras clave: Patosistema, enfermedad, extractos vegetales, *Alternaria chrysanthemi*.

La industria de plantas ornamentales cada año va en aumento (Silva *et al.*, 2018), sin embargo, las influencias ambientales y tecnológicas de producción intensiva dificultan la producción de plantas libres de enfermedades. Por tal razón, es prioritario establecer estrategias eficaces para la prevención y manejo de enfermedades en plantas ornamentales (Barrera-Necha y Bautista-Baños, 2016). El crisantemo (*Chrysanthemum morifolium*) es uno de los cultivos ornamentales de mayor importancia en la producción de flores en el mundo (Anderson, 2007; Kumar *et al.*, 2011; Olejnik *et al.*, 2021). Esta planta es originaria de Asia Oriental y se adapta a diversos climas (Villanueva-Couoh *et al.*, 2005). En México, se registró una superficie de 3,203 ha, con un valor de producción 1,915,691.00 de pesos (SIAP, 2020).

El crisantemo es susceptible a varios patógenos especialmente cuando se cultiva a gran escala. El tizón foliar causado por *Alternaria* spp. es una de las principales enfermedades que afectan su cultivo

production of flowers globally (Anderson, 2007; Kumar *et al.*, 2011; Olejnik *et al.*, 2021). This plant is originally from eastern Asia and it adapts to diverse climates (Villanueva-Couoh *et al.*, 2005). Its surface registered in Mexico was 3,203 ha, with a production worth 1,915,691 pesos (SIAP, 2020).

The chrysanthemum is susceptible to several pathogens, particularly when grown on a large scale. The leaf blight caused by *Alternaria* spp. is one of the main diseases that affect its production (Xu *et al.*, 2010). Several *Alternaria* species are responsible for this disease, including *Alternaria alternata*, *A. tenuissima* and *A. chrysanthemi*, which can infect plants individually or in interactions, reducing its quality and value in the market (Domínguez-Serrano *et al.*, 2016; Trolinger *et al.*, 2018; Xu *et al.*, 2010). Symptoms appear on the edges of the leaves with yellow, maroon to blackish lesions and the presence, in some cases, of chlorotic halos. The progress of the disease is visible with the necrotic areas of variable sizes that can cause the defoliation of the plant. When the disease is severe, the flower petals display reddish-maroon lesions, which then become completely necrotic (Borah *et al.*, 2019; Domínguez-Serrano *et al.*, 2016; Trolinger *et al.*, 2018). Without an adequate control, it can lead to the death of the plant (Deng *et al.*, 2012; Xu *et al.*, 2010; Zhu *et al.*, 2014).

The main control strategy against leaf blight is using synthetic fungicides (Kumar *et al.*, 2017; Trolinger *et al.*, 2018; Villanueva-Couoh *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2010). However, the recurring and inadequate use of these products has caused problems of resistance in fungal strains, environmental pollution and intoxications in producers (Carvalho, 2017; Kim *et al.*, 2017; Barrera-Necha y Bautista-Baños, 2016; Shuping and Eloff, 2017). This situation demands an exploration of biorational alternatives to control the disease. Among these are natural compounds such as chitosan, essential oils

(Xu *et al.*, 2010). Varias especies de *Alternaria* son las responsables de esta enfermedad, entre ellas *Alternaria alternata*, *A. tenuissima* y *A. chrysanthemi*, las cuales pueden infectar de manera individual o en interacción, lo que reducen la calidad y el valor en el mercado (Domínguez-Serrano *et al.*, 2016; Trolinger *et al.*, 2018; Xu *et al.*, 2010). Los síntomas aparecen en los bordes de las hojas con lesiones de color amarillo, marrón a negruzco y la presencia en algunos casos de halos cloróticos. El progreso de la enfermedad se observa por las zonas necróticas de tamaño variable que pueden causar defoliación de la planta. Cuando la enfermedad es severa, los pétalos florales presentan lesiones de color marrón rojizo los que se tornan totalmente necróticos (Borah *et al.*, 2019; Domínguez-Serrano *et al.*, 2016; Trolinger *et al.*, 2018). Si no existe un control adecuado, puede causar la muerte de la planta (Deng *et al.*, 2012; Xu *et al.*, 2010; Zhu *et al.*, 2014).

La principal estrategia de control del tizón foliar es con el uso de fungicidas sintéticos (Kumar *et al.*, 2017; Trolinger *et al.*, 2018; Villanueva-Couoh *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2010). Sin embargo, el uso recurrente e inadecuado de estos productos han causado problemas de resistencia en cepas de hongos, contaminación ambiental e intoxicaciones en los productores (Carvalho, 2017; Kim *et al.*, 2017; Barrera-Necha y Bautista-Baños, 2016; Shuping y Eloff, 2017). Esta situación exige explorar alternativas biorracionales para el control de la enfermedad. Entre éstas, se encuentran los compuestos naturales, como el quitosano, los aceites esenciales y los extractos de plantas (Barrera-Necha y Bautista-Baños, 2016). Estos últimos, han mostrado potencial para el control de hongos fitopatógenos, debido a su alta efectividad, bajo costo y baja toxicidad sobre organismos benéficos (Breda *et al.*, 2016; Ngegba *et al.*, 2018; Tomazoni *et al.*, 2017). No obstante, existen pocos estudios sobre el uso

and plant extracts (Barrera-Necha and Bautista-Baños, 2016). The latter have proven to have the potential to control phytopathogenic fungi due to their high effectiveness, low cost and low toxicity on beneficial organisms (Breda *et al.*, 2016; Ngegba *et al.*, 2018; Tomazoni *et al.*, 2017). However, there are few studies on the use of plant extracts to control diseases in ornamental plants (Barrera-Necha and Bautista-Baños, 2016). Under *in vitro* conditions, Nivedha *et al.* (2019) evaluated 24 plant extracts for the control of *A. alternata* in *Jasminum grandiflorum*. The *Allium sativum*, *Datura metel* and *Azadirachta indica* extracts presented the highest fungicidal activities, with inhibitions in the fungal mycelial growth of 100, 68 and 59%, respectively. There are also reports of *Capsicum annuum*, *Helianthus annuus* and *Tagetes erecta* aqueous extracts (in concentrations of 4-8%), effective against *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli*, with mycelial inhibition ranges of 45-57%, 33-85 and 54-79%, respectively (Riaz *et al.*, 2008).

Acalypha gaumeri and *Bonellia flammea* are native plants of the Yucatan Peninsula that have displayed antifungal effects against *A. alternata*, *A. chrysanthemi*, *Curvularia verruculosa*, *C. lunata*, *Corynespora cassiicola*, *Bipolaris setariae*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Exserohilum rostratum*, *F. oxysporum*, *Helminthosporium* sp. and *Lasiodiplodia parva* (García-Sosa *et al.*, 2011; Gamboa-Angulo *et al.*, 2008; Moo-Koh *et al.*, 2014; Vargas-Díaz *et al.*, 2014). In a previous *in vitro* study, the aqueous extracts of the root of *A. gaumeri* and the cortex of *B. flammea* had an inhibiting effect on mycelial growth (ICM) and sporulation (IS) of *A. chrysanthemi* (ICM = 51 – 57%, IS = 77 – 82%, respectively) (Vargas-Díaz *et al.*, 2014).

The inhibition of phytopathogenic fungi using plant extracts is well documented at a laboratory

de extractos vegetales para el control de enfermedades de plantas en ornamentales (Barrera-Necha y Bautista-Baños, 2016). En condiciones *in vitro* Nivedha *et al.* (2019) evaluaron 24 extractos de plantas para el control de *A. alternata* en *Jasminum grandiflorum*; los extractos de *Allium sativum*, *Datura metel* y *Azadirachta indica* presentaron las mayores actividades fungicidas, con inhibiciones en el crecimiento micelial del hongo en un 100, 68 y 59%, respectivamente. También hay reportes con extractos acuosos de *Capsicum annuum*, *Helianthus annuus* y *Tagetes erecta* (en concentraciones de 4-8%) efectivos contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli*, con rangos de inhibición micelial de 45-57%, 33-85 y 54-79%, en su orden (Riaz *et al.*, 2008).

Acalypha gaumeri y *Bonellia flammea* son plantas endémicas de la Península de Yucatán que han mostraron efectos antifúngicos contra *A. alternata*, *A. chrysanthemi*, *Curvularia verruculosa*, *C. lunata*, *Corynespora cassiicola*, *Bipolaris setariae*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Exserohilum rostratum*, *F. oxysporum*, *Helminthosporium* sp. y *Lasiodiplodia parva* (García-Sosa *et al.*, 2011; Gamboa-Angulo *et al.*, 2008; Moo-Koh *et al.*, 2014; Vargas-Díaz *et al.*, 2014). En estudio previo *in vitro* los extractos acuosos de la raíz de *A. gaumeri* y la corteza de *B. flammea* tuvieron un efecto inhibitorio sobre el crecimiento micelial (ICM) y la esporulación (IS) de *A. chrysanthemi* (ICM = 51 – 57%, IS = 77 – 82%, respectivamente) (Vargas-Díaz *et al.*, 2014).

