

Inhibition of *Colletotrichum gloeosporioides* and *Botrytis cinerea* by *Guazuma ulmifolia* Lam extracts

Inhibición de *Colletotrichum gloeosporioides* y *Botrytis cinerea* con extractos de *Guazuma ulmifolia* Lam

Hilda Elisa Ramírez-Salcedo, estudiante del doctorado BEMARENA, CUCBA, Universidad de Guadalajara, México; **Lucía Barrientos-Ramírez, J. Jesús Vargas-Radillo***, Departamento de Madera, Celulosa y Papel, Cucei, Universidad de Guadalajara, Zapopan Jalisco México, CP 45010; **Ramón Rodríguez-Macías, Mario Alberto Ruíz-López**, Departamento de Botánica, CUCBA, Universidad de Guadalajara, Zapopan Jalisco México, CP 45010; **Gil Virgen-Calleros**, Laboratorio de Fitopatología, CUCBA, Universidad de Guadalajara, Zapopan Jalisco México, CP 45010. *Autor para correspondencia: jvargasr@dmecp.cucei.udg.mx

Recibido: 13 de Diciembre, 2018.

Aceptado: 09 de Abril, 2019.

Ramírez-Salcedo HE, Barrientos-Ramírez L, Vargas-Radillo JJ, Rodríguez-Macías R, Ruíz-López MA and Virgen-Calleros G. Inhibition of *Colletotrichum gloeosporioides* and *Botrytis cinerea* by *Guazuma ulmifolia* Lam extracts. Mexican Journal of Phytopathology 37(2): 330-344.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1812-1

Primera publicación DOI: 29 de Abril, 2019.

First DOI publication: April 29, 2019.

Resumen. *Guazuma ulmifolia* (Malvaceae) es un árbol utilizado en la medicina popular de múltiples países para tratar diversas enfermedades. Se evaluó el efecto inhibitorio de los extractos de la corteza y fruto de esta planta, obtenidos con solventes de polaridad creciente, contra *Colletotrichum gloeosporioides* y *Botrytis cinerea*. Se utilizó como criterio para elegir el solvente con mejor desempeño en la extracción, ensayos de cromatografía de capa fina (TLC) y el dato del rendimiento de extractos.

Abstract. *Guazuma ulmifolia* (Malvaceae) is a tree used in the popular medicine of many countries to treat various diseases. We evaluated the inhibitory activity of *G. ulmifolia* bark and fruits extracts, obtained with solvents of increasing polarity, against *Colletotrichum gloeosporioides* and *Botrytis cinerea*. Thin-layer chromatography assay (TLC) and extract yield were the criteria used to establish the most efficient extraction solvent. Extracts were screened for their phytochemical components and their corresponding antifungal effect by thin-layer chromatography-Bioautography and Mycelial Growth Inhibition methods in a randomized design. Fruit extracts were more inhibitory than bark extracts, while *C. gloeosporioides* was more resistant than *B. cinerea*. At a dose of 10 mg·mL⁻¹; fruit extracts inhibited 85.5 ± 2.1% of *B. cinerea* and 45.8 ± 10.0% of *C. gloeosporioides* mycelia growth. Bark extracts inhibited 58.0 ± 2.4% and 34.1 ± 2.9% of *B. cinerea* and *C. gloeosporioides* mycelial growth, respectively. Images obtained

Posteriormente, se analizaron los extractos por medio de tamizaje fitoquímico y se evaluó la actividad antifúngica con los métodos de TLC-Bioautografía e inhibición de crecimiento micelial, aplicando un diseño experimental aleatorizado. Los extractos del fruto fueron más efectivos que los extractos de corteza, y por su parte, *C. gloeosporioides* fue más resistente que *B. cinerea*. A 10 mg mL^{-1} , los extractos de fruto inhibieron $85.5 \pm 2.1\%$ el crecimiento micelial de *B. cinerea* y en $45.8 \pm 10.0\%$ el de *C. gloeosporioides*, mientras que los extractos de corteza inhibieron en $58.0 \pm 2.4\%$ y $34.1 \pm 2.9\%$ el crecimiento de *B. cinerea* y *C. gloeosporioides*, respectivamente. Imágenes obtenidas microscopía óptica muestran que los extractos alteraron la morfología original tanto de los micelios como de las esporas.

Palabras clave: Procianidinas, micelio, radical DPPH, cromatografía TLC

Las enfermedades fúngicas causan pérdidas considerables en la producción agrícola. *Botrytis cinerea*, causante de pudrición gris (moho gris), es un patógeno que puede infectar hasta 1,000 especies de planta a través de hojas, peciolo, raíces, frutos, flores, semillas, y frutos postcosecha (Rupp *et al.*, 2017). *Colletotrichum gloeosporioides*, de la familia de los Ascomycetes, es un fitopatógeno que causa antracnosis en plantas y frutos. Es uno de los más importantes patógenos postcosecha ya que resulta en infecciones del fruto asintomáticas, latentes, o largamente inactivas, con síntomas que aparecen hasta que el fruto madura (Rodríguez-López *et al.*, 2009) cuando los conidios responden a señales químicas, ceras cuticulares y etileno, producidas por el hospedero. Se han probado diversos métodos para prevenir y controlar fitopatógenos, desde productos químicos, productos naturales renovables

with light microscopy showed that extracts altered the original mycelia and spore morphology.

Key words: Procyanidins, mycelium, DPPH radical, Chromatography TLC

Fungal diseases are responsible for considerable losses in agricultural production. *Botrytis cinerea*, which causes gray rot (gray mold), is a phytopathogen that can infect about 1,000 known plant species via leaves, petioles, roots, fruits, flowers, seeds, as well as postharvest fruits (Rupp *et al.*, 2017). *Colletotrichum gloeosporioides*, of the family Ascomycetes, is a fungal disease that causes anthracnose in various parts of the plant and fruit. These fungi are one of the most relevant postharvest pathogens since its disease results in long quiescent or latent asymptomatic fruit infections with symptoms appearing during fruit ripening (Rodríguez-López *et al.*, 2009) when the conidia respond to chemical signals, cuticle waxes and ethylene, produced by the host. Many methods have been tried to prevent and control phytopathogens, from the traditional use of chemicals, the development of renewable natural products with unique properties, including biocompatibility, biodegradability, antimicrobial activity, and safety, to the application of essential oils and plant extracts with microbicidal activity (Zhong *et al.*, 2014). *Guazuma ulmifolia* (Malvaceae), commonly known as guacimo, mutamba, caulote or equiche, is a tropical tree of medium size distributed from northern Mexico to South America (Maurino dos Santos *et al.*, 2018). For their antibacterial, antifungal, and anti-inflammatory properties, the bark, fruits, and leaves are traditionally used to treat various diseases (Maldini *et al.*, 2013). In addition, the foliage and fruit are used as livestock and horses forage. Although bark, leaves and

con atractivas propiedades como biocompatibilidad, biodegradabilidad, actividad antimicrobiana y seguridad, hasta los aceites esenciales y extractos de plantas con actividad microbiciada (Zhong *et al.*, 2014). *Guazuma ulmifolia* (Malvaceae), conocida como guacimo, mutamba, caulote o equiche, es un árbol tropical de tamaño mediano distribuido desde el norte de México hasta América del Sur (Maurino dos Santos *et al.*, 2018). Por sus propiedades antibacterianas, antifúngicas y antiinflamatorias, la corteza, los frutos y las hojas se usan para tratar diversas enfermedades (Maldini *et al.*, 2013). Asimismo, el follaje y los frutos se utilizan como forraje para ganado y caballos. Aunque la corteza, las hojas y los extractos de fruto tienen propiedades antimicrobianas, los informes científicos se han centrado en la corteza y sus propiedades medicinales, atribuidas a su alto contenido de procianidinas (taninos condensados) (Lopes *et al.*, 2009). Hay pocos reportes para control de fitopatógenos con extractos de *G. ulmifolia*, no obstante las restricciones en el uso de agroquímicos y el fomento del control biológico, que incluye extractos de plantas con propiedades fungicidas. Por ello, el objetivo de este estudio fue evaluar la actividad antimicrobiana de los extractos de fruto y corteza de *G. ulmifolia* contra *B. cinerea* y *C. gloeosporioides*.

