

Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Departamento de Biología



TRABAJO DE DIPLOMA

Actividad antifúngica *in vitro* de extractos de hojas de especies de la familia *Rutaceae* frente a *Mycosphaerella fijiensis* Morelety *Alternaria solani* Sor.

Autor: Frank Eduardo Alamo Hernández

Tutor: Lic. Dianella Iglesias Rodríguez

MSc. Katia Ojito Ramos

Santa Clara

2014

Resumen

Musa spp y *Solanum tuberosum* L. son cultivos altamente demandados a escala mundial que con frecuencia son atacados por los hongos *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, agente causal de la Sigatoka negra, y *Alternaria solana* L causante del tizón temprano. El control de estas enfermedades se realiza fundamentalmente mediante el uso de fungicidas químicos, lo cual ha provocado la aparición de fungoresistencia y perjuicios ambientales, por lo que resulta necesaria la búsqueda de alternativas naturales y efectivas para su manejo, como el empleo de extractos vegetales. La familia *Rutaceae* contiene especies con elevadas concentraciones de compuestos fenólicos, de los cuales se conoce su actividad antifúngica contra hongos fitopatógenos, por lo que pudiera resultar de utilidad el uso de extractos vegetales a partir de especies de esta familia contra *M. fijiensis* y *Alternaria solani*. El objetivo de este trabajo fue determinar la actividad antifúngica *in vitro* de extractos de hojas de la familia *Rutaceae* frente a *Mycosphaerella fijiensis* y *Alternaria solani*. Los extractos se obtuvieron mediante extracción asistida por ultrasonido, se realizó una caracterización fitoquímica y se cuantificó el contenido de fenoles, flavonoides y flavonoles totales. Para cada extracto, se determinó la concentración mínima inhibitoria, el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial y la fracción química que inhibía el crecimiento del hongo mediante bioautografía. En todos los extractos se identificó la presencia de flavonoides y azúcares reductores y las concentraciones de fenoles, flavonoides y flavonoles totales fueron superiores a 39 mg EAG/ mL, 8 mg EQ/mL y 0,04 mg EQ/mL de extracto respectivamente. Los extractos de *Z. nannophyllum* (Urb.) Alain, *Z. pseudodumosum* Beurton y *A. balsamifera* L. en etanol y el de *S. glutinosa* Merr. en metanol mostraron la menor concentración mínima inhibitoria frente a *M. fijiensis* (0,019 mg EAG/mL) y frente a *A. solani* el de *A. balsamifera* en agua (0,312 mg EAG/mL). Los extractos de *S. glutinosa* en metanol y *A. balsamifera* en etanol mostraron porcentajes de inhibición del crecimiento micelial del 100% frente a *M. fijiensis* y los de *Z. pseudodumosum* en metanol y *S. glutinosa* en metanol frente a *A. solani*. Las antraquinonas fueron los compuestos más activos frente a ambos hongos. Este estudio demostró la potencialidad del uso de extractos alcohólicos de hojas de plantas de la familia *Rutaceae* para el control agroecológico de *M. fijiensis* y *A. solani*.

Palabras clave: fenoles, extractos vegetales, plátanos y bananos, papa

Abstract

Musa spp. and *Solanum tuberosum* L. are crops in high demand worldwide often are attacked by fungi *Mycosphaerella fijiensis* and *Alternaria solani*, causal agents of black Sigatoka and early blight, respectively. The control of these diseases is mainly based on the use of chemical fungicides, due to fungal resistance and environmental damages, it is necessary to find natural and effective alternatives for their management, like the use of plant extracts. The Rutaceae family contains species with high concentrations of phenolic compounds, which is known antifungal activity against phytopathogenic fungi, so it could be useful for the use of plant extracts from species of this family against *M. fijiensis* and *A. solani*. The aim of this research was to determine the *in vitro* antifungal activity of leaves of family Rutaceae extracts against *M. fijiensis* and *A. solani*. The extracts were obtained by ultrasound-assisted extraction, phytochemically characterized and the total content of phenols, flavonoids and flavonols was quantified. For each extract, it was determined the percentage of inhibition of the mycelial growth by agar dilution and the fraction that inhibited the fungal growth by the bioautography test. In all the extracts were identified the presence of flavonoids and reduced sugars, and concentrations of phenols, flavonoids and flavonols were more superior to 39 mg EAG/ml, 8mg EAG/ml y 0,04 mg EAG/ml of extracts respectively. The extracts of *Z. nannophyllum*, *Z. pseudodumosum* and *A. balsamifera* in ethanol and the extracts of *S. glutinosa* in methanol showed the lowest minimum inhibitory concentration against *M. fijiensis* (0,019 mg EAG/ml) and against *A. solani* the extracts of *A. balsamifera* in water (0,312 mg EAG/ml). The extracts of *S. glutinosa* in methanol and *A. balsamifera* in ethanol showed percentages of inhibition of the micelial growth of 100% against *M. fijiensis*, and the *Z. pseudodumosum* in methanol and *S. glutinosa* in methanol against *A. solani*. The anthraquinones was the most active compound in front of fungi. This study demonstrated the potential of using of alcoholic extracts of leaves of plants in the Rutaceae family for the agro-ecological control of *M. fijiensis* and *A. solani*.