La inhibición de hongos fitopatógenos mediante el empleo de extractos de origen vegetal está bien documentada a nivel laboratorio, sin embargo, los estudios para determinar su eficacia en campo son escasos (Castillo-Reyes *et al.*, 2018). Por otro lado, se ha documentado que los extractos acuosos son ambientalmente más seguros y fácil para utilizarse en campo en comparación con otros métodos de

level, although the studies to determine their efficacy in the field are scarce (Castillo-Reyes *et al.*, 2018). On the other hand, aqueous extracts have been documented to be safer and easier to use in the field than other extraction methods using solvents. Despite the species of *A. gaumeri* and *B. flammea* presenting inhibiting effects against phytopathogenic fungi, they lack field studies to control diseases in plants. Based on this, the aim of this study was to identify the causal agent of leaf blight in chrysanthemum and to control it in the field using *Acalypha gaumeri* and *Bonellia flammea* aqueous extracts.

MATERIALS AND METHODS

Isolation and characterization of the phytopathogen that causes leaf blight. *Alternaria* sp. was isolated from chrysanthemum leaves and stems with signs and symptoms related to foliar blight. The samples were collected in the “Nicté-Ha” Floricultural Unit, in the municipal area of Chocholá, Yucatan, Mexico (20°41' N and 89°49' W). Cuts sized approximately 1 cm² were made on the infected material, which were then disinfested in a 2% sodium hypochlorite solution for 2 min. Four to five pieces of plant tissue were placed in Petri dishes with potato-dextrose-agar medium (PDA) and incubated at 28 °C (Villanueva-Couoh *et al.*, 2005). After three days, the fungus was purified using monosporic cultures. To achieve the sporulation of the fungus, the malt extract agar medium was used, and from these, the fungus was identified by morpho-taxonomic characteristics that included color and type of mycelium, number of conidia and conidiophore (Barnett and Hunter, 1972; Simmons, 2007), measurement of the length and width of 100 conidia using a compound microscope (Standard Model K7) and at a 400x magnification.

extracción con disolventes. A pesar de que las especies de *A. gaumeri* y *B. flammea* presentan efectos inhibitorios contra hongos fitopatógenos, carecen de estudios en campo para controlar enfermedades en plantas. Con base a lo anterior, el objetivo del presente trabajo consistió en identificar el agente causal del tizón foliar en crisantemo y su control en campo con extractos acuosos de *Acalypha gaumeri* y *Bonellia flammea*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento y caracterización del fitopatógeno causante del tizón foliar. El aislamiento de *Alternaria* sp. se realizó a partir de hojas y tallos de plantas de crisantemo con signos y síntomas asociados al tizón foliar. Las muestras fueron colectadas en la Unidad Florícola “Nicté-Ha”, en el municipio de Chocholá, Yucatán, México (20° 41' N y 89° 49' W). A partir de material infectado se hicieron cortes de aproximadamente un cm² y se desinfectaron en una solución de hipoclorito de sodio al 2% durante 2 min. Se depositaron de cuatro a cinco piezas de tejido vegetal en cajas Petri con medio agar dextrosa y papa (PDA) y se incubaron a 28 °C (Villanueva-Couoh *et al.*, 2005). Después de tres días, el hongo se purificó mediante cultivos monospóricos. Para lograr la esporulación del hongo se utilizó el medio agar extracto de malta y a partir de éstos, se realizó la identificación del hongo mediante características morfotaxonómicas que incluyeron: color y tipo de micelio, número de conidios y conidióforos (Barnett y Hunter, 1972; Simmons, 2007), medición del ancho y largo de 100 conidios con microscopio compuesto (Estándar Modelo K7) y en aumento 400x.

Asimismo, se corroboró con la identificación molecular del fitopatógeno. Para estos propósitos, se registró la cepa del hongo como CICY004 y se cultivó en medio papa-dextrosa-agar (PDA) en placas

Likewise, it was corroborated with the molecular identification of the phytopathogen. For this purpose, the fungal strain was registered as CICY004 and it was cultivated in PDA medium in Petri dishes and incubated at 25 °C and 12 h of light/ 12 h of darkness for four days. The genomic DNA was extracted following the procedure by Johanson and Jeger (1993). The reaction mixture (1X) contained 100 ng of gDNA, 2 mM MgCl₂, 200 mM dNTPS, 0.4 mM of every first ITS1 and TS4 (White *et al.*, 1990), and 1U of Taq polymerase, in a total volume of 25 mL. The PCR reaction was carried out with an initial denaturalization of 95 °C for 3 min and 30 cycles with 1 min at 95 °C, 45 s at 53 °C and 30 s at 72 °C. After the cycles, an elongation phase took place, lasting 3 min at 72 °C.

The PCR products were analyzed by electrophoresis in agarose gel at 1% (Invitrogen®). The amplified products were purified with a PCR purification kit (Gene Clean II, Roche) and were later sequenced in the Sequencing Center in Davis, CA (<http://www.davissequencing.com>) using 100 ng of the PCR product. Both DNA stands were sequenced, using oligo ITS1 for the sense strand and oligo ITS4 for the antisense strand.

The sequences obtained were edited using the program BioEdit Sequence Alignment (Hall, 1999) to eliminate the sequences corresponding to the primers and the inadequately sequenced regions (noise with Ns). Once edited, the antisense sequence became a sense sequence with the use of the Reverse Complement tool (https://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html). In both sequences, they were aligned using the program ClustalW (Madeira *et al.*, 2019) to obtain a consensus sequence in which each base was confirmed by both strands; a consensus sequences with 533 nucleotides was obtained, and it was compared with the database of the NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) and the RDP “Ribosomal Database Project” ([https://](https://rdp.cme.msu.edu/classifier/classifier.jsp)

de Petri e incubadas a 25 °C y 12 h de luz/ 12 h de oscuridad durante cuatro días. El ADN genómico se extrajo de acuerdo a Johanson y Jeger (1993). La mezcla de reacción (1X) contenía 100 ng de ADNg, 2 mM MgCl₂, 200 mM dNTPS, 0.4 mM de cada primer ITS1 e TS4 (White *et al.*, 1990) y 1U de Taq polimerasa, en un volumen total de 25 mL. La reacción de PCR se llevó a cabo con una desnaturalización inicial de 95 °C durante 3 min, y 30 ciclos con 1 min a 95 °C, 45 s a 53 °C y 30 s a 72 °C. Después de los ciclos, se dio una etapa de elongación de 3 min a 72 °C.

Los productos de PCR se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (Invitrogen®). Los productos amplificados fueron purificados con un kit de purificación de PCR (Gene Clean II, Roche) y posteriormente fueron secuenciados en el Instituto de secuenciación de Davis, CA (<http://www.davissequencing.com>) usando 100 ng del producto de PCR. Se secuenciaron ambas hebras de ADN, usando el oligo ITS1 para la hebra sentido y el oligo ITS4 para la hebra antisentido.

Las secuencias obtenidas se editaron con el programa BioEdit Sequence Alignment (Hall, 1999) para eliminar las secuencias correspondientes a los iniciadores y las regiones mal secuenciadas (ruido con Ns). Una vez editadas, la secuencia antisentido se convirtió en sentido con la herramienta Reverse Complement (https://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html), en ambas secuencias se alinearon con el programa ClustalW (Madeira *et al.*, 2019), para obtener una secuencia consenso en la cual cada base fue confirmada por ambas hebras; se obtuvo una secuencia consenso de 533 nucleótidos y se comparó con las bases de datos del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) y RDP “Ribosomal Database Project” (<https://rdp.cme.msu.edu/classifier/classifier.jsp>) con el algoritmo BLAST. La secuencia de 533 nucleótidos se depositó en el GenBank con el número de accesión MH846127.

rdp.cme.msu.edu/classifier/classifier.jsp) using the BLAST algorithm. The 533-nucleotide sequence was deposited in the GenBank with accession number MH846127.

A BLASTN analysis was carried out with sequence MH846127 and one accession of each species was chosen among the first 100 comparisons that were homologous with sequence MH846127. Additionally, accession MN153803 from strain HN4-9 of *A. eichhorniae* was included, since it was not among the first 100 counterparts. The analysis was carried out with the program MEGA X using the Maximum Likelihood method (Tamura and Nei, 1993).

