

ACTIVIDAD *in vitro* DEL EXTRACTO ACUOSO DE *Bonellia flammea* CONTRA HONGOS FITOPATÓGENOS

In vitro ACTIVITY OF AN AQUEOUS EXTRACT OF *Bonellia flammea* AGAINST PHYTOPATHOGENIC FUNGI

F. Amalia Moo-Koh¹, J. Cristóbal Alejo¹, Arturo Reyes-Ramírez¹, J. María Tun-Suárez¹,

[†]Ruth Sandoval-Luna², J. Abrahán Ramírez-Pool²

¹Laboratorio de Fitopatología. Instituto Tecnológico de Conkal1. Km 16.3 antigua carretera Mérida-Motul. Conkal, Yucatán, México. (jairoca54@hotmail). ²Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Yucatán (CESVY), Calle 19 # 443 X 26 Y 28, Colonia Ciudad Industrial. 97288. Mérida, Yucatán.

RESUMEN

Las enfermedades causadas por hongos en las plantas disminuyen la calidad y el rendimiento de los cultivos; el control de estas enfermedades demanda investigación enfocada a reducir el uso de los fungicidas sintéticos, los cuales generan resistencia de cepas y contaminación al medio ambiente. El extracto acuoso de *Bonellia flammea* es una alternativa natural de control ya que actúa como fungicida. El objetivo del presente estudio fue evaluar *in vitro* el efecto del extracto acuoso de *B. flammea* contra siete hongos fitopatógenos. El diseño experimental fue completamente al azar, los tratamientos fueron cada hongo expuesto al extracto y el hongo sin extracto, la unidad experimental fueron cuatro cajas petri, con cuatro repeticiones, los datos se analizaron mediante ANDEVA y las medias se compararon con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). Las variables medidas fueron el crecimiento micelial, el porcentaje de esporulación y la germinación de conidios; además se identificaron a nivel especie los hongos mediante iniciadores ITS (Espacios Internos de Transcripción). El extracto acuoso de *B. flammea* tuvo una actividad inhibitoria en los hongos *Curvularia verruculosa*, *Curvularia lunata*, *Exserohilum rostratum*, *Corynespora cassiicola*, *Bipolaris setariae* y *Lasiodiplodia parva*, con un intervalo de inhibición de 20 a 100 % en el crecimiento micelial, de 58 a 100 % en la esporulación y de 73 a 100 % en la germinación de conidios, lo cual implica selectividad antifúngica del extracto según la especie de hongo.

Palabras clave: Inhibición, control, fungosis, PCR.

* Autor responsable ♦ Author for correspondence.

Recibido: mayo, 2014. Aprobado: septiembre, 2014.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 48: 833-845. 2014.

ABSTRACT

Diseases caused by fungi in crops decrease quality and yield. Control of these diseases requires research focused on reducing the use of synthetic fungicides, which promote resistance and pollute the environment. The aqueous extract of *Bonellia flammea* is a natural alternative for control since it acts as a fungicide. The objective of this study was to assess *in vitro* the effect of the aqueous extract of *B. flammea* against seven phytopathogenic fungi. The experimental design was completely randomized; treatments were each fungus exposed to the extract and each fungus without extract. The experimental unit was four Petri dishes replicated four times. The data were analyzed with an ANOVA and the means were compared with the Tukey test ($p \leq 0.05$). The measured variables were mycelial growth, percentage of sporulation and conidial germination. Also, the fungi were identified at the species level using ITS (Internal Transcription Spaces) initiators. The aqueous extract from *B. flammea* had inhibitory effect on the fungi *Curvularia verruculosa*, *Curvularia lunata*, *Exserohilum rostratum*, *Corynespora cassiicola*, *Bipolaris setariae* and *Lasiodiplodia parva*, inhibiting mycelial growth 20 to 100 %, sporulation 58 to 100 % and conidial germination 73 to 100 %, implying antifungal selectivity of the extract depending on the fungus species.

Key words: Inhibition, control, fungosis, PCR.

INTRODUCTION

Phytosanitary problems in agricultural crops are manifested by the presence of pests and diseases. The latter are mostly induced by fungi, bacteria, viruses and nematodes. Phytopathogenic

INTRODUCCIÓN

El problema fitosanitario de los cultivos agrícolas se manifiesta por la presencia de plagas y enfermedades; estas últimas en su mayoría son inducidas por hongos, bacterias, virus y nematodos. Los hongos fitopatógenos causan al menos el 60 % de las enfermedades durante la producción de los cultivos, con importantes pérdidas de producción debido a que afectan el desarrollo de las plantas y las hacen más vulnerables al ataque por otros fitopatógenos (Agrios, 1999; Garon, 2006).

El uso indiscriminado y recurrente de fungicidas sintéticos genera presencia de cepas resistentes, acumulación de residuos tóxicos de los productos agrícolas y contaminación ambiental (Pérez *et al.*, 2011). Los extractos vegetales son una opción para control ya que actúan como fungicidas o reguladores del desarrollo de hongos fitopatógenos; el empleo de extractos para el control de hongos en el marco de la agricultura sostenible es una alternativa promisoría, debido a que los compuestos obtenidos de las plantas son biodegradables, de elevada efectividad, de bajo costo y no contaminan al medio ambiente (Martínez *et al.*, 2010). En el estado de Yucatán, México, hay estudios sobre extractos obtenidos de especies nativas con efecto antifúngico y uno de ellos es el extracto acuoso de *Bonellia flammea* (Cristóbal *et al.*, 2013).

Para tener una propuesta adecuada del manejo de las enfermedades causadas por hongos fitopatógenos, es necesaria la caracterización e identificación de estos organismos evaluados con extractos. Por lo tanto, la identificación morfotaxonomía tradicional necesita técnicas moleculares que permitan una identificación confiable y conocer además las relaciones filogenéticas entre organismos, ya que en ocasiones no es posible realizarlo de manera tradicional debido a la biología del propio hongo y a la similitud morfológica entre especies. Las técnicas moleculares basadas en la secuenciación de la región ribosomal permiten un análisis rápido y se utilizan para el diagnóstico rutinario de varios agentes fitopatógenos (Guigón *et al.*, 2010).

Con el propósito de ampliar el espectro de inhibición antifúngico, el objetivo del presente estudio fue evaluar el extracto acuoso de *B. flammea* contra siete hongos fitopatógenos aislados de cultivos en el estado de Yucatán y se identificaron a nivel especie los hongos fitopatógenos, usando iniciadores ITS.

fungi cause at least 60 % of the diseases during crop production and major losses in production. They affect plant development and make them more vulnerable to attack by other phytopathogens (Agrios, 1999; Garon, 2006).

The indiscriminant, recurrent use of synthetic fungicides generates resistant strains, accumulation of toxic residues in agricultural products and environmental pollution (Pérez *et al.*, 2011). Plant extracts are an option for control since they act as fungicides or growth regulators of phytopathogenic fungi. The use of extracts for fungus control in the framework of sustainable agriculture is promising; the compounds obtained from plants are biodegradable, highly effective, low-cost and do not pollute the environment (Martínez *et al.*, 2010). In the state of Yucatán, Mexico, there are studies about extracts obtained from native species that have an antifungal effect. One of these is the aqueous extract from *Bonellia flammea* (Cristóbal *et al.*, 2013).

A suitable proposal for management of diseases caused by phytopathogenic fungi requires characterizing and identifying these organisms and assessing their control with extracts. Traditional morphotaxonomic identification needs molecular techniques for reliable identification as well as knowledge of phylogenetic relationships among organisms because of the biology of the fungus itself and the morphological similarity among species. Molecular techniques based on sequencing the ribosomal region enable rapid analysis, and thus they are used for routine diagnosis of several phytopathogenic agents (Guigón *et al.*, 2010).