Recolección de plantas. En abril de 2015 se recolectó el material, corteza y frutos de árboles silvestres en el área “Bosque de la Primavera” en Tala Jalisco (20° 29' 00" N de latitud y 103° 29' 30" W longitud) a una altura de 1320 metros sobre el nivel del mar. El muestreo se efectuó sobre 5 árboles seleccionados al azar. De cada uno se tomó aproximadamente 3 kg de frutos maduros y 1 kg de corteza de diferentes partes del tallo, sin evidencia de enfermedades. Una muestra compuesta se secó al medio ambiente en el laboratorio a ~25 °C, se pulverizó en un molino de cuchillas (Retsch-GMBH) y

fruit extracts have antimicrobial properties, most scientific reports have focused on the bark and its medicinal properties, which are attributed to its high procyanidins content (condensed tannins) (Lopes *et al.*, 2009); however, there are few reports on the use of *G. ulmifolia* extracts to control phytopathogens. Restrictions on the use of agrochemicals for the control of pests has led to the development of biological control methods, including biodegradable plant extracts with fungicidal properties. Therefore, the objective of this study was to evaluate the antimicrobial activity of *G. ulmifolia* fruit and bark extracts against *B. cinerea* and *C. gloeosporioides*.

Plant Collection. On April 2015, we collected bark and fruits from five randomly selected wild trees growing in the area known as “Bosque de la Primavera” in the town of Tala Jalisco (20° 29' 00" N latitude and 103° 29' 30" W longitude) at an altitude of 1320 meters above average sea level. From each tree, approximately 3 kg of mature fruits and 1 kg of bark from different parts of the stem, without evidence of diseases, were collected. A representative composite aliquot drawn from the original sample was dried at ~25 °C (in the laboratory), pulverized in a knife mill (Retsch-GMBH), and kept refrigerated until used. “Bosque de la Primavera” is a 30500 ha protected natural area located west of the metropolitan area of Guadalajara, Mexico comprised of oak, oak-pine, and tropical deciduous forest. The average annual rainfall fluctuates between 800 and 1000 mm, while the yearly average temperature is 20.6 ± 6.5 °C (Huerta-Martínez and Ibarra-Montoya, 2014).

Crude Extracts Preparation. The dry milled materials (100 g dry weight) were extracted at 4 °C with 500 mL of hexane, to remove the lipid material (lipids can interfere with the metabolites

se mantuvo refrigerada hasta su uso. El “Bosque de la Primavera” es un área natural protegida ubicada al oeste del área metropolitana de Guadalajara, México, de aproximadamente 30500 hectáreas de roble, roble-pino y bosque tropical caducifolio. La precipitación anual fluctúa entre 800 y 1000 mm y la temperatura anual de 20.6 ± 6.5 °C (Huerta-Martínez e Ibarra-Montoya, 2014).

Obtención de extractos crudos. Los materiales molidos y secos (100 g, peso seco) se extrajeron con 500 mL de hexano, para eliminar el material lipídico (interfiere con los análisis de metabolitos), por 2 horas con agitación en un matraz y baño de hielo (4 °C). Las pruebas de extracción fueron con solventes de diferentes polaridades (hexano, diclorometano y metanol) para encontrar el más eficiente, auxiliándose de cromatografía en capa fina (TLC) para este fin. Los resultados indicaron que el diclorometano fue el mejor solvente de extracción. El fruto y corteza se extrajeron con diclorometano durante 48 horas y 28 °C con agitación continua (150 rpm), relación de disolvente a muestra seca de 5:1 (v/w), en incubadora (LabTech modelo LSI-3016R). El material se filtró con papel Whatman No. 4 y el material extraído se concentró en un rotoevaporador Buchi a presión reducida y 40 °C. El rendimiento del extracto, en mg g^{-1} , se determinó dividiendo los sólidos secos obtenidos entre el peso del material vegetal seco inicial.

Cultivo de patógenos y preparación de inóculos.

Las cepas de *C. gloeosporioides* y *B. cinerea* fueron proporcionadas amablemente por el Laboratorio de Fitopatología en el CUCBA de la Universidad de Guadalajara, donde se aislaron de papaya y fresa enfermas, respectivamente, y se identificaron por sus características morfológicas y fisiológicas según los protocolos correspondientes. Cultivos puros de estas cepas se dispersaron, por separado,

assays), for 2 hours with constant stirring in a flat bottom flask. Preliminary tests were carried out with solvents of different polarities (hexane, dichloromethane, and methanol) to find the most efficient extracting solvent as determined by a thin layer chromatography (TLC) test. The results of this screening indicated that dichloromethane was the best extracting solvent. Fruit and bark samples were extracted with dichloromethane for 48 h at 28 °C with continuous stirring (150 rpm) and a solution to dry sample ratio of 5:1 (v/w) in an incubator (LabTech model LSI-3016R). The slurry was filtered through Whatman paper No 4 and the solvent, containing the extracted material, concentrated until dryness in a rotary evaporator Buchi under reduced pressure and 40 °C. We used the total solids test to determine the extract yield and expressed as milligrams of dry solids in the solvent extract per gram of original dry plant material.

Pathogens Culture and Inoculum Preparation.

CUCBA Phytopathology Laboratory of the University of Guadalajara kindly provided the *C. gloeosporioides* and *B. cinerea* strains isolated from diseased papaya and strawberry, respectively, and identified by morphology and physiological characteristics. Pure cultures of these strains were transferred into separate glass tubes and dispersed in 5 mL of sterile saline solution (NaCl, 0.85% w/v) or distilled water, and the microorganisms concentration was adjusted with saline solution or water to $1 - 2.5 \times 10^6$ cells mL^{-1} , using for this a Neubauer cell-counting chamber (Moro *et al.*, 2017).

Phytochemical Screening. Before the bioassay tests, the biological activity of the phytochemical compounds (e.g., flavonoids, tannins, terpenoids, alkaloids, saponins, glycosides, and so on) found

en 5 mL de solución salina estéril (NaCl, 0,85% p/v) o agua destilada, y la concentración de los microorganismos se ajustó con solución salina o agua a $1 - 2.5 \times 10^6$ células mL⁻¹, utilizando una cámara de recuento de células de Neubauer (Moro *et al.*, 2017).

Tamizaje Fitoquímico. Antes de las pruebas de los bioensayos, se aplicaron pruebas para la identificación cualitativa de los compuestos fitoquímicos con actividad biológica (flavonoides, taninos, terpenoides, alcaloides, saponinas, glucósidos, etcétera) presentes en los extractos, utilizando para ello procedimientos establecidos (Harbone, 1998).