The pathogenicity of strain CICY004 was determined in 15 healthy chrysanthemum plants under protected conditions. The plants were superficially cut in the axial part of the leaves with a paintbrush and 20 μL of a suspension of 2.5×10^6 spores mL^{-1} were inoculated. The plants were placed in separate plastic containers, which were covered to regulate the temperature and moisture for 2 days. After five days, the pathogen was reisolated from the necrotic lesions on the leaves (Riego *et al.*, 1997).

Preparation of the aqueous extracts. The aqueous extract of the dehydrated plant material of *A. gaumeri* roots and the cortex of *B. flammea* (30 g of each) was obtained by infusion (20 min) in 500 mL of distilled water at boiling point (Herrera-Parra *et al.*, 2009). The infusion was filtered through paper and diluted up to 1000 mL to obtain the aqueous extract at 3% (30 g L^{-1} , p/v) (Vargas-Díaz *et al.*, 2014). The extract was stored at room temperature (less than 24 h) until its application on the field.

Evaluation of extracts in the control of the disease. To ensure the presence of the pathogen in the crop in the field, strain CICY004 was grown for 15 days in

Se realizó un análisis BLASTN con la secuencia MH846127, y se seleccionó una accesión de cada especie entre los primeros 100 comparaciones que tuvieron homología con la secuencia MH846127; adicionalmente se incluyó la accesión MN153803 de la cepa HN4-9 de *A. eichhorniae* ya que no estuvo entre los primeros 100 homólogos. El análisis se realizó con el programa MEGA X mediante el método Maximum Likelihood (Tamura y Nei, 1993).

La patogenicidad de la cepa CICY004 se determinó en 15 plantas sanas de crisantemo en condiciones protegidas. Las plantas fueron laceradas superficialmente en la parte axial de las hojas con un pincel y se inocularon 20 μL de una suspensión de 2.5×10^6 esporas mL^{-1} . Las plantas se colocaron en contenedores de plástico por separado y se cubrieron para regular la temperatura y la humedad durante dos días. Después de cinco días, a partir de las lesiones necróticas en las hojas se reisoló el patógeno (Riego *et al.*, 1997).

Preparación de los extractos acuosos. El extracto acuoso del material vegetal deshidratado de raíz de *A. gaumeri* y la corteza de *B. flammea* (30 g de cada uno) se obtuvo mediante infusión (20 min) en 500 mL de agua destilada a punto de ebullición (Herrera-Parra *et al.*, 2009). La infusión se filtró a través de papel y se aforó a 1000 mL para obtener el extracto acuoso al 3% (30 g L^{-1} , p/v) (Vargas-Díaz *et al.*, 2014). El extracto se almacenó a temperatura ambiente (menos de 24 h) hasta su aplicación en campo.

Evaluación de extractos en el control de la enfermedad. Para asegurar la presencia del patógeno en el cultivo en campo, la cepa CICY004 se creció por 15 días en medio PDA a 23 °C. A partir de este cultivo, se realizó una suspensión de 2.5×10^6 esporas mL^{-1} (Vargas-Díaz *et al.*, 2014). El cul-

PDA medium at 23 °C. From this crop, a suspension of 2.5×10^6 spores mL^{-1} was made (Vargas-Díaz *et al.*, 2014). The crop was established in the months between March and May, in the Unit Limones Cheé in the Ulu'umil lool floricultural area, in the municipal area of Maní, Yucatan, Mexico (20°39' N and 89°40' W). *C. morifolium* cv. Polaris Yellow trimmings, aged 20 days, were used. These were provided by the "Nicté-Ha" Floricultural Unit in the municipal area of Chocholá, Yucatan, Mexico. The trimmings were transplanted in beds, 1m wide \times 12m long, and a local mixture of soil, organic bovine manure and gravel was used as a substrate in a 2:2:1 proportion. The experimental design was a completely randomized block design, with four repetitions per treatment; for each repetition, plots measuring 1m \times 2.5 m were used. When the plants reached a height of 30 cm, each experimental plot was inoculated with a suspension of 2.5×10^6 spores mL^{-1} of the fungal strain indicated. After eight days of inoculation, the plants were sprayed on a weekly basis with the treatments for seven weeks. The evaluated treatments were T1: aqueous extract of the cortex of *B. flammea* (30 g L^{-1}), T2: aqueous extract of the root of *A. gaumeri* (30 g L^{-1}), alongside two controls, T3: negative control (water) and T4: Captan commercial fungicide (2 g L^{-1}).

The disease was controlled by estimating its severity, with the use of a diagramatic logarithmic scale of severity for the *C. morifolium*-*A. chrysanthemi* pathosystem (Villanueva-Couoh *et al.*, 2005). Measurements began when observing the symptoms of the disease (eight days after inoculation with the phytopathogen) and continued every week with random sampling, and in each repetition, a total of 20 central plants, out of which 30 base leaves of each plant were considered. Based on the percentage of severity, disease progress curves were built and the Area

tivo se estableció en los meses de marzo a mayo, en la Unidad Limones Cheé en el área Florícola Ulu'umil lool, en el municipio de Maní, Yucatán, México (20°39' N y 89°40' W), se utilizaron esquejes de *C. morifolium* cv. Polaris Yellow con 20 días de edad; éstos fueron proporcionados por la Unidad Florícola "Nicté-Ha" del municipio de Chocholá, Yucatán, México. Los esquejes se trasplantaron en camas de 1 m de ancho \times 12 m de largo, y como sustrato se utilizó una mezcla local de suelo, abono orgánico de bovinaza y grava en proporción 2:2:1. El diseño experimental fue bloques completamente al azar, con cuatro repeticiones por tratamiento; para cada repetición se utilizaron parcelas de 1 m por 2.5 m. Cuando las plantas alcanzaron una altura de 30 cm, cada parcela experimental fue inoculada con una suspensión de 2.5×10^6 esporas mL^{-1} de la cepa fúngica indicada. Después de ocho días de la inoculación, las plantas se asperjaron semanalmente con los tratamientos, durante siete semanas. Los tratamientos evaluados fueron T1: extracto acuoso de la corteza de *B. flammea* (30 g L^{-1}), T2: extracto acuoso de la raíz de *A. gaumeri* (30 g L^{-1}), paralelamente dos testigos, T3: Control negativo (agua) y T4: fungicida comercial Captan (2 g L^{-1}).

El control de la enfermedad se realizó con la estimación de la severidad de la enfermedad, con el uso de una escala logarítmica diagramática de severidad para el patosistema *C. morifolium*-*A. chrysanthemi* (Villanueva-Couoh *et al.*, 2005). Las mediciones se iniciaron al observarse los síntomas de la enfermedad (ocho días después de la inoculación con el fitopatógeno) y se continuaron semanalmente con muestreos al azar, y en cada repetición, un total de 20 plantas centrales, de las cuales se consideraron 30 hojas basales de cada planta. Con base en el porcentaje de severidad, se construyeron curvas del progreso de la enfermedad y se estimó el Área Bajo la Curva del Progreso de la Enfermedad (ABCPE), mediante el método de integración

Under the Disease Progress Curve (AUDPC) was estimated using the trapezoidal integration method (Campbell and Madden, 1990), apparent infection rates with Weibull's description model, with the reverse parameter b^{-1} (Thal *et al.*, 1984) and the final severity of the disease (Y_{final}) with the final evaluation, and which was used to calculate the effectiveness of the control of the disease (Abbott, 1925).

$$\text{Effectiveness} = \frac{\% \text{ severity of the negtive control} - \% \text{ treatment severity}}{\% \text{ severity of the negtive control}} \times 100$$

In addition, as growth variables, the number of buttons and the diameter of a bunch were recorded in 20 central plants. The experiment was carried out twice more and the results were averaged for their statistical analyses. The general management of the crop was carried out according to the traditional practices of the farmer. At the end of the experiment, the fungus was isolated to verify the presence of strain CICY004.

Data analysis. The data obtained from the epidemiological parameters, as well as the growth variables, were analyzed using the SAS for Windows version 9 computer package using a one-way analysis of variance and a test of comparison of averages (Tukey, $p \leq 0.01$).

RESULTS

Morphological and molecular identification. The strain of fungus CICY004 in a malt extract medium displayed a velvet-like growth, initially olive-colored on the edges, and later brown. On the back of the Petri dish observed in black color. The conidia displayed an obclavate or cylindrical

trapezoidal (Campbell y Madden, 1990); tasas de infección aparente con el modelo de descripción de Weibull, con el parámetro inverso b^{-1} (Thal *et al.*, 1984) y severidad final de la enfermedad (Y_{final}) con la última evaluación y con la que se calculó la efectividad del control de la enfermedad (Abbott, 1925).

$$\text{Efectividad} = \frac{\% \text{ severidad del control negativo} - \% \text{ severidad del tratamiento}}{\% \text{ severidad del control negativo}} \times 100$$

En adición, como variables de crecimiento se registraron el número de botones y diámetro del racimo en 20 plantas centrales. El experimento se repitió dos veces y los resultados se promediaron para sus análisis estadísticos. El manejo general del cultivo se realizó de acuerdo a las prácticas tradicionales del productor. Al finalizar del experimento se aisló el hongo para verificar la presencia de la cepa CICY004.