Keywords: bananas and plantains, phenols, plant extracts, potato.

Índice

1. Introducción.....	1
2.Revisión Bibliográfica.....	3
2.1. <i>Musa spp.</i>	3
2.1.1. <i>Mycosphaerella fijiensis</i>	5
Mecanismos de patogenicidad y sintomatología.....	6
Estrategias de control fitosanitario.....	7
2.2. <i>Solanum tuberosum</i> L.....	9
2.2.1. <i>Alternaria solani</i>	11
Mecanismo de patogenicidady sintomatología.....	12
Estrategias de control fitosanitario.....	13
2.3. Uso de extractos vegetales como productos antifúngicos en <i>Musa spp.</i> y <i>Solanum tuberosum</i>	14
2.4. Características de la familia <i>Rutaceae</i>	20
<i>Zanthoxylum pseudodumosum</i> Beurton.....	21
<i>Zanthoxylum nannophyllum</i> (Urb.) Alain.....	21
<i>Zanthoxylum flavum</i> Vahl.....	22
<i>Amyris balsamifera</i> L.....	22
<i>Swinglea glutinosa</i> Merr.....	22
3. Materiales y métodos.....	24
3.1. Obtención de extractos de hojas de <i>Z. nannophyllum</i> , <i>Z. pseudodumosum</i> , <i>Z. flavum</i> , <i>S. glutinosa</i> y <i>A. balsamifera</i>	24
3.2.Caracterización fitoquímica de extractos de hojas de <i>Z. nannophyllum</i> , <i>Z. pseudodumosum</i> , <i>Z. flavum</i> , <i>S. glutinosa</i> y <i>A. balsamifera</i>	24
3.2.1. Cromatografía en placa delgada.....	25
3.2.2. Cuantificación del contenido de fenoles, flavonoides y flavonoles totales.....	25
3.3. Determinación de la actividad antifúngica <i>in vitro</i> de extractos de hojas de <i>Z. nannophyllum</i> , <i>Z. pseudodumosum</i> , <i>Z. flavum</i> , <i>S. glutinosa</i> y <i>A. balsamifera</i>	26
3.3.1. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) de extractos de hojas de <i>Z. nannophyllum</i> , <i>Z. pseudodumosum</i> , <i>Z. flavum</i> , <i>S. glutinosa</i> y <i>A. balsamifera</i> frente a <i>M. fijiensis</i> y <i>A. solani</i>	26

3.3.2. Cálculo del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de <i>A. solani</i> y <i>M. fijiensis</i> por los extractos de hojas de <i>Z. nannophyllum</i> , <i>Z. pseudodumosum</i> , <i>Z. flavum</i> , <i>S. glutinosa</i> y <i>A. balsamifera</i>	27
3.3.3. Identificación de la fracción química de los extractos de hojas de <i>Z. nannophyllum</i> , <i>Z. pseudodumosum</i> , <i>Z. flavum</i> , <i>S. glutinosa</i> y <i>A. balsamifera</i> que inhibe el crecimiento de <i>A. solani</i> y <i>M. fijiensis</i>	28
3.4. Procesamiento estadístico.....	29
4. Resultados.....	30
4.1. Obtención de extractos de hojas de <i>Z. nannophyllum</i> , <i>Z. pseudodumosum</i> , <i>Z. flavum</i> , <i>S. glutinosa</i> y <i>A. balsamifera</i>	30
4.2. Caracterización fitoquímica de extractos de hojas de <i>Z. nannophyllum</i> , <i>Z. pseudodumosum</i> , <i>Z. flavum</i> , <i>S. glutinosa</i> y <i>A. balsamifera</i>	30
4.2.1. Cromatografía en placa delgada.....	31
4.2.2. Contenido de fenoles, flavonoides y flavonoles totales de extractos de hojas de <i>Z. nannophyllum</i> , <i>Z. pseudodumosum</i> , <i>Z. flavum</i> , <i>S. glutinosa</i> y <i>A. balsamifera</i>	34
4.3. Actividad antifúngica <i>in vitro</i> de extractos de hojas de <i>Z. nannophyllum</i> , <i>Z. pseudodumosum</i> , <i>Z. flavum</i> , <i>S. glutinosa</i> y <i>A. balsamifera</i>	35
4.3.1. Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) de extractos de hojas de <i>Z. nannophyllum</i> , <i>Z. pseudodumosum</i> , <i>Z. flavum</i> , <i>S. glutinosa</i> y <i>A. balsamifera</i> frente a <i>M. fijiensis</i> y <i>A. solani</i>	35
4.3.2. Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de <i>A. solani</i> y <i>M. fijiensis</i> por los extractos de hojas de <i>Z. nannophyllum</i> , <i>Z. pseudodumosum</i> , <i>Z. flavum</i> , <i>S. glutinosa</i> y <i>A. balsamifera</i> frente a <i>M. fijiensis</i> y <i>A. solani</i>	37
4.3.3. Fracción química de los extractos de hojas de <i>Z. nannophyllum</i> , <i>Z. pseudodumosum</i> , <i>Z. flavum</i> , <i>S. glutinosa</i> y <i>A. balsamifera</i> que inhibe el crecimiento de <i>A. solani</i> y <i>M. fijiensis</i>	38
5. Discusión.....	42
5.1 Obtención de extractos de hojas de <i>Z. nannophyllum</i> , <i>Z. pseudodumosum</i> , <i>Z. flavum</i> , <i>S. glutinosa</i> y <i>A. balsamifera</i>	42
5.2. Caracterización fitoquímica de extractos de hojas de <i>Z. nannophyllum</i> , <i>Z. pseudodumosum</i> , <i>Z. flavum</i> , <i>S. glutinosa</i> y <i>A. balsamifera</i>	42
5.2.1. Cromatografía en placa delgada	43
5.2.2. Contenido de fenoles, flavonoides y flavonoles totales de extractos de hojas de <i>Z. nannophyllum</i> , <i>Z. pseudodumosum</i> , <i>Z. flavum</i> , <i>S. glutinosa</i> y <i>A. balsamifera</i>	44
5.3. Actividad antifúngica <i>in vitro</i> de extractos de hojas de <i>Z. nannophyllum</i> , <i>Z. pseudodumosum</i> , <i>Z. flavum</i> , <i>S. glutinosa</i> y <i>A.</i>	45