TLC-Bioautografía (TLC-B). Los métodos de TLC-B son aquellos en los que se detectan cualitativamente compuestos bioactivos por medio de pruebas biológicas (antimicrobianas o enzimáticas) aplicadas sobre extractos químicos (Choma y Jesionek, 2015). Los extractos de plantas se fraccionaron por medio de TLC en sus diferentes constituyentes fitoquímicos, para lo cual se aplicaron ~10 µL de extracto en una placa de TLC (10 x 10 cm, gel de sílice, Merk, 60F₂₅₄), con una fase móvil de tolueno:acetato de etilo (85:15), visualizando la separación de los compuestos con luz UV (254 y 365 nm, Handfield UV Lamp, UVGL-58), y se registró el valor *Rf* (factor de retardo). Se utilizó la placa desarrollada para analizar la actividad biológica de los compuestos mediante bioautografía directa, usando extracto de té verde como control positivo. Las placas TLC se secaron y después se asperjaron con la suspensión fúngica correspondiente (1×10^6 células mL⁻¹) hasta humedecerla, incubándolas durante 24 horas a 37 °C y después de esto se impregnaron con violeta de p-yodonitrotetrazolio (Sigma, 2 mg mL⁻¹, 6 h, 35 °C). La sal de tetrazolio (INT) es un aceptor de electrones; los microorganismos biológicamente activos lo reducen a formazán, el cual

in the extracts were qualitatively identified using established procedures (Harbone, 1998).

TLC-Bioautography (TLC-B). TLC-B methods are those in which biological tests (antimicrobial or enzymatic) are applied on chemical extracts for the qualitative detection of bioactive compounds (Choma and Jesionek 2015). In our work, plant extracts were separated into their phytochemical constituents by TLC. For this, ~10 µL of extract was applied on a TLC plate (10 x10 cm, silica gel, Merk, 60F₂₅₄) and developed with toluene:ethyl acetate (85:15) mobile phase. After this, the phytochemicals were visualized with UV light (254 and 365 nm, Handfield UV Lamp, UVGL-58) and their *Rf* value (Retardation factor) recorded. We then used the developed plates to assess the compounds antimicrobial activity by direct bioautography using a green tea extract as a positive control. The dried plates were sprayed with the corresponding fungal suspension (1×10^6 cells mL⁻¹) until moist, incubated for 24 h at 37 °C, and then impregnated with p-iodonitrotetrazolium violet (Sigma, 2 mg mL⁻¹, 6 h, 35 °C). Tetrazolium salt (INT) is an electron acceptor which the biologically active microorganisms reduce it to red-colored formazan becoming colorless when the fungi growth is inhibited (Eloff *et al.*, 2008). Red-purple areas reveal active microbes and white areas indicate inhibition of fungal activity. To assess the antioxidant activity, we sprayed the TLC plates with a 0.2 % solution of the free radical compound DPPH (2, 2, diphenyl-1-picrylhydrazyl in methanol, Sigma®). After heating the TLC plates, the spots (compounds) with antioxidant activity turned to a yellowish white color over the DPPH purple background (Belaqziz *et al.*, 2017).

Mycelial Growth Inhibition (MGI). Growth agar medium was prepared by blending (using

es un compuesto de color rojo, y se vuelven incoloros cuando se inhibe el crecimiento de los hongos (Eloff *et al.*, 2008). Las áreas de color rojo púrpura revelan microbios activos y las áreas blancas indican la inhibición de la actividad fúngica. Para la evaluación de la actividad antioxidante se asperjaron las placas de TLC con una solución 0.2% del compuesto de DPPH (2, 2, difenilo-1-picrilhidrazilo en metanol, Sigma®), que es un radical libre. Las placas de TLC se calentaron y los compuestos antioxidantes se visualizaron mediante el desarrollo de manchas blancas amarillentas sobre el fondo púrpura del DPPH (Belaqiz *et al.*, 2017).

Inhibición del Crecimiento Micelial (ICM). El agar de crecimiento fue preparado mediante la mezcla de Agar PDA líquido (auxiliándose de un homogeneizador marca DragonLab) con 1% (v/v), Tween 80 (surfactante para mejorar la emulsificación) y suficiente extracto para alcanzar concentraciones en el 1-20 mg mL⁻¹ (rango amplio para encontrar varios datos de inhibición); el agar se depositó en cajas Petri (90 mmØ) y se dejó solidificar; luego se colocó un disco de 7 mm de diámetro impregnado con conidiasporas a una concentración controlada (1 x10⁶ células mL⁻¹), en el centro de las placas. Se utilizaron PDA como control negativo y benomilo (1 mg mL⁻¹) como control positivo. Benomilo [1-[(butilamino)carbonil]-1H-benzimidazol-2-il] es un derivado azol comúnmente utilizado para el control químico de estos hongos. Las placas se incubaron a 28 °C y el crecimiento de la colonia se midió cada 24 h con la ayuda de una regla, hasta que el micelio en el control negativo alcanzó el borde de la placa. Las pruebas se realizaron por triplicado y el porcentaje de inhibición se calculó con la siguiente fórmula (Zhong *et al.*, 2014):

$$\% \text{ Inhibición micelial} = \frac{\text{Crecimiento del micelio}_{(\text{control})} - \text{Crecimiento del micelio}_{(\text{tratamiento})}}{\text{Crecimiento del micelio}_{(\text{control})}} \times 100$$

a DragonLab homogenizer) liquid PDA agar with 1% (v/v), Tween 80 (surfactant to improve emulsification) and enough extract to achieve concentrations in the 1-20 mg mL⁻¹ range (this range is wide enough to detect inhibitory activity). Enough agar was deposited on Petri dishes (90 mmØ) and allowed to solidify; then a 7 mm diameter disc, impregnated with a fungus conidiospores solution containing 1 x10⁶ cells mL⁻¹, was placed at the plates' center. PDA and benomyl (1 mg mL⁻¹) served as negative and positive controls, respectively. Benomyl [1-[(butylamino)carbonyl]-1H-benzimidazol-2-yl], is an azole derivative commonly used for the chemical control of these fungi. The dishes were incubated at 28 °C and the colony growth measured every 24 h, with the aid of a ruler, until the mycelium in the negative control reached the dish's edge. Tests were done in triplicate, and the percent mycelial inhibition calculated with the following formula (Zhong *et al.*, 2014):

$$\% \text{ Mycelia inhibition} = \frac{\text{Mycelial growth}_{(\text{control})} - \text{Mycelial growth}_{(\text{treatment})}}{\text{Mycelial growth}_{(\text{control})}} \times 100$$

The lethal concentrations, (LC₅₀) and (LC₉₅), were calculated from the curve of mycelial inhibition vs. extract concentration.

Microscopy study. Samples of fungi treated with bark and fruit guacimo extracts (10 mg mL⁻¹), benomyl, and PDA were deposited on microscope slides and homogeneously dispersed with distilled water and viewed in an optical microscope (Zeiss model KF2) equipped with a camera (Axio Cam ERC5S).

Statistical Analyses. A randomized experimental design was set up with the factors: Plant part (Fruit and Bark); fungi (*C. gloeosporioides* and *B.*

La concentración letal, (LC_{50}) y (LC_{95}) se calculó a partir de la curva de % de inhibición micelial vs concentración de extracto.

Estudio de Microscopía. Se observaron las muestras de los hongos tratados con los extractos de corteza y fruto de guacimo (10 mg mL^{-1}) benomilo y PDA, para lo cual se depositaron en portaobjetos, se dispersaron homogéneamente con agua destilada, y fueron observados con un microscopio óptico (Zeiss modelo KF2) provisto de una cámara (Axio Cam ERC5S).