Análisis de datos. Los datos obtenidos de los parámetros epidemiológicos, así como las variables de crecimiento, se analizaron con el paquete computacional SAS para Windows versión nueve, mediante un análisis de varianza de una vía y prueba de comparación de medias (Tukey, $p \leq 0.01$).

RESULTADOS

Identificación morfológica y molecular. La cepa del hongo CICY004 en medio extracto de malta mostró un crecimiento aterciopelado, inicialmente de color olivo en los bordes y posteriormente de color café; al reverso de la caja Petri se observó de color negro. Los conidios presentaron forma obclavada o cilíndrica de color oscuro. En su morfometría, con una longitud de 52 a 82 μm por 12.5

shape, with a dark color. In its morphometry, it displays a length of 52 to 82 μm by 12.5 to 15 μm in width, at its widest, with 5 to 9 transversal septa and 0 to 4 longitudinal ones, frequently in chains of twos or on their own (Figure 1). The morphological analysis of strain CICY004 displayed differences with the strains reported by Domínguez-Serrano *et al.* (2016), since it presented larger conidia (52-82 \times 12.5-15 μm) than *A. alternata* (15-35 \times 7.5-12.5 μm) and then *A. tenuissima* (30-67,5 \times 7,5-12,5 μm). Likewise, strain CICY004 presented short chains with one or two conidia, whereas in *A. alternata*, chains presented 10-37 conidia, and in *A. tenuissima*, 5-12 conidia (Barnett and Hunter, 1972; Simmons, 2007). These data confirmed that strain CICY004 is different, and according to the description of the fungus, it corresponded to the species *A. chrysanthemi* (Barnett and Hunter, 1972; Simmons, 2007). The pathogenicity of the strain

a 15 μm de ancho en la parte más ancha. Con 5 a 9 septos trasversales y 0 a 4 longitudinales, solitarios o en cadenas de dos frecuentemente (Figura 1). El análisis morfológico de la cepa CICY004 mostró diferencias con las cepas reportadas por Domínguez-Serrano *et al.* (2016), ya que presentó conidios de mayor tamaño (52-82 \times 12.5-15 μm) que *A. alternata* (15-35 \times 7.5-12.5 μm) y *A. tenuissima* (30-67,5 \times 7,5-12,5 μm). De igual forma, la cepa CICY004 presentó cadenas cortas con uno o dos conidios, mientras en *A. alternata* cadenas de 10-37 conidios y en *A. tenuissima* cadenas de 5-12 conidios (Barnett y Hunter, 1972; Simmons, 2007). Estos datos confirmaron que la cepa CICY004 es diferente y de acuerdo a la descripción del hongo este correspondió a la especie de *A. chrysanthemi* (Barnett y Hunter, 1972; Simmons, 2007). La patogenicidad de la cepa se comprobó al ser inoculado y reaislado en plantas de crisantemo.

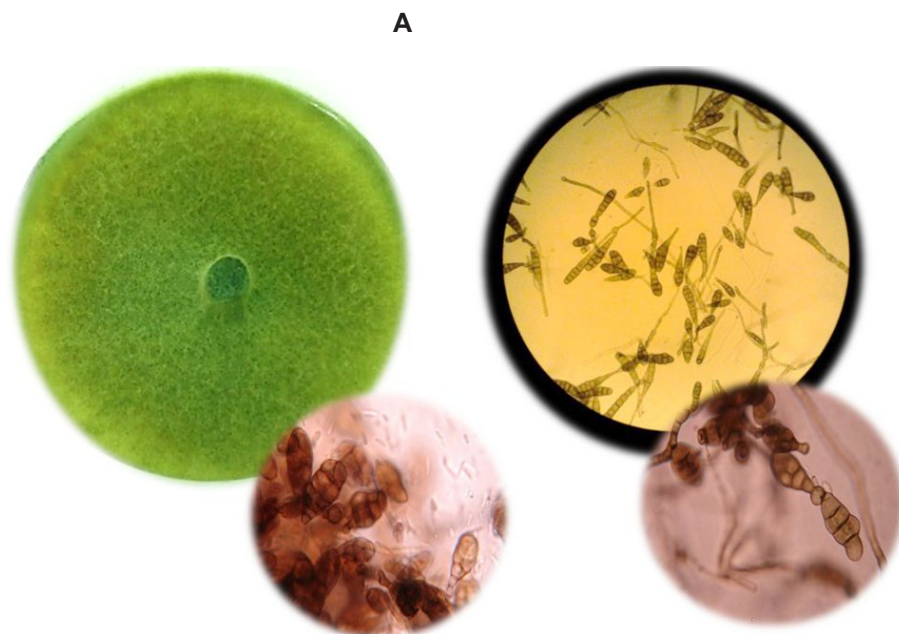


Figure 1. Morphological characteristics of strain CICY004 (*A. chrysanthemi*), A). Morphology of the culture in malt extract agar medium, B) conidia of strain CICY004.

Figura 1. Características morfológicas de la cepa CICY004 (*A. chrysanthemi*), A). Morfología de la colonia en medio agar extracto de malta, B) conidios de la cepa CICY004.

was proven after being inoculated and reisolated in chrysanthemum plants.

In the BLAST analysis of the ITS region of strain CICY004, it was homologous to sequences that correspond with *Alternaria* with a 100% coverage and a 99.81% identity, therefore confirming that it belongs to this genus. To confirm that the strain registered as CICY004 corresponds with some of the species of *Alternaria* previously reported in Mexico (Domínguez-Serrano *et al.*, 2016), the sequence of the ITS region of CICY004 was compared with those strains (*A. alternata* KF728748, KF728750 and *A. tenuissima* KF728749, KF728751), and an identity of 99.62% was found with both species, discarding that CICY004 is one of them. Based on morphological identification and sequence analysis, the strain with record CICY004, was identified as *A. chrysanthemi*. This sequence was deposited in the GenBank as *A. chrysanthemi* CICY004 with accession number MH846127.

Effect of extracts in the field over the control of the disease. The symptoms of leaf blight disease in the crop were presented 37 days after transplanting (dat). In the negative control (water), the progress of the disease was higher than in the rest of the treatments (Figure 2). Based on the AUDPC and Y_{final} , the aqueous extracts of *A. gaumeri* (T2) (165% a day, 8 and 67%, respectively) and cortex of *B. flammea* (T1) (186% a day, 13 and 50%, respectively) reduced the disease severity, with a significant difference with the negative control (T3) (369% a day, 25 and 0%, respectively). Likewise, the application of these extracts was significantly equal to the fungicide Captan® (T4) (179% a day, 14 and 45%, respectively) (Tables 1 and 2). However, when the speed of the diseases was estimated using the infection rate with the Weibull description model (b^{-1}), only the aqueous extract from *A. gaumeri* T2 (0.017 unit day⁻¹) significantly reduced the progress of the disease (Table 1) (Figure 3).

En el análisis BLAST de la región ITS de la cepa CICY004, fue homóloga a secuencias que corresponden con *Alternaria* con 100% de cobertura y 99.81% de identidad, por lo que se confirmó que la cepa pertenece a este género. Para confirmar la cepa con registro CICY004 corresponde con alguna de las especies de *Alternaria* previamente reportadas en México (Domínguez-Serrano *et al.*, 2016), se comparó la secuencia de la región ITS de CICY004 con esas cepas (*A. alternata* KF728748, KF728750 y *A. tenuissima* KF728749, KF728751), se encontró con ambas especies una identidad del 99.62 %, lo que descarta que CICY004 se trate de alguna de ellas.

Con base en la identificación morfológica, y al análisis de la secuencia, la cepa con registro CICY004, se identificó como *A. chrysanthemi*. La secuencia se depositó en el GenBank como *A. chrysanthemi* CICY004 con el número de acceso MH846127.

Efecto de extractos en campo sobre el control de la enfermedad. Los síntomas de la enfermedad del tizón foliar en el cultivo se presentaron a los 37 días después del trasplante (ddt). En el control negativo (agua) el progreso de la enfermedad fue mayor que en el resto de los tratamientos (Figura 2).