In order to broaden the spectrum of antifungal inhibition, the objective of this study was to assess the use of aqueous extract from *B. flammea* against seven phytopathogenic fungi isolated from crops in the state of Yucatán. The phytopathogenic fungi were identified at the species level using ITS initiators.

MATERIALS AND METHODS

Samples were collected on three occasions—in September, October and November, 2011—in municipalities where ornamental plants and habanero chili (*Capsicum chinense* Jacq.) are produced. Samples were taken from plants with symptoms induced by fungi and taken to the laboratory for preparation and conservation. The surfaces of the lesions with symptoms were examined with a stereoscopic microscope to detect signs of

MATERIALES Y MÉTODOS

Los muestreos se realizaron en tres ocasiones durante septiembre, octubre y noviembre del 2011, en municipios productores de plantas ornamentales y de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) con síntomas inducidos por hongos; las muestras se trasladaron al laboratorio para su manipulación y su conservación. Las superficies de las lesiones con síntomas se examinaron con microscopio estereoscópico para detectar signos de las alteraciones y presencia de micelio, esporas o cuerpos fructíferos. Las muestras se desinfectaron y sembraron en medio de cultivo agar papa dextrosa (PDA) (Merck) para el aislamiento e identificación de los fitopatógenos.

Identificación de hongos fitopatógenos

La identificación preliminar del género se realizó mediante la observación de las características morfotaxónicas de los siete hongos fitopatógenos aislados y se compararon con las claves de Barnett y Hunter (1999), donde se consideraron: el tipo de micelio, cuerpo fructífero y tipo de esporas (Cuadro 1).

Identificación molecular

La identificación molecular a nivel especie de las siete cepas se basó en un análisis de la región ITS1-5.8S-ITS2 del rADN (White *et al.*, 1990). Para la extracción de ADN se recolectó micelio desde un cultivo líquido a base de papa más dextrosa de 7 d de crecimiento fúngico a 30 °C; la masa micelial de cada hongo se recuperó por filtración con gasa y el ADN se obtuvo con la metodología reportada por Liu *et al.* (2002). Para lograr una mayor recuperación y pureza del ADN se probaron dos modificaciones:

Modificación 1: se usó micelio fresco al cual se agregó la solución amortiguadora, se homogenizó y se calentó a 65 °C por 1 h.

Modificación 2: el micelio que se recuperó se deshidrató 6 d en una estufa a 56 °C, con un palillo se rompió la pared celular, se agregó solución amortiguadora y se colocó en el limpiador ultrasónico BRANSON® 2510 (D.F, México) por 10 s.

La integridad del ADN se verificó por electroforesis en gel de agarosa al 1 % (p/v) (SIGMA®). Las regiones internas ITS1 e ITS2 entre los genes ribosomales (rADN) 18S-5.8S y 28S (White *et al.*, 1990) se amplificaron por PCR con los iniciadores ITS1 (5' CCGTAGGTGAACCTGCGG 3') e ITS4 (5' TCCTC-CGCTTATTGATATGC 3') sintetizados por INTEGRATED DNA TECHNOLOGIES (IDT). La mezcla de reacción consistió en: amortiguador para PCR (1 X), iniciadores ITS1 e ITS4

alterations and presence of mycelia, spores or fruiting bodies. The samples were disinfected and sown in potato dextrose agar (PDA) (Merck) for isolation and identification of the phytopathogens.

Identification of phytopathogenic fungi

Preliminary identification of the genus of the seven phytopathogenic fungi was done by observation of morphotaxonomic characteristics, which were compared with the Barnett and Hunter keys (1999), considering type of mycelia, fruiting body and type of spore (Table 1).

Molecular identification

Molecular identification of the seven strains at the species level was based on analysis of the ITS1- 5.8S-ITS2 rDNA region (White *et al.*, 1990). To extract DNA, mycelia were collected from a 7-d-old liquid culture based on potato plus dextrose at 30 °C. The mycelial mass of each fungus was recovered by filtration through gauze and the DNA was obtained with the methodology reported by Liu *et al.* (2002). To achieve greater recovery and purity of the DNA, two modifications were tested:

Modification 1: fresh mycelia was used and a buffer solution was added; the mixture was homogenized and heated to 65 °C for 1 h.

Modification 2: the recovered mycelia was dehydrated 6 h in an oven at 56 °C; the cell wall was broken with a small stick and a buffer solution was added; this was placed in a BRANSON® 2510 (D.F, México) ultrasonic cleaner for 10 s.

Integrity of the DNA was verified by electrophoresis in 1% (p/v) agarose gel (SIGMA®). The internal regions ITS1 and ITS2 between the ribosomal genes (rDNA) 18S-5.8S

Cuadro 1. Hongos aislados de diferentes hospederos en el estado de Yucatán, México.

Table 1. Fungi isolated from different hosts in the state of Yucatán, Mexico.

Código de cepas	Identificación morfológica	Hospedante
ITC1	<i>Curvularia</i> sp.	<i>Chamaedorea elegans</i>
ITC2	<i>Lasioidiplodia</i> sp.	<i>Pseudophoenix sargentii</i>
ITC3	<i>Helminthosporium</i> sp.	<i>Veitchia merrilli</i>
ITC4	<i>Curvularia</i> sp.	<i>Thrinax radiata</i>
ITC6	<i>Bipolaris</i> sp.	<i>Heliconia</i> sp.
ITC7	<i>Corynespora</i> sp.	<i>Capsicum chinense</i>
ITC9	<i>Lasioidiplodia</i> sp.	<i>Salviadivinorum</i>

(1 mM), MgCl₂ (3 mM), dNTP (0.2 mM), Taq DNA polimerasa (2.5 unidades), y ADN (100 ng) para un volumen final de 50 µL. La amplificación por PCR se realizó en un Termociclador (TECHNE[®]-312, Minnesota, EE.UU.) bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial de 2 min a 95 °C, seguido de 30 ciclos (desnaturalización a 94 °C por 1 min, alineación a 54 °C por 30 s y una extensión de 1 min a 72 °C) con una extensión final de 5 min a 72 °C (White *et al.*, 1990).

Los productos de la amplificación se visualizaron por electroforesis en gel de agarosa al 2 % (p/v) (SIGMA[®]) y los productos de PCR amplificados fueron secuenciados en Macrogen (www.macrogen.com). Las secuencias se compararon en la base de datos del Banco de Genes del National Center For Biotechnology Information (<http://blast.ncbi.nlm.gov>) mediante el programa BLAST. Al final, un filograma se elaboró con el software MEGA versión 4 con el método Neighbor-Joining (Tamura *et al.*, 2007).

Preparación del extracto acuoso *B. flammae*

Para preparar el extracto vegetal acuoso se pesaron 3 g de material seco que se depositaron en 50 mL de agua destilada a ebullición durante 15 min. Después, el extracto se enfrió y se filtró con papel Whatman No.1 para eliminar residuos sólidos. Luego, bajo condiciones asépticas y para eliminar hongos y bacterias contaminantes, se realizó una segunda filtración a través de un filtro membrana de 0.45 µm (Rodríguez *et al.*, 2012).

Determinación de la efectividad *in vitro* del extracto vegetal

Para esta determinación se utilizó el medio de cultivo PDA esterilizado, el cual se mezcló con el extracto vegetal para obtener una concentración de 3 % (30 g planta seca L⁻¹ agua), concentración establecida para la evaluación de la efectividad (Cristóbal *et al.*, 2013). La mezcla se vació en cajas petri (diámetro 8 cm) y permanecieron 24 h para verificar su esterilidad. Después, en el centro de cada caja petri que contenía el extracto, se depositó un disco de micelio (diámetro 9 mm) de los hongos cultivados en medio de cultivo PDA; se sellaron las cajas y se conservaron a temperatura ambiente (30 °C) para su evaluación posterior.