Análisis estadístico. Para el método de Inhibición del crecimiento micelial se aplicó un diseño aleatorizado, con los factores experimentales: Parte de la planta (fruto y corteza); hongos (*C. gloeosporioides* y *B. cinerea*); tiempo de tratamiento (72 h, 144 h, 240 h, 312 h), y la concentración del extracto (1 mg mL^{-1} , 10 mg mL^{-1} , 20 mg mL^{-1}). La variable de respuesta fue la inhibición del crecimiento radial (%). Los datos se analizaron mediante ANOVA multifactorial (nivel de confianza del 95%, $P < 0.05$), para evaluar la significación estadística de los factores; y la prueba de Tukey para determinar los valores que difieren. Se empleó el software estadístico Statgraphics Centurion XVII (©2014 Statpoint Technologies, Inc.) para el análisis de datos. En resultados, el rendimiento de los extractos para el fruto fue de 20.1 mg g^{-1} de material original base seca (bs) en hexano, 52.5 mg g^{-1} bs en diclorometano y 76.4 mg g^{-1} bs en metanol, mientras que para corteza fue de 56.7 mg g^{-1} bs en hexano, 122.4 mg g^{-1} bs en diclorometano y 66.0 mg g^{-1} bs en metanol. Estos valores son más altos que los 2 mg g^{-1} y 47 mg g^{-1} reportados para la corteza de guacimo extraídas por maceración con hexano y metanol, respectivamente (Camporese *et al.*, 2003). El diclorometano fue el extractante más eficiente, según lo indicado por la cantidad de metabolitos evidenciados en la

cinerea); treatment time (72 h, 144 h, 240 h, 312 h), and extract concentration (1 mg mL^{-1} , 10 mg mL^{-1} , 20 mg mL^{-1}). The response variable radial was growth inhibition (%). Data was analyzed by multifactorial ANOVA (95.0% confidence level, $P < 0.05$) to determine the statistical significance factors' effect and Tukey's test to establish the level of significance among values. We used the statistical software Statgraphics Centurion XVII (©2014 Statpoint Technologies, Inc.) for data analysis.

In results, the fruit extract yield in $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ dry weight (dw) for the different solvents were: 20.1 for hexane, 52.5 for dichloromethane, and 76.4 for methanol while those for the bark extract were 56.7 for hexane, 122.4 for dichloromethane, and 66.0 for methanol. These values are higher than the 2 mg g^{-1} , and 47 mg g^{-1} reported for macerated guacimo bark with hexane and methanol, respectively (Camporese *et al.*, 2003). Dichloromethane was the most efficient solvent as indicated by the number of metabolites found in the TLC test. The screening attested the presence of alkaloids, flavonoids, tannins, triterpenes, saponins, and coumarins in the extracts, highlighting the presence of flavonoids, triterpenes, and coumarins, due to their biological activity. Our results agree with those of Singanan *et al.* (2018) who reported the presence of phenols, tannins, saponins, flavonoids, and terpenoids in *G. ulmifolia* fruit. Some of these biomolecules are characteristic of medicinal plants and have antioxidant, therapeutic, and medicinal properties that can inhibit or eliminate the growth of pathogens, with little or no toxicity to the host cells, and are good candidates for antimicrobial applications (Mujeeb *et al.*, 2014). The TLC-Bioautography results for *B. cinerea* are included in Figure 1. Results for *C. gloeosporioides* and *B. cinerea* were similar, and for the sake of brevity, we only discuss those of the latter. TLC plate A in

prueba TLC. El tamizaje evidenció la presencia en los extractos de guacimo de alcaloides, flavonoides, taninos, triterpenos, saponinas y cumarinas, destacando los flavonoides, triterpenos y cumarinas, debido a su actividad biológica. Estos resultados coinciden con los previamente reportados para fruto de *G. ulmifolia*, que mencionan la presencia de fenoles, taninos, saponinas, flavonoides y terpenoides (Singanan *et al.*, 2018). Algunas de estas biomoléculas son características de plantas medicinales y tienen propiedades antioxidantes, terapéuticas y medicinales que pueden inhibir o eliminar el crecimiento de patógenos, con poca o ninguna toxicidad para las células hospederas, y son candidatos para aplicaciones antimicrobianas (Mujeeb *et al.*, 2014). Los resultados de TLC-Bioautografía sobre *B. cinerea* se muestran en la Figura 1. El compor-

Figure 1 shows the compounds present in guacimo bark and fruit extracts, shown as distinct round dots. Plate (B) shows the antioxidant activity of each of the spot found in Plate (A) against DPPH radical (TLC-DPPH); on this plate, a yellowish spot indicates antioxidant activity. Finally, plates C and D depict *G. ulmifolia* extracts and green tea, used as positive control, antimicrobial activity against *B. cinerea* (TLC-direct bioautography test), respectively. Clear spots indicate antimicrobial activity. As can be seen, the active zones found in plate C (*G. ulmifolia* extract) coincide with those of green tea, suggesting that both contain similar flavonoids and that this zone comprises the extracts antioxidant and antifungal activity. The *R_f* values for these spots are approximately 0.30-0.45. The size and intensity of the spots indicate the

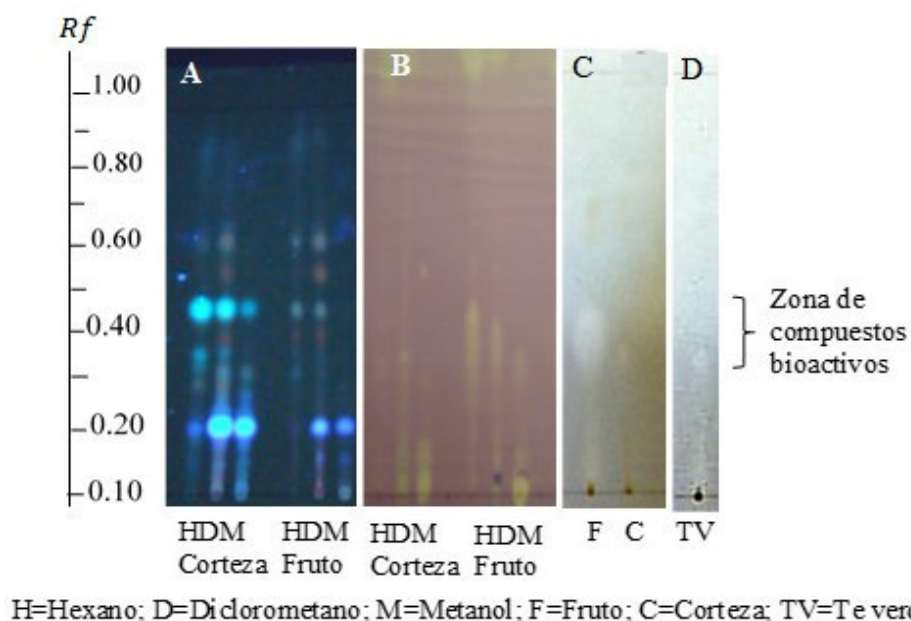


Figura 1. Pruebas biológicas cualitativas para extractos crudos de corteza y fruto de *G. ulmifolia* contra *B. Cinerea*. Fase móvil de tolueno/acetato de etilo (85/15). A) Placas de gel de sílice para TLC; B) TLC-DPPH. Actividad antioxidante de extractos de *G. ulmifolia*. Método de revelado: Vanillina; C) TLC-Bioautografía Directa. Actividad antifúngica de los extractos de *G. ulmifolia* y D) Te Verde- Bioautografía directa. Actividad Antifúngica de extractos de Té Verde (Comparativo).