Con base al ABCPE y Y_{final} los extractos acuosos *A. gaumeri* (T2) (165% por día, 8 y 67%, respectivamente) y corteza de *B. flammea* (T1) (186% por día, 13 y 50%, respectivamente) redujeron la severidad de la enfermedad, con diferencia significativa con respecto al control negativo (T3) (369% por día, 25 y 0%, en su orden). Asimismo, la aplicación de estos extractos fue significativamente igual al fungicida Captan® (T4) (179% por día, 14 y 45%, respectivamente) (Cuadro 1 y 2). Sin embargo, cuando se estimó la velocidad de la enfermedad mediante la tasa de infección con el modelo de descripción Weibull (b^{-1}), solo el extracto acuoso de *A. gaumeri* T2 (0.017 unidad día⁻¹) redujo significativamente el progreso de la enfermedad (Cuadro 1) (Figura 3).

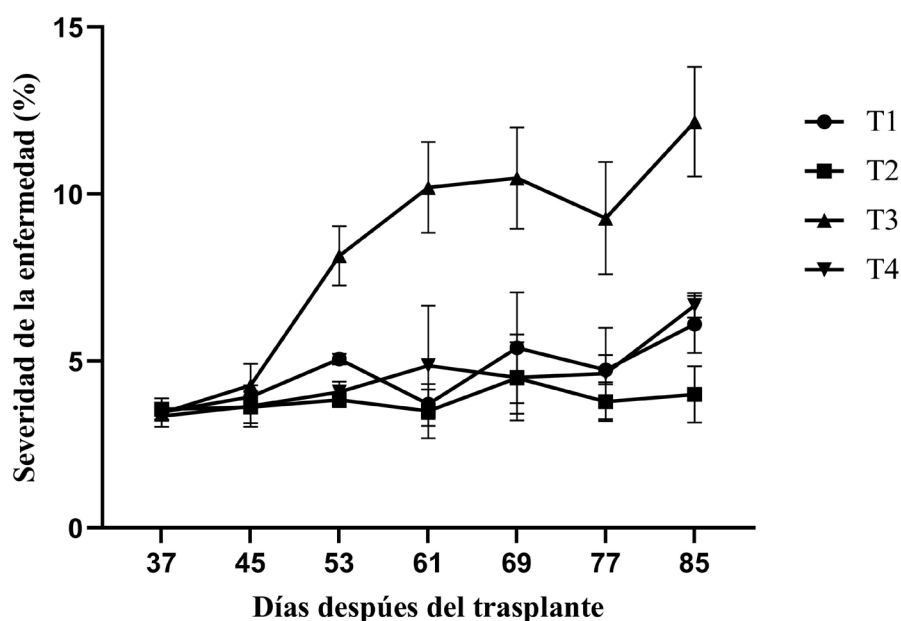


Figure 2. Progress curves of the severity of leaf blight caused by *A. chrysanthemi* on the chrysanthemum crop and effect of the application of treatments T1: Aqueous extract of the cortex of *B. flammea*, T2: Aqueous extract of the root of *A. gaumeri*, T3: Negative control (water) and T4: Captan® fungicide.

Figura 2. Curvas de progreso de la severidad del tizón foliar causado por *A. chrysanthemi* en el cultivo de crisantemo y efecto de la aplicación de tratamientos: T1: Extracto acuoso de la corteza de *B. flammea*, T2: Extracto acuoso de la raíz de *A. gaumeri*, T3: Control negativo (agua) y T4: Fungicida Captan®.

Table 1. Effect of the application of treatments on the epidemiological intensity of leaf blight caused by *A. chrysanthemi* on the chrysanthemum crop.

Cuadro 1. Efecto de la aplicación de tratamientos sobre la intensidad epidemiológica del tizón foliar causado por *A. chrysanthemi* en el cultivo de crisantemo.

Tratamientos	ABCPE (% día ⁻¹)	Tasa de infección aparente (Weibull 1/b % día ⁻¹)	Ajuste del modelo Weibull (r ²)	Y _{final} (%)
T1: Extracto acuoso de corteza de <i>B. flammea</i>	186 b	0.022 a	0.97	13 b
T2: Extracto acuoso de raíz de <i>A. gaumeri</i>	165 b	0.017 b	0.98	8 b
T3: Control negativo (agua)	369 a	0.025 a	0.96	25 a
T4: Fungicida Captan® (2 g L ⁻¹)	179 b	0.023 a	0.96	14 b
DE	12	0.003	-	1.3

Means with the same letter between columns are statistically equal (Tukey, $p \leq 0.05$). DS: Standard Deviation. / Medias con la misma letra entre columnas son estadísticamente iguales (Tukey, $p \leq 0.05$). DS: desviación estándar.

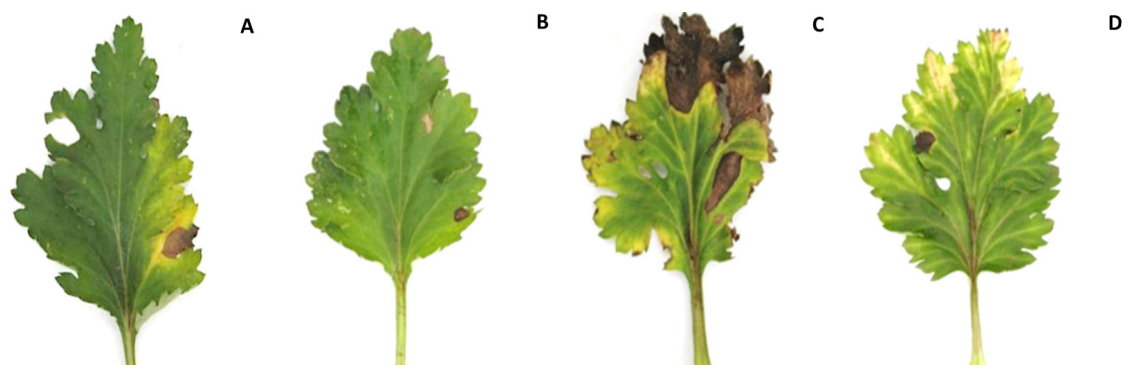


Figure 3. Effect of treatments on the control of leaf blight in chrysanthemum, T1: Aqueous extract of the cortex of *B. flammea*, T2: Aqueous extract of the root of *A. gaumeri*, T3: Negative control (water) and T4: Captan® fungicide.
Figura 3. Efecto de tratamientos en el control del tizón foliar en crisantemo, T1: Extracto acuoso de la corteza de *B. flammea*, T2: Extracto acuoso de la raíz de *A. gaumeri*, T3: Control negativo (agua) y T4: Fungicida Captan®.

In the chrysanthemum crop growth variables: number of buds and bunch diameter, the treatments that included the extracts and the synthetic fungicide significantly improved these variables ($p \leq 0.01$) (Table 2).

En las variables de crecimiento del cultivo evaluadas: número de botones y diámetro del racimo, los tratamientos que incluyeron a los extractos y al fungicida sintético, mejoraron significativamente estas variables ($p \leq 0.01$) (Cuadro 2).

DISCUSSION

The diseases caused by fungi severely affect the chrysanthemum industry (Borah *et al.*, 2019;

DISCUSIÓN

Las enfermedades causadas por hongos afectan severamente la industria del crisantemo (Borah *et*

Table 2. Effectiveness of the aqueous extracts of plants to control leaf blight and growth variables in chrysanthemum.

Cuadro 2. Efectividad de los extractos acuosos vegetales para controlar al tizón foliar y variables de crecimiento en crisantemo.

Tratamientos	Efectividad (%)	Variables Agronómicas	
		Número de Botones (n planta ⁻¹)	Diámetro de racimo (cm)
T1: Extracto acuoso de corteza de <i>B. flammea</i>	50 a ²	18 a	15 a
T2: Extracto acuoso de raíz de <i>A. gaumeri</i>	67 a	17 a	14 a
T3: Control negativo (agua)	0 b	12 b	10 b
T4: Fungicida Captan® (2 g L ⁻¹)	45 a	19.2 a	14 a
DE ³	5.57	2.63	1.44

³DE: standard deviation of the mean. ²Means with the same letter between columns are statistically equal (Tukey, $p \leq 0.05$). / DE: desviación estándar de la media. Medias con la misma letra entre columnas son estadísticamente iguales (Tukey, $p \leq 0.05$).

Trolinger *et al.*, 2018). This study identified *A. chrysanthemi* as the causal agent of leaf blight in the chrysanthemum in Mexico. This species has been reported in chrysanthemum in other countries such as Australia, the United States, the Netherlands and India (Sobers, 1965). In Mexico, Domínguez-Serrano *et al.* (2016) reported the species of *A. alternata* (KF728748, KF728750) and *A. tenuissima* (KF728749, KF728751) as causal agents of blight in chrysanthemum, the morphological and molecular analyses of which do not coincide with the isolated strain in this study. The alignment with the previously reported sequences of *A. alternata* (KF728748, KF728750) and *A. tenuissima* (KF728749, KF728751) present two and three different nucleotides with the strain CICY004. It is important to mention that Domínguez-Serrano *et al.* (2016) found only one difference in the region they studied (540 nucleotides) of the ITS of *A. alternata* and *A. tenuissima*; only one insertion of a “T” nucleotide in the sequence of the second and absent in *A. alternata*, whereas the rest was identical. This difference was accepted as a criterion to distinguish both species, since the authors sequenced each species 5 times and that difference was reproducible.