Variables evaluadas

Inhibición del crecimiento micelial (%)

El diámetro del crecimiento del hongo se midió cada 24 h hasta que la cepas testigo sin aplicación del extracto cubrió por completo la caja petri. La efectividad del extracto sobre cada hongo se calculó con la siguiente fórmula (Abbott, 1925):

and 28S (White *et al.*, 1990) were amplified by PCR with the initiators ITS1 (5' CCGTAGGTGAACCTGCGG 3') and ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3') synthesized by INTEGRATED DNA TECHNOLOGIES (IDT). The reaction mixture consisted of a buffer for PCR (1X), initiators ITS1 and ITS4 (1 mM), MgCl₂ (3 mM), dNTP (0.2 mM), Taq DNA polimerase (2.5 units)², and DNA (100 ng) for a final volume of 50 µL. PCR amplification was done in a thermocycler (TECHNE[®]-312, Minnesota, USA) under the following conditions: initial denaturalization of 2 min at 95 °C, followed by 30 cycles (denaturalization at 94 °C for 1 min, alignment at 54 °C for 30 s and an extension of 1 min at 71 °C) with a final extension of 5 min at 72 °C (White *et al.*, 1990).

The amplification products were visualized by electrophoresis in 2 % agarose gel (p/v) (SIGMA[®]), and the products of amplified PCR were sequenced in Macrogen (www.macrogen.com). The sequences were compared with those in the database of the Gene Bank of the National Center for Biotechnology Information (<http://blast.ncbi.nlm.gov>) using the software BLAST. Finally, a phylogram was constructed with the software MEGA version 4 with the Neighbor-Joining method (Tamura *et al.*, 2007).

Preparation of *B. flammae* aqueous extract

To prepare the aqueous plant extract, 3 g of dry matter was deposited in 50 mL boiling distilled water for 15 min. The extract was then cooled and filtered with Whatman No. 1 filter paper to eliminate solid residues. Under aseptic conditions and to eliminate contaminating fungi and bacteria, the extract was filtered a second time through a 0.45 mm filter membrane (Rodríguez *et al.*, 2012).

Determination *in vitro* of plant extract effectiveness

To determine extract effectiveness, sterile PDA culture medium was mixed with the plant extract to a concentration of 3 % (30 g dry plant L⁻¹ water), which was the concentration established for assessment of its effectiveness (Cristóbal *et al.*, 2013). The mixture was placed in Petri dishes (8 cm diameter) and left for 24 h to verify its sterility. After this time, a disc of mycelia (9 mm diameter) of the fungi cultivated in PDA culture medium was placed in the center of each Petri dish containing the extract. The Petri dishes were sealed and kept at room temperature (30 °C) for later assessment.

Assessed variables

Inhibition of mycelial growth (%)

Inhibition was assessed by measuring the diameter of the fungus every 24 h until the control strains without extract

$$E = ((\text{Test} - \text{Trat})/\text{Test}) \times 100$$

donde E = efectividad (%), Test = crecimiento micelial del testigo (cm), Trat = crecimiento micelial del tratamiento (cm), 100 = constante.

Inhibición de la esporulación y la germinación de conidios (%)

En las cajas petri donde no se observó 100 % de inhibición del crecimiento micelial, se agregaron 9 mL de agua destilada estéril para la recolección de las conidios; con un portaobjetos se raspó el micelio, la solución obtenida se filtró con gasas estériles y esta solución se depositó en un tubo de ensayo de 50 mL. Después, 100 μL de la solución filtrada se depositaron en un vial estéril, se adicionaron 900 μL de agua destilada estéril, se transfirieron 9 μL de esta dilución de conidios en cada campo del hematocitómetro (cámara de Neubauer), y se observaron en el microscopio compuesto Leica® BM500 a 10X (Wetzlar, Alemania).

El número de conidios (Höller *et al.*, 1999) se calculó para cada hongo fitopatógeno con la fórmula:

$$NE = (X / 0.1) (1000) (9)$$

donde NE = número de esporas en 1 mL, X = promedio de esporas de los 4 campos, 0.1 = profundidad de la cámara, 1000 = volumen, 9 = mL agregados a las cajas petri para el arrastre de esporas. Para contabilizar la germinación de conidios se aplicó la misma metodología de la esporulación. Sin embargo, los 9 μL de la dilución de conidios se incorporaron en una caja petri con medio de cultivo PDA marcada en cuadrantes y otra con PDA más extracto previamente preparado. Las observaciones se realizaron cada hora, hasta que en las cepas testigo se cuantificó la emisión del tubo germinativo de 100 conidios.

El porcentaje de inhibición en la esporulación y en la germinación de conidios se obtuvo por diferencia porcentual, al considerar al tratamiento testigo como el 100 % de la capacidad de los hongos para expresar la producción de esporas y su germinación.

Diseño experimental

El diseño experimental fue completamente al azar, con los tratamientos: 1) cepa del hongo expuesto al extracto y, 2) cepa testigo del hongo sin extracto. Con los datos de porcentaje de inhibición de crecimiento micelial, esporulación y germinación de conidios, se realizó un ANDEVA usando SAS Ver. 8.1 para Windows®, previa transformación de los datos con la fórmula: $y = \text{arsin}(\sqrt{y/100})$. Las medias de los tratamientos se compararon con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

completely covered the Petri dish. Effectiveness of the extract against each fungus was calculated with the following formula (Abbott, 1925):

$$E = ((\text{Test} - \text{Trat})/\text{Test}) \times 100$$

where E=effectiveness (%), Test=mycelial growth of the control (cm), Trat=mycelial growth of the treatment (cm), 100=constant.

Inhibition of sporulation and conidial germination (%)

In the Petri dishes where 100 % inhibition of mycelial growth was not observed, 9 mL sterile distilled water was added to collect the conidia. The mycelia was scraped with a slide and the obtained solution was filtered through sterile gauze and deposited in a 50 mL test tube. Then, 100 μL of the filtered solution was deposited in a sterile vial and 900 μL sterile distilled water was added. Of this dilution of conidia, 9 μL was transferred to each field of the hemacytometer (Neubauer chamber) and observed in a compound microscope Leica® BM500 (Wetzlar, Germany) at 10X.

The number of conidia (Höller *et al.*, 1999) was calculated for each phytopathogenic fungus with the formula

$$NE = (X / 0.1) (1000) (9)$$

where NE=number of spores in 1 mL, X=average number of spores of 4 fields, 0.1=depth of the chamber, 1000=volume, 9=mL added to Petri dishes to scrape off spores. To calculate germination of conidia, the same method used for sporulation was applied. However, the 9 μL of the conidial dilution were poured into a Petri dish with PDA culture medium marked in quadrants and in another dish with PDA plus previously prepared extract. Observations were made every hour until emission of germination tubes of 100 conidia were quantified in the control strains.

Percentage of inhibition of sporulation and conidial germination was obtained by difference in percentage, considering the control treatment as 100 % of the capacity of the fungi to express spore production and germination.

Experimental design

The experimental design was completely randomized. The treatments were 1) fungus strain exposed to the extract and 2) control strain of the fungus without extract. With the data on percentage of inhibition of mycelial growth, sporulation and conidial germination, an ANOVA was performed using SAS

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Identificación molecular de siete hongos fitopatógenos

Las extracciones del ADN con la metodología modificada de Liu *et al.* (2002) permitió obtener 57 % de las cepas estudiadas, mientras que 43 % de las cepas se obtuvo con la metodología de extracción empleada para el Kit Axygen para sangre y tejido (AxyPrep™ Blood Genomic DNA MiniPrep Kit). La extracción del ADN se dificulta principalmente por los componentes y la estructura de la pared celular de los hongos, que confieren rigidez y presencia de carbohidratos excretados por las células (Lurá *et al.*, 2003), pero con las modificaciones implementadas para extraer ADN se mejoró la eficiencia de la técnica.