Figure 1. Qualitative biological tests for crude extracts of *G. ulmifolia*'s bark and fruit against *B. Cinerea*. Mobile phase Toluene/Ethyl acetate (85/15). A) Silica gel TLC; B) TLC-DPPH. Antioxidant activity of *G. ulmifolia* extracts. Detection method: Vanillin; C) TLC-Direct Bioautography. Antifungal activity of *G. ulmifolia* extracts and D) Green tea- Direct Bioautography. Antifungal activity of green tea extracts (Control).

tamiento de *C. gloeosporioides* y *B. cinerea* fue similar y por brevedad, solo se discute el último. La placa de TLC (A) en la Figura 1 muestra la separación de los compuestos presentes en los extractos de corteza y frutos de guacimo, observados como manchas redondas y distintas entre sí. La placa (B) muestra la actividad antioxidante de cada punto que se encuentra en la placa (A) contra el radical DPPH (TLC-DPPH); en esta placa una mancha amarillenta indica actividad antioxidante. Las placas C y D muestran la actividad antimicrobiana contra *B. cinerea* (prueba de bioautografía TLC-directa) de los extractos de *G. ulmifolia* y el té verde, usado como control positivo, respectivamente. La actividad antimicrobiana se aprecia como manchas más claras. Se observa que las zonas activas coinciden con las del té verde, por lo que es probable que contengan el mismo tipo de flavonoides y en comparación se deduce que esta es la zona de extractos antioxidantes y antifúngicos. Los valores de *Rf* para los puntos son aproximadamente 0.30-0.45. El tamaño e intensidad de las manchas se incrementan con el nivel de bioactividad. Una observación cuidadosa de las placas de TLC indicaría que la bioactividad es mayor en los extractos del fruto en relación a los de la corteza.

El Cuadro 1 muestra la inhibición del crecimiento micelial. Todas las variables experimentales fueron estadísticamente significativas (ANOVA, $P < 0.05$). Los extractos crudos de corteza y fruto de *G. ulmifolia* inhibieron el crecimiento de *B. cinerea* y *C. gloeosporioides* en diferentes grados. La inhibición más alta ($91.5 \pm 1.4\%$) se observó en *C. gloeosporioides* con 20 mg mL^{-1} de extracto de fruto y 13 días de tratamiento, similar en este punto al efecto del benomilo (1 mg mL^{-1}). Significa que se necesita una importante cantidad de extracto crudo por planta para igualar el efecto del benomilo o de otros fungicidas químicos.

bioactivity level. A close examination of the TLC plates would show that the fruit extract bioactivity is higher than that of the bark extract.

Table 1 contains the results of the mycelial growth inhibition assay (MGI). All experimental variables were statistically significant (ANOVA, $P < 0.05$). *G. ulmifolia* bark and fruit crude extracts inhibited the growth of *B. cinerea* and *C. gloeosporioides* to different extents. The highest inhibition ($91.5 \pm 1.4\%$) was observed on *C. gloeosporioides* with 20 mg mL^{-1} of fruit extract and 13 days after treatment, similar to Benomyl (1 mg mL^{-1}) effect in this point. This indicates that a considerable amount of guacimo crude extract would be needed to exert the same effect as Benomyl or other chemical fungicides.

However, the use of plant extracts would have some benefits such as being an innocuous biological control, among others. In contrast, the bark extracts had a less inhibitory effect than the fruit extracts. Under the same testing conditions (13 days, 20 mg mL^{-1}) its inhibitory activity against *C. gloeosporioides* was $48.0 \pm 1.6\%$ which is almost 50% lower than the 91.5% that was obtained with fruit. *B. cinerea* was more susceptible to the extracts than *C. gloeosporioides* (more resilient). For example, after 13 days of treatment and at a dose of 10 mg mL^{-1} , the fruit extracts inhibited the growth of *B. cinerea* and *C. gloeosporioides* by $85.5 \pm 2.1\%$ and $45.8 \pm 10.0\%$, respectively, which is indicative of this trend. Results of this study indicate that guacimo extracts repressed fungal mycelial growth with best results at concentrations $3 \text{ } 10 \text{ mg mL}^{-1}$ and maximum inhibition at 20 mg mL^{-1} ; however, at 1 mg mL^{-1} the inhibition was weak and erratic. Although there are no previous works on the effect of *G. ulmifolia* crude extracts against these two pathogens other investigations have demonstrated that other plant

Cuadro 1. Inhibición del crecimiento micelial de *B. cinerea* y *C. gloeosporioides* con extractos de fruto y corteza de *G. ulmifolia*. Los valores representan $\bar{x} \pm sd$ de tres réplicas. Todas las variables tuvieron un efecto estadísticamente significativo sobre el crecimiento del micelio ($P < 0.05$): $P_{\text{plant part}} = 0.0000$, $P_{\text{fungi}} = 0.0000$, $P_{\text{concentration extracts}} = 0.0000$, $P_{\text{treatment time}} = 0.0000$ (ANOVA).

Table 1. Inhibition of *B. cinerea* and *C. gloeosporioides* mycelial growth by *G. ulmifolia* fruit and bark extracts. Values represent the $\bar{x} \pm sd$ of three replicates. All variables had a statistically significant effect on mycelial growth ($P < 0.05$): $P_{\text{plant part}} = 0.0000$, $P_{\text{fungi}} = 0.0000$, $P_{\text{concentration extracts}} = 0.0000$, $P_{\text{treatment time}} = 0.0000$ (ANOVA).

Planta parte	Hongo	CE, mg mL ⁻¹	Tiempo de Tratamiento, días			
			3	6	10	13
Inhibición de Crecimiento Micelial, %						
Fruto	Cg	1	10.0±0.0 ^a	9.5±2.1 ^a	16.5±3.1 ^a	13.7±2.6 ^a
		10	13.3±4.7 ^a	17.8±1.6 ^{ab}	37.2±3.3 ^b	45.8±10.0 ^{bc}
		20	60.0±0.0 ^c	83.5±4.4 ^{cd}	90.7±0.2 ^d	91.5±1.4 ^d
		Benomil ^x	80.0±0.0 ^{cd}	85.7±3.8 ^{cd}	90.6±2.2 ^d	91.5±1.7 ^d
	Bc	1	36.5±12.3 ^{bc}	6.6±20.3 ^a	31.0±15.6 ^{bc}	28.0±18.7 ^{ab}
		10	44.8±5.4 ^{bc}	39.4±17.6 ^b	75.9±5.0 ^{cd}	85.5±2.1 ^{cd}
		20	80.0±0.0 ^{cd}	87.6±3.8 ^d	88.4±2.1 ^d	91.5±1.6 ^d
		Benomil	80.0±0.0 ^{cd}	87.6±3.8 ^d	88.4±2.1 ^d	91.5±1.6 ^d
Corteza	Cg	1	20.0±4.1 ^{ab}	12.4±3.4 ^a	18.1±2.4 ^{ab}	16.6±1.6 ^{ab}
		10	30.0±8.2 ^b	34.2±1.5 ^b	44.2±1.3 ^{bc}	34.1±2.9 ^b
		20	60.0±0.0 ^c	50.7±1.1 ^{bc}	42.6±3.0 ^{bc}	48.0±1.6 ^{bc}
		Benomil	83.33±0.0 ^{cd}	87.6±3.8 ^d	89.4±2.2 ^d	91.5±1.7 ^d
	Bc	1	19.2±1.5 ^{ab}	18.6±1.2 ^{ab}	20.4±1.6 ^{ab}	15.5±2.3 ^{ab}
		10	58.5±1.8 ^c	57.3±1.7 ^c	59.4±2.3 ^c	58.0±2.4 ^c
		20	79.3±0.9 ^{cd}	76.2±1.9 ^{cd}	75.4±2.5 ^{cd}	78.4±3.2 ^{cd}
		Benomil	94.8±0.0 ^d	94.7±0.5 ^d	94.8±1.4 ^d	94.6±2.5 ^d

CE=Concentración de Extractos; Cg= *C. gloeosporioides*; Bc= *B. cinerea*; ^x concentración Benomil = 1 mg mL⁻¹ / CE = Concentration Extracts; Cg = *C. gloeosporioides*; Bc= *B. cinerea*; ^xBenomyl concentration = 1 mg mL⁻¹

Los valores en la misma columna con letras diferentes indica que son significativamente diferentes, de acuerdo con la prueba de Tukey ($P < 0.05$) / Values in the same column with different letters are significantly different according to Tukey's test ($P < 0.05$).