In this investigation, the differences found between CICY004, *A. alternata* and *A. tenuissima* were also few and accepted, since the sequence of CICY004 corresponds to a consensus sequence, 100% confirmed with the sense and antisense strand sequences. These nucleotide differences are informative and tell CICY004 apart from *A. alternata* and *A. tenuissima*, as well as from *A. eichhorniae*. The morphology revealed that it is *A. chrysanthemi*, making this the first report of the ITS sequence of this phytopathogen, since it did not exist earlier in the GenBank or in the RDP. This study is now a reference for future investigations on *A. chrysanthemi* as the causal agent of leaf blight in chrysanthemum.

al., 2019; Trolinger *et al.*, 2018). En este trabajo se identificó a *A. chrysanthemi* como agente causal del tizón foliar del crisantemo en México. Esta especie se ha reportado en crisantemo en otros países como Australia, EE.UU., Holanda e India (Sobers, 1965). En México, Domínguez-Serrano *et al.* (2016) reportaron a las especies *A. alternata* (KF728748, KF728750) y *A. tenuissima* (KF728749, KF728751) como agentes causales del tizón en crisantemo, cuyos análisis morfológico y molecular no coinciden con la cepa aislada en este estudio. El alineamiento con las secuencias previamente reportadas de *A. alternata* (KF728748, KF728750) y *A. tenuissima* (KF728749, KF728751) presentan dos y tres nucleótidos diferentes con la cepa CICY004. Es importante mencionar que Domínguez-Serrano *et al.* (2016) encontraron una sola diferencia en la región que estudiaron (540 nucleótidos) de los ITS de *A. alternata* y *A. tenuissima*; una sola inserción de un nucleótido “T” en la secuencia de la segunda y ausente en *A. alternata*, mientras lo demás fue idéntico. Esta diferencia fue aceptada como criterio para distinguir ambas especies, ya que los autores secuenciaron 5 veces cada especie y esa diferencia fue reproducible.

En el presente trabajo las diferencias encontradas entre CICY004, *A. alternata* y *A. tenuissima* también fueron pocas, y estas diferencias aceptadas ya que la secuencia de CICY004 corresponde a una secuencia consenso, confirmada al 100% con las secuencias de la hebra sentido y de la hebra antisentido. Estas diferencias nucleotídicas son informativas, y diferencian a CICY004 de *A. alternata* y *A. tenuissima*, y también de *A. eichhorniae*. La morfología reveló que se trata de *A. chrysanthemi*, por lo que este es el primer reporte de la secuencia ITS de este fitopatógeno, ya que previamente no existía en el GenBank o en el RDP. Este estudio ahora permite ser referencia de futuras investigaciones sobre *A. chrysanthemi* como agente causal del tizón foliar en crisantemo.

In the control of leaf blight, both *A. gaumeri* and *B. flammaea* aqueous extracts and the Captan® fungicide displayed the same effect in stopping the progress of the disease and improved upon what was reported by Kumar *et al.* (2017) when evaluating garlic extracts (effectiveness of 36.64%) in the same crop. In addition, the *A. gaumeri* and *B. flammaea* aqueous extracts displayed a greater effect in comparison with the *Eucalyptus globulus* and *Ocimum sanctum* aqueous extracts at 5% against the early potato blight (20.83 and 25.37%) (Debbarma *et al.*, 2017). These results indicated that the *A. gaumeri* and *B. flammaea* extracts at 3% can reduce the severity caused by *A. chrysanthemi*, and the information previously reported on the *in vitro* tests against this pathogen (Vargas-Díaz *et al.*, 2014) was confirmed.

In parameters AUDPC and Y_{final} , both extracts turned out to be as effective in the reduction of the severity as the Captan® fungicide. A study by Ortega-Centeno *et al.* (2010) reported in cauliflower, broccoli and radishes (Brassicaceae), the same effectiveness of control as with synthetic fungicides (captan, amistar and manzate) against *Uromyces transversalis*, which causes rust in gladiolus rust.

The plants *A. gaumeri* and *B. flammaea* are considered endemic to the Yucatán Peninsula, meaning there is scarce information on their phytochemical and biological properties (Hernández-Bolio *et al.*, 2019). *A. gaumeri* is a plant on which there are few reports regarding its antifungal activity (Gamboa-Angulo *et al.*, 2008; Vargas-Díaz *et al.*, 2014). In the genus there have been chemical families found, depending on the solvent used (terpenes, steroids, tannins, saponins alkaloids, anthocyanins, polyketides and flavonoids) mainly responsible for antifungal activities (Adesina *et al.*, 2000; Gutierrez-Lugo *et al.*, 2002; Hungeling *et al.*, 2009; Seebaluck *et al.*, 2015).

En el control del tizón foliar, ambos extractos acuosos de *A. gaumeri* y de *B. flammaea* y el Fungicida Captan® mostraron el mismo efecto, para detener el progreso de la enfermedad y mejoraron lo reportado por Kumar *et al.* (2017) cuando evaluó extracto de ajo (efectividad 36.64%) en el mismo cultivo. También, los extractos acuosos de *A. gaumeri* y de *B. flammaea*, mostraron un mayor efecto, en comparación con extractos acuosos de *Eucalyptus globulus* y *Ocimum sanctum* al 5% contra el tizón temprano de la papa (20.83 y 25.37%) (Debbarma *et al.*, 2017). Estos resultados indicaron que los extractos de *A. gaumeri* y de *B. flammaea* al 3% son capaces de reducir la severidad causada por *A. chrysanthemi*, y se confirmó lo previamente reportando en las pruebas *in vitro* contra este patógeno (Vargas-Díaz *et al.*, 2014).

En los parámetros ABCPE y Y_{final} , ambos extractos resultaron igual de efectivos para reducir la severidad que el fungicida Captan®. Un estudio, Ortega-Centeno *et al.* (2010) reportaron con extractos de coliflor, brócoli y rábanos (Brassicaceae), misma efectividad de control con fungicidas sintéticos (captan, amistar y manzate) contra *Uromyces transversalis* causante de la roya en gladio.

Las plantas *A. gaumeri* y *B. flammaea* son consideradas endémica de la Península de Yucatán, lo que significa poca información sobre sus propiedades fitoquímicas y biológicas (Hernández-Bolio *et al.*, 2019). *A. gaumeri* es una planta en la que existen pocos reportes de su actividad antifúngica (Gamboa-Angulo *et al.*, 2008; Vargas-Díaz *et al.*, 2014). En el género se han reportado familias químicas, que de acuerdo con el disolvente utilizado están presentes: terpenos, esteroides, taninos, saponinas alcaloides, antocianinas, policétidos y flavonoides principalmente responsables de actividades antifúngicas (Adesina *et al.*, 2000; Gutierrez-Lugo *et al.*, 2002; Hungeling *et al.*, 2009; Seebaluck *et al.*, 2015).

Regarding *B. flammaea*, from methanolic root extracts, García-Sosa *et al.* (2011) reported an inhibiting effect against *C. gloeosporioides*. Sánchez-Medina *et al.* (2010) identified the presence of a sakurososaponin from the aqueous residue from the liquid-liquid partition of the extract, with a cytotoxic activity and against *C. gloeosporioides*. Sakurososaponin is one of the main metabolites responsible for the antifungal activity of *B. flammaea*, and it is known to have the ability to form complexes with sterols of the cell membrane, which causes a loss in its integrity and the death of the fungus (Morrissey and Osbourn, 1999).

When growing ornamental plants, the esthetic damage on the foliage and flowers caused by phytopathogens is considered crucially important, since it reduces their quality, shelf life and price for sale (Barrera-Necha and Bautista-Baños, 2016). The reduction in the intensity of the disease with the application of extracts and the fungicides allowed for a higher number of buttons and diameter of the bunches, with a significant difference with the negative control, which is crucial to obtain higher yields in the production of chrysanthemum (Kumar *et al.*, 2011).

In addition to being easily obtainable for application on the field by farmers, aqueous extracts are environmentally safer in comparison with other methods of extraction with solvents. This represents an important step in the development of environmentally friendly plant-based pesticides. This study is the beginning of future investigations that contributes to proposing strategies for the control of diseases in the sustainable planting of chrysanthemum.