En todas las muestras se obtuvieron ampliaciones por PCR usando los iniciadores ITS1 e ITS4; inicialmente se secuenciaron tres fragmentos amplificados usando ambos iniciadores, pero los electroferogramas del iniciador ITS1 mostraron traslape de picos en las bases nucleotídicas en comparación de las amplificadas con el iniciador ITS4, por lo cual la comparación con la base de datos del GenBank (NCBI) se realizó usando las secuencias amplificadas con el iniciador ITS4. El análisis comparativo de las secuencias con el banco de genes del NCBI permitió identificar las cepas en estudio con índices de identidad de 97 y 99 % con las especies comparadas (Cuadro 2), las cuales se reportan también con su sinonimia (homología) cuando es el caso, así como con su fase sexual o teleomorfo correspondiente.

ver. 8.1 for Windows®, having previously transformed the data with the formula $y = \arcsin(\sqrt{y/100})$. Treatments means were compared with the Tukey test ($p \leq 0.05$).

RESULTS AND DISCUSSION

Molecular identification of seven phytopathogenic fungi

With the modified methodology of Liu *et al.* (2002) for DNA extraction, 57 % of the studied strains were obtained, while 43 % were obtained with the extraction methodology used for the Axygen Kit for blood and tissue (AxyPrep™ Blood Genomic DNA MiniPrep Kit). DNA extraction is made difficult mainly by the components and structure of the fungus cell wall that makes it rigid and by the presence of carbohydrates excreted by the cells (Lurá *et al.*, 2003). The modifications implemented for DNA extraction improved technical efficiency.

In all of the samples, PCR amplifications were obtained using ITS1 and ITS4 initiators. Initially, three fragments amplified using the two initiators were sequenced, but the electroferograms of the ITS1 initiator showed overlapping peaks at the nucleotide bases where those amplified with the ITS4 initiator did not. For this reason, comparison with the GenBank (NCBI) database was carried out using the sequences amplified with the initiator ITS4. The comparative analysis of the sequences with the NCBI GenBank enabled identification of the studied strains with indexes of 97 and 99 % identity with the compared species (Table 2), which are also reported with their synonyms (homologues)

Cuadro 2. Identificación morfológica y molecular de hongos fitopatógenos en cultivos agrícolas en el estado de Yucatán, México. Table 2. Morphological and molecular identification of phytopathogenic fungi in crops in the state of Yucatán, Mexico.

Código de cepas	Identificación morfológica	Identificación molecular			Teleomorfo
		Homología	Identidad (%)	Nº de acceso	
ITC1	<i>Curvularia</i> sp.	<i>Cochliobolus verruculosus</i>	99	JX868724	<i>Pseudocochliobolus verruculosus</i>
ITC2	<i>Lasiodiplodia</i> sp.	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	99	HM466959	<i>Botryosphaeria rhodina</i>
ITC3	<i>Helminthosporium</i> sp.	<i>Exserohilum rostratum</i>	99	GU966507	<i>Setopharia rostrata</i>
ITC4	<i>Curvularia</i> sp.	<i>Curvularia lunata</i>	99	JX960590	<i>Pseudocochliobolus lunatus</i>
ITC6	<i>Bipolaris</i> sp.	<i>Bipolaris setariae</i>	97	GU290228	<i>Cochliobolus setariae</i>
ITC7	<i>Corynespora</i> sp.	<i>Corynespora cassicola</i>	99	GU066728	<i>Corynesporasca</i> sp.
ITC9	<i>Lasiodiplodia</i> sp.	<i>Lasiodiplodia parva</i>	97	JQ659279	<i>Neofusicoccum parvum</i>

Para la cepa ITC1 la especie correspondió a *Cochliobulus verruculosus* la cual afecta al sorgo (*Sorghum* spp.), frijol (*Phaseolus vulgaris*), caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) y maíz (*Zea mays*) (FAO, 2010). La cepa ITC2 se identificó como *Lasiodiplodia theobromae* y, de acuerdo con Sandoval *et al.* (2013), es una especie cosmopolita e infecta al menos 280 especies de plantas en el mundo, como mango (*Mangifera indica*) con pudriciones en postcosecha, aguacate (*Persea americana*) y cacao (*Theobroma cacao*) en los cuales afecta la mayoría de los órganos y causa muerte de la planta.

La cepa ITC3 correspondió a *Exserohilum rostratum* causando síntomas similares en *Caryota mitis* (Cúndom *et al.*, 2006). La cepa ITC4 tuvo homología con *Curvularia lunata*, asociado con manchas en follaje y en semillas de arroz (*Oryza sativa*), cacao, trigo (*Triticum aestivum*), sorgo, maíz y amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*) (FAO, 2010). La cepa ITC6 se identificó como *Bipolaris setariae*, Riascos *et al.* (2011) lo asociaron con pudriciones y tizones foliares en palmas de las especies *Bactris gasipaes* y *Chrysalidocarpus lutescens*. En relación con la cepa ITC7 la homología correspondió con *Corynespora cassiicola* el cual induce pérdidas de producción en cultivos de importancia económica como pepino (*Cucumis sativus*), calabaza (*Curcubita pepo*), papaya (*Carica papaya*), tomate (*Solanum lycopersicon*) y chiles (*Capsicum annuum* y *C. chinense*) afectando principalmente el follaje (Pérez *et al.*, 2000; Tun *et al.*, 2011). Finalmente, la cepa ITC9 presentó identidad con *Lasiodiplodia parva*, aunque se le considera en algunos casos como fitopatógeno secundario (Burgess *et al.*, 2006) y este resultado es el primer reporte en *Salvia divinorum*.

Para el análisis filogenético se utilizaron 35 secuencias, 28 obtenidas del GenBank y siete de los aislamientos en el estudio. Entre las secuencias de los aislamientos con las secuencias comparadas se distinguen claros agrupamientos. Los códigos de cepas ITC2 e ITC9 se agruparon con las especies cuya familia corresponde a Botryosphaeriaceae y se caracterizan por presentar conidios y conidióforos en picnidios, son causantes de muerte descendente de ramas, canchros e incluso manchas foliares y pueden afectar diferentes órganos de la planta (Agrios, 1999).

Los códigos de las cepas ITC1, ITC3, ITC4, ITC6 e ITC7 se definieron como miembros de la familia Dematiaceae, cuyas características corresponden

when that was the case, as well as their sexual phase or corresponding teleomorf.

For strain ITC1, the species was *Cochliobulus verruculosus*, which affects sorghum (*Sorghum* sp.), beans (*Phaseolus vulgaris*), sugarcane (*Saccharum officinarum*) and maize (*Zea mays*) (FAO, 2010). Strain ITC2 was identified as *Lasiodiplodia theobromae* and, according to Sandoval *et al.* (2013), it is a cosmopolitan species that infects at least 280 plant species around the world, such as mango (*Mangifera indica*) causing rotting during postharvest, avocado (*Persea americana*) and cacao (*Theobroma cacao*) in which it affects most of the plant organs and causes its death.