Sin embargo, el beneficio de usarlos consiste en un control biológico seguro e inocuo, entre otros. En contraste, los extractos de corteza inhibieron menos que los extracto de fruto. Bajo las mismas condiciones descritas (13 días, 20 mg mL⁻¹) *C. gloeosporioides* fue inhibido en $48.0 \pm 1.6\%$, por extractos de corteza, lo cual es casi 50% inferior al 91.5% que se obtuvo con fruto. Asimismo, *B. cinerea* fue más susceptible que *C. gloeosporioides* (más resistente) a los extractos; Por ejemplo, en 13

extracts inhibit their growth. A methanol extract from *Piscidia piscipula* applied at 2 mg mL⁻¹ resulted in a 52.3% *C. gloeosporioides* mycelial growth inhibition after five days (Peraza-Sanchez *et al.*, 2005) which is higher than our results. In addition, the hydroalcoholic crude extracts of the soapberry (*Sapindus saponaria*) leaf 7 days after treatment resulted in a 70% *C. gloeosporioides* MGI when applied to 50 mg mL⁻¹ and 80% MGI when applied at 100 mg mL⁻¹, while concentrations

días de tratamiento y 10 mg mL⁻¹, los extractos de fruto inhibieron el crecimiento de *B. cinerea* y *C. gloeosporioides* en 85.5 ± 2.1% y 45.8 ± 10.0%, respectivamente, lo cual es indicativo de esta tendencia. Los resultados de este estudio indican que los extractos reprimieron el crecimiento del micelio fúngico, con los mejores efectos al aplicarlo a concentraciones de 310 mg mL⁻¹, obteniendo inhibición máxima con 20 mg mL⁻¹ (Cuadro 1). La inhibición fue débil y con comportamiento errático cuando se aplicó a 1 mg mL⁻¹. No hay trabajos previos sobre el efecto de extractos crudos de *G. ulmifolia* contra estos patógenos; sin embargo, si hay informes sobre los efectos de otros extractos de plantas contra ellos. El extracto de metanol de *Piscidia piscipula* aplicado a 2 mg mL⁻¹ y 5 días ocasionó 52.3% ICM sobre *C. gloeosporioides* (Peraza-Sanchez *et al.*, 2005), resultado mejor que el nuestro. También, los extractos crudos hidroalcohólicos de la hoja del jaboncillo (*Sapindus saponaria*), en 7 días de tratamiento inhibieron 70% el crecimiento micelial de *C. gloeosporioides* al aplicarlo a 50 mg mL⁻¹ y 80% al aplicarlo a 100 mg mL⁻¹, mientras que concentraciones menores de 50 mg mL⁻¹ no tuvieron efecto (Passos Marinho *et al.*, 2018). Extractos alcohólicos de las hojas de las vides silvestres (*Vitis*) aplicados a 12% de concentración ocasionaron 70% ICM de *B. cinerea* (Apolonio-Rodríguez *et al.*, 2017), menor que nuestros resultados. La actividad antimicrobiana y medicinal de los extractos de corteza, partes aéreas y frutos de *G. ulmifolia* se atribuye a la presencia de flavonoides del subgrupo flavan-3-ols (Lopes *et al.*, 2009); compuestos tales como la catequina, epicatequina, flavanocoumarinas y las procianidinas y proantocianidinas derivadas de ellas, con propiedades antioxidantes y antiinflamatorias (Maldini *et al.*, 2013). Los valores de concentración letal (CL, mg mL⁻¹) se calcularon considerando los mejores datos de inhibición en el cuadro 1, y son los siguientes: 1. *C. gloeosporioides*:

lower than 50 mg mL⁻¹ had no effect (Passos Marinho *et al.*, 2018). Alcoholic extracts of wild grapevines (*Vitis*) leaves had a lower inhibitory effect than *G. ulmifolia* extracts. When applied at 12% wild grapevines (*Vitis*) leaves resulted in only 70% *B. cinerea* MGI (Apolonio-Rodríguez *et al.*, 2017). The antimicrobial and medicinal activity of *G. ulmifolia* bark, aerial part, and fruits extracts are attributed to the presence of flavonoids of the subgroup flavan-3-ols (Lopes *et al.*, 2009) with antioxidant and anti-inflammatory properties including catechin, epicatechin, flavanocoumarins, as the procyanidins and proanthocyanidins derived from them (Maldini *et al.*, 2013). The Lethal Concentration (LC, mg mL⁻¹) parameters calculated from the best inhibitory values shown in Table 1, are as follows: 1. *C. gloeosporioides*: Fruit (LC₅₀ = 10.57, LC₉₅ = 20.94); Bark (LC₅₀ = 16.54, LC₉₅ = 34.13), 2. *B. cinerea*: Fruit (LC₅₀ = 5.24, LC₉₅ = 11.09); Bark (LC₅₀ = 10.6, LC₉₅ = 22.6). Results of the microscopy study are shown in Figure 2. Anatomy of *C. gloeosporioides* and *B. cinerea* has been previously reported. Figure 2A shows of *C. gloeosporioides*. Its main features (Rodríguez-López *et al.*, 2009) are light gray to dark gray septate hyphae. Conidia are hyaline, cylindrical, and separated from the pedicel by a transverse septum. Also for *B. cinerea* (Figure 2B), it is established (Miclea Raluca Vasilica *et al.*, 2012) septate and cylindrical hyphae, hyaline at the beginning and later become brown or black, which multiply by cytoplasmic division. Conidia are globose or elliptical, forming exogenous chains (Blastospores). Fungi treatment with guacimo extracts altered its morphology, including distorted, wavy, folded mycelia, with flat or empty portions (Xu *et al.*, 2007); cytoplasmic coagulation exhibited by small vesicles in the mycelium (Figure 2C). Nonpolar phenolic compounds, such as those found in guacimo, could affect the cytoplasmic