En cuanto a *B. flammaea*, García-Sosa *et al.* (2011), a partir de extractos metanólicos de raíces, reportaron efecto inhibitorio contra *C. gloeosporioides*. Sánchez-Medina *et al.* (2010) identificaron la presencia de una sakurososaponina a partir del residuo acuoso procedente de la partición líquido-líquido del extracto, con actividad citotóxica y contra *C. gloeosporioides*. La sakurososaponina es uno de los principales metabolitos responsables de actividad antifúngica de *B. flammaea*, y se sabe que tiene la habilidad de formar complejos con esteroides de la membrana celular, lo que causa una pérdida en la integridad de la misma y la muerte del hongo (Morrissey y Osbourn, 1999).

En el cultivo de ornamentales se considera que el daño estético en follaje y flores causado por fitopatógenos es de vital importancia, ya que merman la calidad, la vida de anaquel y el precio de su comercialización (Barrera-Necha y Bautista-Baños, 2016). La disminución de la intensidad de la enfermedad mediante las aplicaciones de los extractos y el fungicida, permitieron mayor número de botones y diámetro del racimo, con diferencia significativa al control negativo, lo que es fundamental para obtener mayores rendimientos en la producción de crisantemo (Kumar *et al.*, 2011).

Además de su obtención fácil para aplicarse en campo por productores, los extractos acuosos son ambientalmente más seguros en comparación con otros métodos de extracción con disolventes. Esto representa un paso importante en el desarrollo de plaguicidas amigables con el ambiente a base de plantas. Este estudio es el inicio de futuras investigaciones que contribuye a plantear estrategias de control de enfermedades en el cultivo sustentable del crisantemo.

CONCLUSIONS

Alternaria chrysanthemi was identified as the causal agent of leaf blight in chrysanthemum. The aqueous extracts of *A. gaumeri* roots and *B. flammea* cortex were as effective as the fungicide Captan® in the control of the leaf blight disease under field conditions.

ACKNOWLEDGEMENTS

Our acknowledgements go to the National Science and Technology Council for the financial support of this investigation (Project PDCPN- 2015-266) and to project Cátedra CONACYT 364 “Reconversión productiva sustentable para el desarrollo de los productores rurales de Campeche” (Productive sustainable reconversion for the development of rural farmers in Campeche), of which the main author of this manuscript is a member. To the technical support given by Filogonio May Pat, Paulino Simá Polanco and Irma L. Medina Baizabal.

LITERATURE CITED

- Abbott WS. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology* 18: 265-267.
- Adesina SK, Idowu O, Ogundaini AO, Oladimeji H, Olugbade TA, Onawunmi GO and Pais M. 2000. Antimicrobial constituents of the leaves of *Acalypha wilkesiana* and *Acalypha hispida*. *Phytotherapy Research* 14: 371-374. [https://doi.org/10.1002/1099-1573\(200008\)14:5<371::AID-PTR625>3.0.CO;2-F](https://doi.org/10.1002/1099-1573(200008)14:5<371::AID-PTR625>3.0.CO;2-F).
- Ahmad F, Raziq F, Ullah N, Khan H and Din N. 2017. *In vitro* and *in vivo* bio-assay of phytobiocidal effect of plant extracts on *Alternaria solani* causing agent of early blight disease in tomato. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 50(11-12): 568-583. <https://doi.org/10.1080/03235408.2017.1352247>.
- Anderson NO. 2007. *Chrysanthemum. Dendranthema* × *grandiflora* Tzvelv. Pp 389-437. In: Anderson NO (ed) *Flower breeding and genetics*. Springer, Dordrecht. 824 p https://doi.org/10.1007/978-1-4020-4428-1_14
- Barnett HL and Hunter BB. 1972. *Illustrated genera of imperfect fungi*. Burgess Publishing Minneapolis, USA. 241 p.