Strain ITC3 was of the species *Exserohilum rostratum*, causing similar symptoms in *Caryota mitis* (Cúndom *et al.*, 2006). Strain ITC4 was homologous to *Curvularia lunata*, associated with spotting on leaves and seeds of rice (*Oryza sativa*), cacao, wheat (*Triticum aestivum*), sorghum, maize and amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) (FAO, 2010). Strain ITC6 was identified as *Bipolaris setariae*; Riascos *et al.* (2011) associated it with leaf rot and blight on the palm species *Bactris gasipaes* and *Chrysalidocarpus lutescens*. The homology of strain ITC7 corresponded to the species *Corynespora cassiicola*, which induces losses in production of economically important crops such as cucumber (*Cucumis sativus*), squash (*Curcubita pepo*), papaya (*Carica papaya*), tomato (*Solanum lycopersicon*) and chilis (*Capsicum annuum* and *C. chinense*), affecting mainly foliage (Pérez *et al.*, 2000; Tun *et al.*, 2011). Finally, strain ITC9 was identical to *Lasiodiplodia parva*, although it is in some cases considered a secondary phytopathogen (Burgess *et al.*, 2006). This the first report of *Lasiodiplodia parva* in *Salvia divinorum*.

For the phylogenetic analysis, 35 sequences were used, 28 of these obtained from the GenBank and seven from the isolations of this study. Among the sequences of the compared isolations, groups are clearly distinguished. The codes of the strains ITC2 and ITC9 were grouped with the species belonging to the family Botryosphaeriaceae and were characterized by conidia and conidiophores in pycnidia; it causes branch dieback, cankers and leaf spots and can affect different plant organs (Agrios, 1999).

The codes of the strains ITC1, ITC3, ITC4, ITC6 and ITC7 were defined as members of the Dematiaceae family, which includes fungi that

con hongos de color oscuro, causantes de manchas foliares, y los conidios y conidióforos los forman libres (Agrios, 1999). En el árbol filogenético se visualiza la relación de estos organismos (Figura 1).

are dark and cause leaf spots, the conidia and conidiophores are free formed (Agrios, 1999). With the phylogenetic tree, the relationships of these organisms can be visualized (Figure 1).

Efectividad *in vitro* del extracto acuoso de *B. flammea*

La efectividad antifúngica del extracto acuoso de *B. flammea* se realizó en siete cepas aisladas de diferentes hospedantes e identificadas a nivel género de manera morfológica (Cuadro 1). El análisis de varianza mostró diferencias significativas ($p \leq 0.01$) entre las variables evaluadas. El extracto causó un intervalo de

Effectiveness *in vitro* of *B. flammea* aqueous extract

Antifungal effectiveness of *B. flammea* aqueous extract was assessed with seven strains isolated from different hosts and identified at the genus level by morphology (Table 1). The analysis of variance revealed significant differences ($p \leq 0.01$) among the assessed variables. The extract inhibited 20 to 100 %

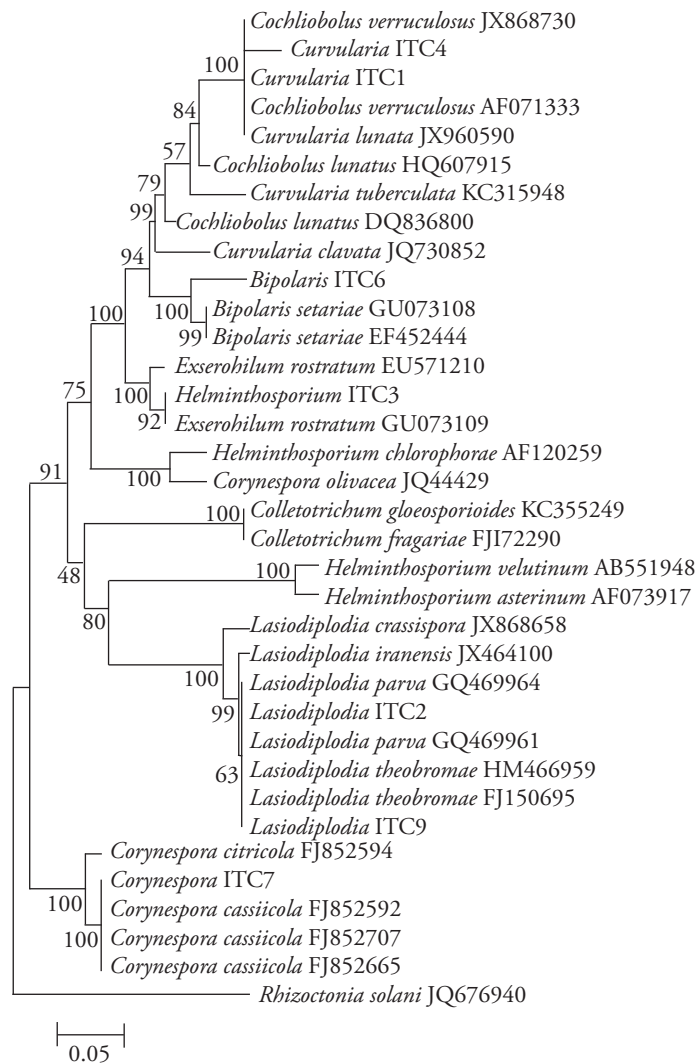


Figura 1. Árbol filogenético que muestra las relaciones entre siete especies de hongos fitopatogénicos y otras especies relacionadas.
 Figure 1. Phylogenetic tree showing relationships of seven phytopathogenic to and other related species.

inhibición de crecimiento micelial en las siete cepas de 20 a 100 %: 100 % en *C. verruculosus*, 87 % en *C. lunata*, 82 % en *E. rostratum*, 50 % en *C. cassicola*, y 20 a 28 % en las otras cepas (Figura 2). García *et al.* (2011) reportaron variaciones en la efectividad de este extracto en el crecimiento micelial en *Colletotrichum gloeosporioides*, mientras que Cristóbal *et al.* (2013) obtuvieron con el extracto acuoso y etanólico un 100 % de efectividad en *C. gloeosporioides* con la misma concentración usada en el presente estudio.

Pérez *et al.* (2000) con un extracto acuoso de piñón amoroso (*Gliricidia sepium*) en concentraciones de 6, 10, 15 y 25 %, observaron una disminución de 91 % en el crecimiento micelial de *Corynespora cassicola* con la concentración más alta. En el presente estudio, con el extracto acuoso de *B. flammea* hubo menor efectividad en el crecimiento micelial en *C. cassicola*, *B. setariae*, *L. parva* y *L. theobromae*, por lo cual la selectividad del extracto funciona de acuerdo con la especie del hongo y la concentración de los compuestos involucrados con propiedades antifúngicas.

En las cepas que no mostraron sensibilidad al extracto acuoso de *B. flammea*, éste causó deformaciones en el micelio de *L. parva* y cambios en la

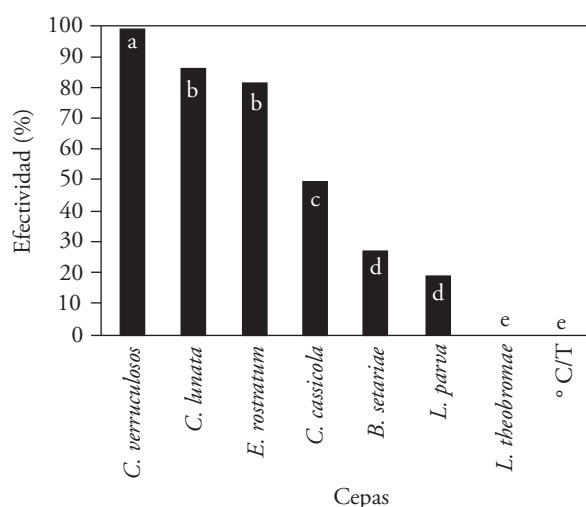


Figura 2. Efectividad del extracto acuoso de *B. flammea* en la inhibición del crecimiento micelial de hongos fitopatogénos aislados de cultivos tropicales.