Fruto ($CL_{50} = 10.57$, $CL_{95} = 20.94$); Corteza ($CL_{50} = 16.54$, $CL_{95} = 34.13$), 2. *B. cinerea*: Fruto ($CL_{50} = 5.24$, $CL_{95} = 11.09$); Corteza ($CL_{50} = 10.6$, $CL_{95} = 22.6$). En la figura 2 se aprecian las características morfológicas de los hongos estudiados. La anatomía de *C. gloeosporioides* y *B. cinerea* ha sido previamente reportada. En la Figura 2A se muestra *C. gloeosporioides*. Sus características principales (Rodríguez-López *et al.*, 2009) son hifas septadas cuyo color es de gris claro a gris oscuro. Los conidios son hialinos, cilíndricos y separados del pedicelo por un tabique transversal. Para *B. cinerea* (Figura 2B), se establece (Miclea Raluca Vasilica *et al.*, 2012) hifas septadas y cilíndricas, hialina al principio y más tarde se vuelven marrón o negro. Se multiplican por división citoplásmica. Los conidios son globulares o elípticos, formando cadenas exógenas (blastosporas). El tratamiento de los hongos con extractos de guacimo ocasionó alteraciones en su morfología, a nivel de micelios deformados, ondulados, plegados, con porciones planas o vacías (Xu *et al.*, 2007), con coagulación citoplásmica, que se muestran como pequeñas vesículas en el micelio (Figura 2C). Los compuestos fenólicos no polares, como los que se encuentran en el guacimo, podrían actuar sobre la membrana citoplasmática, causando su desintegración y pérdida de trifosfato de adenosina, lo que resulta en la muerte celular (Hassani *et al.*, 2012). Los conidios mostraron cambios en su forma original (Figura 2E). La pared celular de estos elementos puede sufrir daños, con numerosas protuberancias que eventualmente llevan a su colapso, lo que podría inhibir su germinación (Sharma y Tripathi, 2008). De igual manera, *C. gloeosporioides* tratado con benomil (bencimidazol) mostró hifas vacías con grandes estructuras anómalas (Figura 2F). Benomilo es un fungicida comercial que se ha utilizado durante muchos años para controlar la antracnosis antes de la cosecha de frutos.

membrane, causing its disintegration loss of adenosine triphosphate and cell death (Hassani *et al.*, 2012). The conidia showed changes in their original form. (Figure 2E). The conidias' cell wall can also experience damage with numerous protrusions that eventually leads to their break down and inhibition of their germination (Sharma and Tripathi, 2008). In the same way, *C. gloeosporioides* treated with Benomyl (benzimidazole) showed empty hyphae with large anomalous structures (Figure 2F). Benomyl is a commercial fungicide that has been used for many years to control anthracnose before fruits harvesting.

In this study, the fruit extract was more effective on mycelial inhibition than the bark extract and could be a good source of biologically active compounds with therapeutic and fungicidal activity. Although the fruit is the most accessible part of the plant, which is edible, sweet, palatable, and consumed by the general population has not been extensively investigated. *C. gloeosporioides* was more resistant than *B. cinerea*; however, more specific tests and evaluation of pathogenicity and virulence are needed to confirm these results.