CONCLUSIONES

Se identificó a *Alternaria chrysanthemi* como el agente causal del tizón foliar en crisantemo. Los extractos acuosos de raíz de *A. gaumeri* y corteza de *B. flammea* fueron igual de efectivos que el fungicida Captan® para controlar la enfermedad del tizón foliar bajo condiciones de campo.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo financiero para el desarrollo de esta investigación (Proyecto PDCPN- 2015-266) y al proyecto Cátedra CONACYT 364 “Reconversión productiva sustentable para el desarrollo de los productores rurales de Campeche” del cual es integrante el primer autor del manuscrito. Al apoyo técnico de Filogonio May Pat, Paulino Simá Polanco e Irma L. Medina Baizabal.

~~~~~ Fin de la versión en Español ~~~~~

- Barrera-Necha LLB and Bautista-Baños S. 2016. Prospects for the use of chitosan and other alternatives in ornamental conservation. Pp: 221-249. In: Bautista-Baños S, Romanazzi G and Jiménez-Aparicio A. (eds.). *Chitosan in the Preservation of Agricultural Commodities*. Academic Press, México. 366p. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802735-6.00008-2>
- Borah M, Rajkhowa M and Ali S. 2019. Occurrence of diseases in floricultural crops in and around Jorhat, Assam. *International Journal of Economic Plants* 6(2): 54-63. <https://doi.org/10.23910/IJEP/2019.6.2.0294>
- Breda CA, Gasperini AM, Garcia VL, Monteiro KM, Bataglion GA, Eberlin MN and Duarte MCT. 2016. Phytochemical analysis and antifungal activity of extracts from leaves and fruit residues of *Brazilian Savanna* plants aiming its use as safe fungicides. *Natural Product Bioprospecting* 6: 195-204. <https://doi.org/10.1007/s13659-016-0101-y>
- Campbell CL and Madden LV. 1990. *Introduction to plant disease epidemiology*. John Wiley & Sons, New York, USA. 532 p.
- Carvalho FP. 2017. Pesticides, environment, and food safety. *Food and Energy Security* 6:48-60. <https://doi.org/10.1002/fes3.108>.

- Castillo-Reyes F, Castillo-Quiroz D, Muñoz-Flores HJ y Sánchez AR. 2018. Uso de bio-pesticidas de origen vegetal en el manejo de enfermedades de cultivos en México. *Mitigación del Daño Ambiental Agroalimentario y Forestal de México* 4(5): 107-121.
- Debbarna S, Sunil Z and Sobita S. 2017. Effect of plant extracts on early blight potato (*Solanum tuberosum* L.). *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 6(4): 1415-1417. Disponible en línea: <https://www.phytojournal.com/archives/2017/vol6issue4/PartU/6-4-191-590.pdf>.
- Deng Y, Chen S, Chang Q, Wang H and Chen F. 2012. The *chrysanthemum* × *Artemisia vulgaris* intergeneric hybrid has better rooting ability and higher resistance to *Alternaria* Steel leaf spot than its chrysanthemum parent. *Scientia Horticulturae* 134: 185-190. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2011.11.012>
- Domínguez-Serrano D, Yáñez-Morales MJ, García-Velasco R, Alanís-Martínez I and Segura-León O. 2016. First report of *Chrysanthemum morifolium* leaf spot caused by *Alternaria* species in Mexico. *Plant Disease* 100(3): 647. <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-15-0723-PDN>
- Gamboa-Angulo MM, Cristóbal-Alejo J, Medina-Baizabal IL, Chi-Romero F, Méndez-González R, Simá-Polanco P and May-Pat F. 2008. Antifungal properties of selected plants from the Yucatan peninsula, Mexico. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 24(9): 1955-1959. <https://doi.org/10.1007/s11274-008-9658-x>
- García-Sosa K, Sánchez-Medina A, Álvarez SL, Zacchino S, Veitch NC, Simá-Polanco P and Peña-Rodríguez LM. 2011. Antifungal activity of sakurasaponin from the root extract of *Jacquinia flammea*. *Natural Product Research* 25(12): 1185-1189. <https://doi.org/10.1080/14786419.2010.511215> PMID: 21740284
- Gutierrez-Lugo MT, Singh MP, Maiese WM and Timmermann BN. 2002. New antimicrobial cycloartane triterpenes from *Acalypha communis*. *Journal of Natural Product* 65:872-875. <https://doi.org/10.1021/np020044g>
- Hall TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41:95-98.
- Hernández-Bolio GI, Ruiz-Vargas JA and Peña-Rodríguez LM. 2019. Natural products from the Yucatecan flora: structural diversity and biological activity. *Journal of Natural Products* 82(3): 647-656. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.8b00959>
- Herrera-Parra E, Cristóbal-Alejo J, Tún-Suárez M, Gamboa-Angulo MM y Marbán-Mendoza N. 2009. Extractos acuosos de *Calea urticifolia* Mill. para el control de *Meloidogyne incognita*. *Nematropica* 39: 289-296.
- Hungeling M, Lechtenberg M, Fronczek FR and Nahrstedt A. 2009. Cyanogenic and non-cyanogenic pyridine glucosides from *Acalypha indica* (Euphorbiaceae). *Phytochemistry* 70:270-277. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2008.12.011>
- Johanson A and Jeger MJ. 1993. Use of PCR for detection of *Mycosphaerella fijiensis* and *M. musicola*, the causal agents of Sigatoka leaf spots in banana and plantain. *Mycological Research* 97: 670-674. [https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(09\)80145-7](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(09)80145-7)
- Kim KH, Kabir E and Jahan SA. 2017. Exposure to pesticides and the associated human health effects. *Science of the Total Environment* 575: 25-535. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.09.009>
- Kumar A, Kumar M, Ghosh S, Tewari T and Bhardwaj SB. 2017. Effect of weed management practices in chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora* T.) Under Tarai Conditions of Uttarakhand. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 6(8): 3028-3034. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.608.362>
- Kumar GA, Kamanna BC and Benagi VI. 2011. Management of chrysanthemum leaf blight caused by *Alternaria alternata* (fr.) Keissler under field condition. *Plant Archives* 11: 553-555.
- Madeira F, Park YM, Lee J, Buso N, Gur T, Madhusoodanan N, Basutkar P, Tivey ARN, Potter SC, Finn RD and Lopez R. 2019. The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019. *Nucleic Acids Research* 47(W1): W636-W641. <https://doi.org/doi:10.1093/nar/gkz268>.
- Moo-Koh FA, Cristóbal-Alejo J, Reyes-Ramírez A, Tun-Suárez JM, Sandoval-Luna R and Ramírez-Pool JA. 2014. *In vitro* activity of an aqueous extract of *Bonellia flammea* against phytopathogenic fungi. *Agrociencia* 48(8): 833-845. <http://www.scielo.org.mx/pdf/agro/v48n8/v48n8a6.pdf>.
- Morrisse JP and Osbourn AE. 1999. Fungal resistance to plant antibiotics as a mechanism of pathogenesis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 63(3): 708-724. <https://doi.org/10.1128/MMBR.63.3.708-724.1999>.
- Ngegba PM, Kanneh SM, Bayon MS, Ndoko EJ and Musa PD. 2018. Fungicidal effect of three plants extracts in control of four phytopathogenic fungi of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) fruit rot. *International Journal Environ of Environment, Agriculture and Biotechnology* 3: 112-117. <https://doi.or/10.22161/ijeab/3.1.14>
- Nivedha M, Ebenezer EG, Kalpana K and Arun Kumar R. 2019. *In vitro* antifungal evaluation of various plant extracts against leaf blight disease of *Jasminum grandiflorum* caused by *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler. *Journal Pharmacognosy and Phytochemistry* 8(3): 2143-2147. <https://www.phytojournal.com/archives/2019/vol8issue3/PartAC/8-3-28-815.pdf>.
- Olejnik A, Parkitna K, Kozak B, Florczak S, Matkowski J and Nowosad K. 2021. Assessment of the Genetic Diversity of *Chrysanthemum* Cultivars Using SSR Markers. *Agronomy* 11(11): 2318. <https://doi.org/10.3390/agronomy11112318>.
- Ortega-Centeno S, Guillén-Sánchez D, Ramos-García M, Troncoso-Rojas R, Villanueva-Arce R, Bosquez-Molina E y Bautista-Baños S. 2010. Métodos de inoculación y evaluación de extractos botánicos e isotiocianatos de la familia Brassicaceae en el control de la roya del gladiolo. *Revista de Chapingo Serie Horticultura* 16(1): 13-21. <http://www.scielo.org.mx/pdf/rhsh/v16n1/v16n1a3.pdf>
- Riaz T, Khan SN and Javaid A. 2008. Antifungal activity of plant extracts against *Fusarium oxysporum*—the cause of cork-rot disease of Gladiolus. *Mycopath* 6 (1–2): 13-15.
- Riego E, Hayes O, Musacchio A y Leonart R. 1997. Los postulados de Koch y la neuropatía epidémica. *Biotecnología Aplicada* 14: 137-141.

- Sánchez-Medina A, Peña-Rodríguez LM, May-Pat F, Karagianis G, Waterman PG, Mallet AI and Habtemariam S. 2010. Identification of sakurasaponin as a cytotoxic principle from *Jacquinia flammea*. *Natural Product Communications* 5(3): 1934578X1000500304. <https://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.1177/1934578X1000500304>.
- Seebaluck R, Gurib-Fakim A and Mahomoodally F. 2015. Medicinal plants from the genus *Acalypha* (Euphorbiaceae)—A review of their ethnopharmacology and phytochemistry. *Journal of ethnopharmacology* 159: 137-157. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2014.10.040>
- Shuping DSS and Eloff JN. 2017. The use of plants to protect plants and food against fungal pathogens: a review. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines* 14: 120-127. <https://doi.org/10.21010/ajtcam.v14i4.14>.
- SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera). 2020. Cierre de la producción agrícola. Crisantemo (planta). [www.siap.gob.mx/index](http://www.siap.gob.mx/index) (Consulta el 10 de diciembre de 2021).
- Silva DPCD, Ozudogru EA, Reis MVD and Lambardi M. 2018. *In vitro* conservation of ornamental plants. *Ornamental Horticulture* 24(1): 28-33. <http://dx.doi.org/10.14295/oh.v24i1.1163>.
- Simmons EG. 2007. *Alternaria*: an identification manual. CS biodiversity series 6: 1-775.
- Sobers EK. 1965. *Alternaria chrysanthemi* in Florida. Annual meeting of the Florida State. *Plant Pathology Circular* 36. <https://www.fdacs.gov/content/download/11042/file/pp36.pdf>
- Tamura K and Nei M. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution* 10:512-526. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040023>.
- Thal WM, Campbell CL and Madden LV. 1984. Sensibility of weibull model parameters estimates to variation in simulated disease progression data. *Phytopathology* 74: 1425-1430. <https://doi.org/10.1094/phyto-74-1425>.
- Tomazoni EZ, Pauletti GF, Da Silva Ribeiro RT, Moura S and Schwambach J. 2017. *In vitro* and *in vivo* activity of essential oils extracted from *Eucalyptus staigeriana*, *Eucalyptus globulus* and *Cinnamomum camphora* against *Alternaria solani* Sorauer causing early blight in tomato. *Scientia Horticultura* 223: 2-77. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.04.033>.
- Trolinger JC, McGovern RJ, Elmer WH, Rechcigl NA and Shoemaker CM. 2018. Diseases of *Chrysanthemum*. Pp. 439-502. In: McGovern R. and Elmer W. (Eds.). *Handbook of Florists' Crops Diseases. Handbook of Plant Disease Management*. Springer, Cham. New Haven, CT, USA. 1365 p. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-39670-5\\_16](https://doi.org/10.1007/978-3-319-39670-5_16)
- Vargas-Díaz AA, Gamboa-Angulo M, Medina-Baizabal IL, Pérez-Brito D, Cristóbal-Alejo J y Ruiz-Sánchez E. 2014. Evaluación de extractos de plantas nativas yucatecas contra *Alternaria chrysanthemi* y espectro de actividad antifúngica de *Acalypha gaumeri*. *Revista Mexicana de Fitopatología* 32: 1-11. <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmf/v32n1/v32n1a1.pdf>.
- Villanueva-Couoh E, Sánchez-Briceño MA, Cristóbal-Alejo J y Tún-Suárez J. 2005. Diagnóstico y alternativas de manejo químico del tizón foliar (*Alternaria chrysanthemi* Simmons y Crosier) del crisantemo (*Chrysanthemum morifolium* Ramant.) Kitamura en Yucatán, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 23: 49-56. <http://www.redalyc.org/pdf/612/61223107.pdf>.
- White TJ, Bruns T, Lee S and Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pp. 315-322. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ and White TJ (Eds.). *PCR Protocols: A guide to methods and applications*. Academic Press, San Diego, CA. 482 p. <https://msafungi.org/wp-content/uploads/2019/03/February-2013-Inoculum.pdf>.
- Xu G, Chen S and Chen F. 2010. Transgenic chrysanthemum plants expressing a harpinxoo gene demonstrate induced resistance to *Alternaria* leaf spot and accelerated development. *Russian Journal of Plant Physiology* 57: 548-553. <https://doi.org/10.1134/S1021443710040138>
- Zhu WY, Zhang F, Chen SM, Xu LL, Wang L, Wang HB and Chen F. 2014. Intergeneric hybrids between *Chrysanthemum morifolium* 'Nannongxiaoli' and *Artemisia vulgaris* 'Variegata' show enhanced resistance against both aphids and *Alternaria* leaf spot. *Euphytica* 197(3): 399-408. <https://doi.org/10.1007/s10681-014-1076-6>.