Figure 2. Effectiveness of *B. flammea* aqueous extract for inhibition of mycelial growth of phytopathogenic fungi isolated from tropical crops.

Barras con diferente literal son estadísticamente diferentes ($p \leq 0.05$). ○ C/T: Cepas testigo ♦ Bars with different letters are statistically different ($p \leq 0.05$). ○ C/T: control strains.

mycelial growth of the seven strains: 100 % of *C. verruculosus* 87 % of *C. lunata*, 82 % of *E. rostratum*, 50 % of *C. cassicola*, and 20 to 28 % of the other strains (Figure 2). García *et al.* (2011) reported variations in effectiveness of this extract on mycelial growth of *Colletotrichum gloeosporioides*, while Cristóbal *et al.* (2013) achieved 100 % effectiveness against *C. gloeosporioides* with aqueous and ethanol extracts at the same concentration used in our study.

Pérez *et al.* (2000), testing an aqueous extract of *Gliricidia sepium* at concentrations of 6, 10, 15 and 25 %, observed a decrease of 91 % in mycelial growth of *Corynespora cassicola* with the highest concentration. In our study, the aqueous *B. flammea* extract was less effective against mycelial growth of *C. cassicola*, *B. setariae*, *L. parva* and *L. theobromae*, suggesting that the extract functions differentially depending on the fungus species and the concentration of the antifungal compounds involved.

Some strains did not exhibit sensitivity to the aqueous extract of *B. flammea*, but the extract did cause deformation of the mycelia of *L. parva* and changes in coloring of mycelial growth of *E. rostratum* and *C. cassicola*. According to Sánchez *et al.* (2009), the effect can become manifest as changes in shape, texture and color of the mycelia. They subjected the fungus *Rosellinia bunodes* to an aqueous extract from *Brugmansia aurea* leaves and observed deformations, dehydration and weak, less dense mycelia with differences in color, compared with mycelia of fungi in the control treatment.

Inhibition of sporulation and conidial germination

The sporulation and germination of conidia were assessed in the strains that sporulated in presence of the *B. flammea* aqueous extract. Sporulation was assessed in only four strains. The most sensitive strain was *C. verruculosus*, 100 %, inhibited, while the least sensitive was *C. cassicola*, for which the extract was not efficient enough to prevent formation of conidia but rather promoted their production in comparison with the control without extract (Table 3). Monoterpenes obtained from *Sequoi sempervirens* leaves acted differentially against several species of fungi. Some species were inhibited with low dosages, while others were inhibited by a high dosage, and

coloración del crecimiento micelial en *E. rostratum* y *C. cassicola*. De acuerdo con Sánchez *et al.* (2009), este efecto se puede manifestar desde un cambio en la forma, textura y color del micelio, y en el hongo *Rossellinia bunodes* sometido al extracto acuoso de hojas de *Brugmansia aurea*, ellos observaron deformaciones y deshidratación, un micelio débil, con menor densidad y diferencias de color, en comparación con el micelio observado en el tratamiento testigo.

Inhibición de la esporulación y la germinación de conidios

La esporulación y germinación de conidios se evaluaron en las cepas que esporularon en presencia del extracto acuoso de *B. flammea*. La esporulación se evaluó solo en cuatro cepas. La cepa más sensible fue *C. verruculosus* con 100 % de inhibición, mientras que la menos sensible fue *C. cassicola*, en la cual el extracto fue ineficiente para evitar la formación de conidios y promovió su producción en relación con la cepa testigo sin extracto (Cuadro 3). Monoterpenos obtenidos de hojas de *Sequoi sempervirens* actuaron diferencialmente contra varias especies de hongos: algunas especies se inhibieron con dosis bajas, otras con dosis altas y otras se estimularon por algunos compuestos del extracto (Montes, 2009). El extracto acuoso de *B. flammea* al 3 % mostró mejor capacidad antifúngica en *C. verruculosus* comparado con los extractos acuosos de *Artemisia camphorata* y *Cymbopogon citratus* contra *Alternaria solani*, donde una concentración de 40 % inhibió al menos un 90 % en la esporulación, pero no tuvo efecto en el crecimiento micelial del hongo (Itako *et al.*, 2008). Además, el extracto acuoso de *B. flammea* al 3 %, superó la efectividad antifúngica del extracto hecho con *Azadirachta indica* al 50 %, contra *Curvularia lunata*, *Fusarium* sp. y *Sarocladium oryzae* en los cuales redujo en 50 % la esporulación de los hongos (Cruz y Rivero, 2009). Los resultados obtenidos con *B. flammea* son promisorios ya que con la concentración evaluada ejerció mejor acción antifúngica en algunos hongos.

La efectividad del extracto en la esporulación no se evaluó en algunas cepas porque no se obtuvieron conidios, aunque las cepas se cultivaron en medios específicos para esta variable. Esto confirmaría que para algunas especies se requieren técnicas y condiciones especiales para su esporulación *in vitro* (Carvalho *et al.*, 2008).

still others were stimulated by compounds in the extract (Montes, 2009). The 3 % aqueous extract from *B. flammea* showed better antifungal capacity against *C. verruculosus* compared with the aqueous extracts of *Artemisia camphorata* and *Cymbopogon citratus* against *Alternaria solani*; at a concentration of 40 %, it inhibited sporulation by at least 90 % but did not have an effect on mycelial growth of the fungus (Itako *et al.*, 2008). Moreover, the *B. flammea* 3 % aqueous extract surpassed the antifungal effectiveness of the extract made from *Azadirachta indica*, at 50 %, against *Curvularia lunata*, *Fusarium* sp. and *Sarocladium oryzae*, reducing sporulation by 50 % (Cruz and Rivero, 2009). The results obtained with *B. flammea* are promising since the assessed concentration exerted better antifungal action against some of the fungi.

The effect of the extract on sporulation was not assessed in some strains because no conidia were obtained even though they were cultured in media specific for this variable. This would confirm that some species require special techniques and conditions for sporulation *in vitro* (Carvalho *et al.*, 2008).

The extract completely inhibited sporulation and germination of the fungus *C. verruculosus*. This is important in the control of this phytopathogen

Cuadro 3. Efectividad del extracto acuoso de *B. flammea* en la inhibición de la esporulación y la germinación de hongos fitopatógenos aislados de cultivos tropicales.

Table 3. Effectiveness of *B. flammea* aqueous extract against sporulation and germination of phytopathogenic fungi isolated from tropical crops.

Especie	Inhibición en la esporulación (%)	Inhibición en la germinación (%)
<i>C. verruculosus</i>	100 a	100 a
<i>L. thebromae</i>	NE	NE
<i>E. rostratum</i>	92 b	73 c
<i>C. lunata</i>	58 c	89 ab
<i>B. setariae</i>	□ NE	□ NE
<i>C. cassicola</i>	0 d	98 ab
<i>L. parva</i>	NE	NE
O C/T	0 d	0 d

Medias con diferente literal son estadísticamente diferentes ($p \leq 0.05$). □ NE: No esporuló. O C/T: Cepas testigos ♦ Means with different letters are statistically different ($p \leq 0.05$). □ NE: did not sporulate. O C/T: Control strains

En *C. verruculosus* el extracto inhibió por completo la esporulación y germinación del hongo, actuando como fungicida, lo cual es importante en el control de estos fitopatógenos porque impide su reproducción y diseminación (Zapata *et al.*, 2003; Bautista *et al.*, 2004).