ACKNOWLEDGMENTS

We like to thank the National Council for Science and Technology (CONACYT), by awarding scholarship no. 388048/256531, the BEMARENA-CUCBA doctorate program and the Department of Wood Cellulose and Paper (DMCyP)-CUCEI of the University of Guadalajara for the support provided for this work.

~~~~~ End of the English version ~~~~~

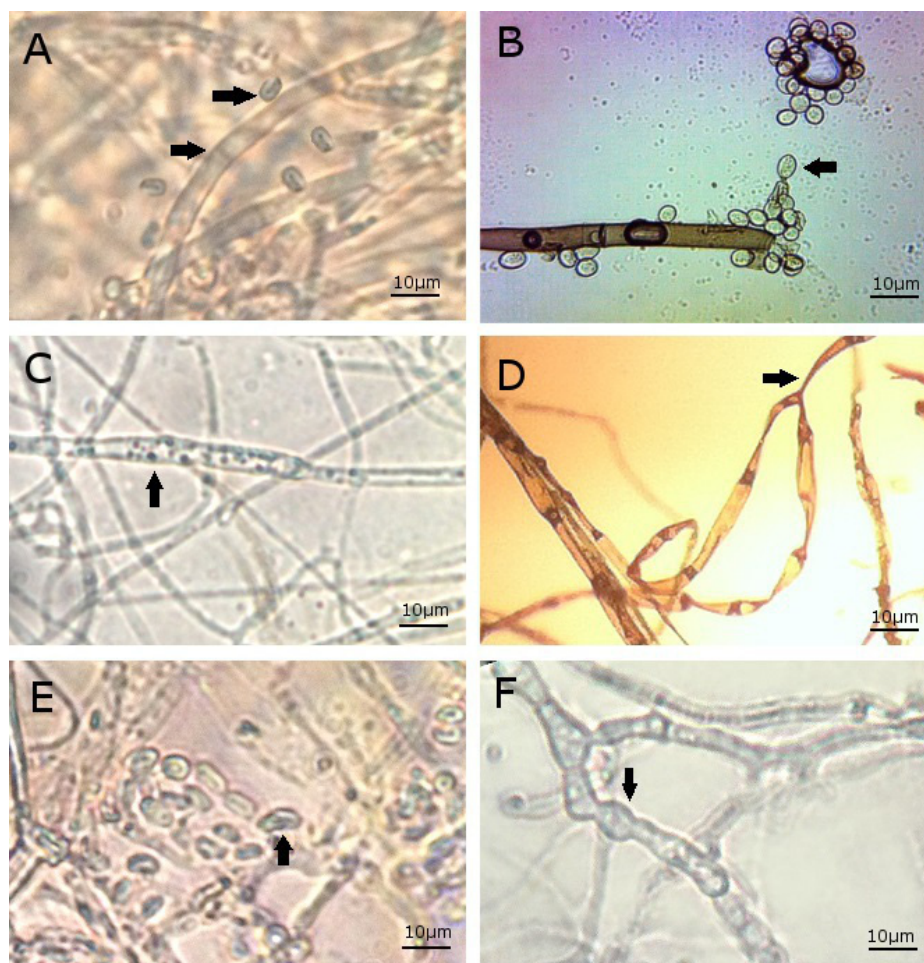


Figura 2. Cambios microscópicos observados en *B. cinerea* y *C. gloeosporioides* después de la exposición a extractos de fruto y corteza de *G. ulmifolia*. Microscopio de luz, 100x. A) Morfología de *C. gloeosporioides*; B) morfología *B. cinerea*; C) *C. gloeosporioides* tratado con extractos de fruto de *G. ulmifolia*: Observar hifas con estructura deformada y citoplasma coagulado; D) *B. cinerea* tratado con extracto de fruto de *G. ulmifolia*; E) *C. gloeosporioides* tratado con extracto de corteza de *G. ulmifolia* y F) *C. gloeosporioides* tratado con Benomilo.

Figure 2. Microscopic changes observed in *B. cinerea* and *C. gloeosporioides* after exposure to *G. ulmifolia* fruit and bark extracts. Light microscope, 100x. A) *C. gloeosporioides* morphology; B) *B. cinerea* morphology; C) *C. gloeosporioides* treated with *G. ulmifolia* fruit extract: Observe hyphae with deformed structure and coagulated cytoplasm; D) *B. cinerea* treated with *G. ulmifolia* fruit extract; E) *C. gloeosporioides* treated with *G. ulmifolia* bark extract and F) *C. gloeosporioides* treated with Benomyl.

La tendencia observada en este trabajo fue que el extracto del fruto fue más efectivo que el extracto de corteza en la inhibición micelial y podría ser una buena fuente de compuestos biológicamente activos con posibles usos terapéuticos y fungicidas. Aunque el fruto es la parte más accesible de la

planta, comestible, dulce y apetecible y es consumida por la población, no ha sido ampliamente investigada. Otra tendencia fue que *C. gloeosporioides* fue más resistente que *B. cinerea*, sin embargo, se necesitan pruebas más específicas y evaluación de la patogenicidad y/o virulencia para confirmar este desempeño.

## AGRADECIMIENTOS

Agradecemos el apoyo brindado a este proyecto por: el Sistema Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), a través de la beca escolar No. 388048/256531; al programa de doctorado BEMARENA-CUCBA; y al Departamento de Madera, Celulosa y Papel (DMCyP)-CUCEI de la Universidad de Guadalajara

## LITERATURA CITADA

- Apolonio-Rodríguez I, Franco-Mora O and Salgado-Siclán ML. 2017. Inhibición in vitro de *Botrytis cinerea* con extractos de hojas de vid silvestre (*Vitis spp.*). Revista Mexicana de Fitopatología 35: 170-185. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1611-1>
- Belaqziz M, Tan SP, El-Abbassi A, Kiai H, Hafidi A, O'Donovan O and McLoughlin P. 2017. Assessment of the antioxidant and antibacterial activities of different olive processing wastewaters. PLoS ONE 12(9): e0182622. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182622>
- Camporese A, Balick M, Arvigo R, Esposito RG, Morsellino N, Simone FD and Tubaro A. 2003. Screening of antibacterial activity of medicinal plants from Belize (Central America). Journal of Ethnopharmacology 87:103-107. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(03\)00115-6](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(03)00115-6)
- Choma I and Jesionek W. 2015. TLC-Direct bioautography as a high throughput method for detection of antimicrobials in plants. Chromatography 2:225-238. <https://doi.org/10.3390/chromatography2020225>
- Eloff JN, Katherine DR and McGaw LJ. 2008. The Biological activity and chemistry of the South African *Combretaceae*. Journal of Ethnopharmacology 1119:686-699. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.07.051>
- Harborne JB. 1998. Phytochemical Methods; A guide to modern techniques of plant analysis. Third edition. Chapman and Hall, London, 302 p. <https://www.google.com.mx/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=6&ved=2ahUKEwjXoNCJn5jfAhUJPK0KHbZVBF8QFjAFegQIAXAC&url=https%3A%2F%2Ffaculty.psau.edu.sa%2Ffiledownload%2Fdoc-3-pdf-d71d9e49824fdceb67a26b34e5bc770-original.pdf&usg=AOvVaw0ZVzhs9rixocQh6KWFFFqk>
- Hassani A, Fathi Z, Ghosta Y, Abdollahi A, Meshkatsadat MH and Marandi RJ. 2012. Evaluation of plant essential oils for control of postharvest brown and gray mold rots on Apricot. Journal of Food Safety 32:94-101. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4565.2011.00353.x>
- Huerta-Martínez FM and Ibarra-Montoya JL. 2014. Wildfires at la primavera forest, Jalisco, Mexico: an approach to possible causes and consequences. CienciaUAT. 9(1): 23-32. [www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2007-78582014000100023](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-78582014000100023)
- Lopes GC, Rocha JCB, de Almeida GC and deMello JCP. 2009. Condensed tannins from the bark of *Guazuma ulmifolia* Lam. (Sterculiaceae). Journal of the Brazilian Chemical Society 20(6):1103-1109. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-50532009000600016>
- Maldini M, Di Micco S, Montoro P, Darra E, Mariotto S, Bifulco G, Pizza C and Piacente S. 2013. Flavanocoumarins from *Guazuma ulmifolia* bark and evaluation of their affinity for STAT1. Phytochemistry 86:64-71. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2012.10.011>
- Maurino dos Santos J, Monteiro Alfredo T, Ávila Antunes K, da Silva Melo da Cunha J, Almeida Costa EM and Silva Lima E. 2018. *Guazuma ulmifolia* Lam. Decreases Oxidative Stress in Blood Volume 2018: 16 pages. <https://doi.org/10.1155/2018/2935051>
- Miclea Raluca V. Loredana Alexandra S and Carmen Emilia P. 2012. In vitro studies regarding the morphology of *Botrytis Cinerea* Pers. isolated from geranium Plants. ProEnvironment 5(2012): 60-66. <https://www.researchgate.net/publication/268816084>
- Moro IJ, Gabrielle Alexandre Gondo DG, Gonçalves Pierri E, Linharis Rodrigues Pietro RC, Pienna Soares C, Pergentino de Sousa D and Gonzaga dos Santos A. 2017. Evaluation of antimicrobial, cytotoxic and chemopreventive activities of carvone and its derivatives 53(4):e00076. <http://dx.doi.org/10.1590/s2175-97902017000400076>
- Mujeeb F, Bajpai P and Pathak N. 2014. Phytochemical evaluation, antimicrobial activity, and determination of bioactive components from leaves of *Aegle marmelos*. BioMed Research International Volume 2014, Article ID 497606, 11 pages. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/497606>
- Passos Marinho GJ, Espellet Klein D and Siqueira Junior CL. 2018. Evaluation of soapberry (*Sapindus saponaria* L.) leaf extract against papaya anthracnose. Summa Phytathology 44(2): 127-131. <http://dx.doi.org/10.1590/0100-5405/175605>
- Peraza-Sánchez SR, Chan-Che EO and Ruiz-Sánchez E. 2005. Screening of Yucatecan plant extracts to control *Colletotrichum gloeosporioides* and isolation of a new pimarane from *Acacia pennatula*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 53:2429-2432. <https://doi.org/10.1021/jf040422i>
- Rodríguez-López ES, González-Prieto JM and Mayek-Pérez N. 2009. Infection of avocado (*Persea americana* Mill.) by *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc.: Biochemical and genetics aspects. Revista Mexicana de Fitopatología 27:53-63. [https://www.google.com.mx/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwi mj\\_nz05jfAhXMmq0KHWZpBVvQFjAAegQIChAB&url=http%3A%2F%2Fwww.scielo.org.mx%2Fscielo.php%3Fscript%3Dsci\\_arttext%26pid%3DS0185-009000100007&usg=AOvVaw2lvMZVlo7c0scZf7hpzViJ](https://www.google.com.mx/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwi mj_nz05jfAhXMmq0KHWZpBVvQFjAAegQIChAB&url=http%3A%2F%2Fwww.scielo.org.mx%2Fscielo.php%3Fscript%3Dsci_arttext%26pid%3DS0185-009000100007&usg=AOvVaw2lvMZVlo7c0scZf7hpzViJ)
- Rupp S, Plesken C, Rumsey S, Dowling M, Schnabel G, Weber RWS and Hahna M. 2017. *Botrytis fragariae*, a new species causing gray mold on Strawberries, shows high frequencies of specific and efflux-Based fungicide resistance. Applied and Environmental Microbiology 83(9): 1-16. <https://doi.org/10.1128/AEM.00269-17>
- Sharma N and Tripathi A. 2008. Effects of *Citrus sinensis* (L.) *Osbeck epicarp* essential oil on growth and morphogenesis of *Aspergillus niger* (L.) Van Tieghem. Microbiological

- Research 163:337–344. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2006.06.009>
- Singanan M, Duraiswamy B and Varadarajan V. 2018. Physicochemical, phytochemicals and antioxidant evaluation of *Guazuma ulmifolia* fruit. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 10(9):87-91. <http://dx.doi.org/10.22159/ijpps.2018v10i9.26778>
- Xu WT, Huang KL, Guo F, Qu W, Yang JJ, Liang ZH and Luo YB. 2007. Postharvest grapefruit seed extract and chitosan treatments of table grapes to control *Botrytis cinerea*. *Postharvest Biology and Technology* 46:86–94. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2007.03.019>
- Zhong Z, Aotegen B, Xu H and Zhao, S. 2014. The influence of chemical structure on the antimicrobial activities of thiosemicarbazone-chitosan. *Cellulose* 21:105–114. <https://doi.org/10.1007/s10570-013-0154-6>