En algunos casos la respuesta a los extractos es estimuladora en la esporulación de los hongos, como ocurrió con *C. cassiicola*, lo cual es similar a lo observado por Montes y García (1997) con los extractos acuosos de *Asclepias glauscecens*, *Citrus limón*, *Hibiscus rosa-sinensis* y *Ricinus comunis* en *Alternaria solani*, donde el fitopatógeno se estimuló en la esporulación y además mejoró el porcentaje de germinación de conidios, lo cual puede favorecer su virulencia y suponer cierta selectividad del extracto. En hongos mitosporicos empleados para el control de insectos en condiciones oxidantes, se mejora la producción de esporas la cual está asociada con su capacidad infecciosa (Miranda-Hernández *et al.*, 2013). Esto sugiere que existen productos metabólicos, como los radicales libres producidos bajo condiciones de estrés, que regulan la diferenciación celular como la esporulación según el ambiente en el cual se desarrollan (Aguirre *et al.*, 2005).

El extracto acuoso presentó una disminución significativa ($p \leq 0.01$) en la variable de germinación de conidios (Cuadro 3). En *C. verruculosus* no se observó germinación de conidios, lo cual hace al extracto 100 % efectivo, mientras que en *E. rostratum* causó la menor efectividad (73 %), comparado con la cepa testigo sin extracto. La capacidad de inhibir la germinación de esclerocios y conidios usando extractos acuosos también fue observada por Alcalá *et al.* (2005) al aplicar *Ricinus communis*, *Azadirachta indica* y *Allium sativum* contra *Sclerotium rolfsii* y *Thielaviopsis basicola*. Además, Singh (1980) y Barros *et al.* (1995) encontraron efectos inhibitorios de *A. sativum* sobre la germinación de conidios en *Fusarium* sp., *Colletotrichum* spp., *Curvularia* sp. y *Alternaria* sp. La acción de subproductos contra hongos filamentosos está asociada con la producción de compuestos de bajo peso molecular estructuralmente presentes durante las etapas de desarrollo de las plantas, o bien, se inducen durante la infección a partir de compuestos existentes como cumarinas, compuestos fenólicos, flavonoides, saponinas, quinonas, alcaloides, terpenoides fenilpropanoides, fitoalexinas tipo flavonoides, terpénicas y sesquiterpénicas (Grayer y Harbone, 1994, Montes, 2009). En otros estudios se

because its reproduction and dissemination is impeded (Zapata *et al.*, 2003; Bautista *et al.*, 2004).

In some cases the extracts stimulate fungus sporulation, as occurred with *C. cassiicola* and also observed by Montes and García (1997) with the aqueous extracts of *Asclepias glauscecens*, *Citrus limon*, *Hibiscus rosa-sinensis* and *Ricinus communis* used on *Alternaria solani*; sporulation was stimulated and the percentage of conidial germination increased, thus favoring its virulence, and certain selectivity of the extract is suggested. The mitosporic fungi used for the control of insects in oxidizing conditions improves spore production, which is associated with their infective capacity (Miranda-Hernández *et al.*, 2013). This suggests that there are metabolic products, such as free radicals produced under conditions of stress, that regulate cell differentiation, such as sporulation, depending on the environment in which they develop (Aguirre *et al.*, 2005).

The aqueous extract produced a significant decrease ($p \leq 0.01$) in the variable conidial germination (Table 3). In *C. verruculosus* no conidial germination was observed, making the extract 100 % effective, while in *E. rostratum* it was less effective (73 %), compared with the control strain without extract. The ability of aqueous extracts to inhibit germination of sclerotia and conidia was also observed by Alcalá *et al.* (2005), who used *R. communis*, *Azadirachta indica* and *Allium sativum* against *Sclerotium rolfsii* and *Thielaviopsis basicola*. Moreover, Singh (1980) and Barros *et al.* (1995) found an inhibitory effect of *A. sativum* on conidial germination in *Fusarium* sp., *Colletotrichum* spp., *Curvularia* sp. and *Alternaria* sp. The action of subproducts against filamentous fungi is associated with the production of low molecular weight compounds that are structurally present during the stages of plant development, or that are induced during the infection from existing compounds such as coumarins, phenolics, flavonoids, saponins, quinones, alkaloids, terpenoids, phenylpropanoids, flavonoid-type phytoalexins, terpene and sesquiterpene (Grayer and Harbone, 1994, Montes, 2009). Other studies have detected the presence of sakurasosaponin in the methanol extract of *B. flammea* root, which had antifungal activity against *Colletotrichum gloeosporioides*; this secondary metabolite interacts non-specifically with sterols of the cell membrane, favors the formation of pores in the membrane and induces cell death (Sanchez *et al.*, 2009; Cristóbal *et al.*, 2013).

detectó la presencia de la sakurososaponina a partir del extracto metanólico en raíz de *B. flammae*, la cual tuvo una actividad anfúngica contra *Colletotrichum gloeosporioides*; este metabolito secundario forma una interacción no específica con los esteroides de la membrana celular, favorece la formación de poros en la membrana e induce la muerte celular (Sanchez *et al.*, 2009; Cristóbal *et al.*, 2013).

CONCLUSIONES

El extracto acuoso de *Bonellia flammae* mostró diferentes porcentajes de efectividad en el crecimiento micelial, en la esporulación y en la germinación de conidios según la especie del hongo, lo cual indicó una selectividad antifúngica.

La extracción de ADN en 57 % de las cepas de hongos se optimizó con las modificaciones implementadas en este estudio, lo cual permite la identificación molecular y su aplicación en especies donde se dificulte la extracción de ADN.

La identificación de *Lasiodiplodia parva* en *Salvia divinorum* contribuye al primer reporte de esta especie induciendo tizones foliares y muerte descendente en esta ornamental tropical.

LITERATURA CITADA

- Abbott W., S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.* 18: 265-267.
- Agrios G., N. 1999. *Fitopatología*. Ed. Limusa. Noriega. 838 p.
- Aguirre, J., M. Ríos M., D. Hewitt, and W. Hansberg. 2005. Reactive oxygen species and development in microbial eukaryotes. *Trends Microbiol.* 13: 111-118.
- Alcalá de M., D., N. Vargas, y A. Pire. 2005. Efecto de extractos vegetales y fungicidas sintéticos sobre el crecimiento micelial *in vitro* de *Sclerotium rolfsii* y *Thielaviopsis basicola*. *Rev. Fac. Agro. Luz.* 22: 315-323.
- Barnett H., L., and B. Hunter B. 1998. *Illustrate Genera of Imperfect Fungy*, 4th Ed. The American Phytopathological Society. St Paul, Minnesota, USA. 218 p.
- Barros S., T., N. De Oliveira T., e L. Maia. 1995. Efeito do extrato de alho (*Allium sativum*) sobre o crescimento micelial e germinacao de conidios de *Curvularia* spp. e *Alternaria* spp. *Summ. Phytopathol.* 21: 168-170.
- Bautista B., S., M. Hernández L., and E. Bosque M. 2004. Growth inhibition of selected fungi by chitosan and plant extracts. *Rev. Mex. Fitopatol.* 22: 178-186.
- Burgess, T. I., P. A. Barber, S. Mohali, G. Pegg, W. de Beer, and M. J. Wingfield. 2006. Three new *Lasiodiplodia* spp. from the tropics, recognized based on DNA sequence comparisons and morphology. *Mycologia* 98: 423-435.
- Carvalho D., D. C., E. Alves, T. R. S. Batista, R. B. Camargos, and E. A. G. L. Lopes. 2008. Comparison of methodologies

CONCLUSIONS

The aqueous extract of *Bonellia flammae* was effective on mycelial growth, sporulation and conidial germination in different percentages depending on the fungus species, indicating antifungal selectivity.

Extraction of DNA in 57 % of the fungus strains was optimized with the modifications implemented in this study, permitting molecular identification and its application in species in which DNA extraction is difficult.

Identification of *Lasiodiplodia parva* in *Salvia divinorum* in this study contributes the first report of this fungus species, which induces leaf blight and branch dieback, in this tropical ornamental.

—End of the English version—

---*---

- for conidia production by *Alternaria alternata* from citrus. *Braz. J. Microbiol.* 39: 792-798.
- Cristóbal A., J., H. M. Bacab P., E. Herrera P., M. M. Gamboa Á., y J. M. Tun S. 2013. Extractos vegetales para el control de la antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz.) en papaya cv. maradol (*Carica papaya* L.). *In: Mendoza P., J de D., M. A Estrada B., R. Sánchez H., U. López N., y H. Brito V. (eds). III Congreso Internacional de Agronomía Tropical Y IV Simposio Nacional Agroalimentario*. Villahermosa, Tabasco. pp: 27.
- Cruz T., A., y D. Rivero G. 2009. Efecto del OLEONIM 50 CE sobre el crecimiento y desarrollo *in vitro* de hongos fitopatógenos del arroz (*Oryza sativa* Lin.). *Fitosanidad* 13: 271-276
- Cúndom, M. A., S. A Gutiérrez, P. Cejas, y M. G. Cabrera. 2006. *Exserohilum rostratum* patógeno de *Caryota mitis* en Argentina. *Fitosanidad* 32: 277-279.
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). 2010. <http://www.fao.org/> inicio.htm. (Consulta: junio 2012).
- García S., K., A. Sánchez M., S. L. Álvarez, S. Zacchinoc, N.C. Veitchd, P. Simá P., and L. M. Peña R. 2011. Antifungal activity of sakurasosaponin from the root extract of *Jacquinia flammae*. *Nat. Prod. Res.* 25: 1185-1189.
- Garon, E. 2006. Mycoflora and multimycotoxin detection in corn silage: experimental study. *J Agr Food Chem.* 54: 3479-3484.
- Grayer R. J., J. B. Harborne. 1994. A survey of antifungal compounds from higher plants. *Phytochemistry* 37: 19-42.
- Guigón L., C., V. Guerrero P., F. Vargas A., E. Carvajal M., G. D Ávila Q., L. Bravo L., M. Ruocco, S. Lanzuise, S. Woo, y M. Lorito. 2010. Identificación molecular de cepas nativas de *Trichoderma* spp. su tasa de crecimiento *in vitro* y antagonismo contra hongos fitopatógenos. *Rev. Mex. Fitopatol.* 28: 87-96.

- Höller, U., M. G. König, and A. D. Wright. 1999. Three new metabolites from marine-derived fungi of the genera *Coniothyrium* and *Microphaeropsis*. *J. Nat. Prod.* 62: 114-118.
- Itako, A., K. Schwan E., J. Tolentino, J. Stangarlin, e M. Silva. 2008. Atividade antifúngica e proteção do tomateiro por extratos de plantas medicinais. *Trop. Plant Pathol.* 33: 241-244.
- Liu, D., L. Pearce, G. Lilley, S. Coloe, R. Baird, and J. Pedersen. 2002. PCR identification of dermatophyte fungus *Trichophyton rubrum*, *T. soudanense* and *T. gourvilii*. *J. Med. Microbiol.* 51: 117-122.
- Lurá M., C., J. D. Benítez, S. Jáuregui, y A. M. González. 2003. Evaluación de diferentes técnicas de extracción de ADN de hongos filamentosos. *Rev. FBICIB UNL.* 7: 37-44.
- Martínez S., E. Terrazas, T. Alvarez, O. Mamani, J. Vilaa, y P. Mollinedo. 2010. Actividad antifúngica *in vitro* de extractos polares de plantas del género *Baccharis* sobre fitopatógenos. *Rev. Bolív. Quím.* 27: 13-18
- Miranda-Hernández F., G. Saucedo-Castañeda, R. Alatorre-Rosas, and O. Loera. 2014. Oxygen-rich culture conditions enhance the conidial infectivity and the quality of two strains of *Isaria fumosorosea* for potentially improved biocontrol processes. *Pest Manage. Sci.* 70: 661-666.
- Montes B. 2009. Diversidad de compuestos químicos producidos por las plantas contra hongos fitopatógenos. *Rev. Mex. Micol.* 29:73-82.
- Montes B., R., y L. García R. 1997. Efecto de extractos vegetales sobre la germinación de esporas y en los niveles de daño de *Alternaria solani* en tomate. *Rev. Mex. Fitopatol.* 32: 52- 57.
- Pérez C., A., J. M.Sc. Rojas S., A. L. Chamorro, y K. P. Pérez. 2011. Evaluación de la actividad antifúngica de *Melia azederach* sobre aislados de *Colletotrichum* spp. *Rev. Colomb. Ciencia Anim.* 3: 309-320.
- Pérez, W., B. Bernal, A. Martín, y C. Romeu. 2000. Estudio preliminar de dos extractos vegetales para el control *in vitro* del hongo *Corynespora cassiicola* (Berk & Curt) Wei. *Fitosanidad* 4: 43-46.
- Riascos O., D., G. A. Sarria V., F. Varón de A., A. Gómez C., y A. T. Mosquera E. 2011. Reconocimiento de hongos con potencial benéfico asociado a la rizosfera de chontaduro (*Bactris gasipaes* H.B.K.) en la región pacífico del valle del Cauca, Colombia. *Rev. Colomb. Ciencias Pec.* 60: 319-327.
- Rodríguez P., A. T., M. A. Ramírez A., S. Bautista B., A. Cruz T., y D. Rivero. 2012. Actividad antifúngica de extractos de *Acacia farnesiana* sobre el crecimiento *in vitro* de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Rev. Científica UDO Agríc.* 12: 91-96.
- Sandoval S., M., D. Nieto A., J. S. Sandoval I., D. Téliz O., M. Orozco S., y H. V. Silva R. 2013. Hongos asociados a pudrición del pedúnculo y muerte descendente del mango (*Mangifera indica* L.). *Agrociencia* 47: 61-73.
- Sánchez M., A., L. M. Peña R., F. May P., y G. Karagianisd, P. G. Watermand, A. I. Mallete, and S. Habtemariame. 2009. Identification of sakurasosaponin as a cytotoxic principle from *Jacquinia flammea*. *Nat. Prod. Commun.* 4:1-6.
- Sánchez T., A., J. P. Martínez A., M. E. Bernal V., y E. Castañón R. 2009. Evaluación *in vitro* del extracto de *Brugmansia aurea* PERS. (*Cacao sabanero*) para el control de *Rosellinia bunodes* Berk. & Br. *Agronomía* 17: 62-72.
- Singh, U. P., H. B. Singh, and R. B. Singh. 1980. The fungicidal effect of neem (*Azadirachta indica*) extracts on some soil-borne pathogens of gram (*Cicer arretinum*). *Mycologia* 72: 1077-1084.
- Tamura, K., J. Dudley, M. Nei, and S. Kumar. 2007. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24 : 1596–599.
- Tun S., J. M., M. E. Castillo P., J. Cristóbal A., y L. Latournerie M. 2011. Etiología de la mancha foliar del chile dulce (*Capsicum annuum* L.) y su control *in vitro* en Yucatán, México. *Fitosanidad* 15: 5-9.
- White T., J., T. Bruns, S. Lee, and J. Taylor, 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *In: Innis M. A., D. H Gelfand, J. J Sninsky, and T. J White (eds). PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications.* Academic Press, San Diego, CA. pp: 315-321.
- Zapata R., M. E. Sanabria, y D. Rodríguez. 2003. Reducción del desarrollo de hongos fitopatógenos con extracto de cardón lefaria (*Cereus deficiens* Otto & Diert). *Interciencia* 28: 302-306.