<i>balsamifera</i>	
5.3.1. Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) de extractos de hojas de <i>Z. nannophyllum</i> , <i>Z. pseudodumosum</i> , <i>Z. flavum</i> , <i>S. glutinosa</i> y <i>A. balsamifera</i> frente a <i>M. fijiensis</i> y <i>A. solani</i>	45
5.3.2. Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de <i>A. solani</i> y <i>M. fijiensis</i> por los extractos de hojas de <i>Z. nannophyllum</i> , <i>Z. pseudodumosum</i> , <i>Z. flavum</i> , <i>S. glutinosa</i> y <i>A. balsamifera</i>	47
5.3. Fracción química de los extractos de hojas de <i>Z. nannophyllum</i> , <i>Z. pseudodumosum</i> , <i>Z. flavum</i> , <i>S. glutinosa</i> y <i>A. balsamifera</i> que inhibe el crecimiento de <i>M. fijiensis</i> y <i>A. solani</i>	49
6. Conclusiones.....	53
7. Recomendaciones.....	54
8. Referencias bibliográficas.....	
Anexos	

1. Introducción

Musa spp y *Solanum tuberosum* L. son cultivos altamente demandados a escala mundial tanto por sus cualidades gustativas como por su aporte de vitaminas y minerales a nuestra dieta (Adeyemi y Oladiji, 2009 y Hamideldin y Hussin, 2014). Su producción y comercialización aumenta continuamente, en gran medida debido al empleo de variedades resistentes de estos cultivares, lo cual propicia mayores rendimientos (Coulibaly *et al.* 2007 y Salomón *et al.*, 2004).

En Cuba, la producción de *Musa* spp. se encuentra afectada debido a la ineficiencia de los productores primarios y a la incidencia de enfermedades propias del cultivo (Jacome *et al.* , 2002) como la Sigatoka negra, causada por *Mycosphaerella fijiensis* Morelet (Vicente, 2009). Por otra parte, la producción de *S. tuberosum* no es exitosa porque la mayor parte de la semilla de papa que se utiliza es importada, obteniéndose el resto nacionalmente pero no con la misma calidad (Salomón *et al.*, 2012). Además, debido a las condiciones climáticas existentes en la isla se desarrollan enfermedades foliares causadas por hongos como *Alternaria solani* Sor. (Leiva *et al.*, 2006).

Tradicionalmente, el tratamiento de estas enfermedades se efectúa mediante el empleo de fungicidas de origen químico (Muiño *et al.*, 2010 y Martínez *et. al.*, 2011) estrategia que por su efecto acumulativo provoca una elevada contaminación ambiental y daños severos a la salud humana. Por esta razón, surge como alternativa el empleo de extractos vegetales que son ambientalmente seguros, de baja toxicidad y cuya relación costo /beneficio es muy favorable, por lo cual pueden desempeñar un rol fundamental en un sistema de manejo integrado para el control de estas enfermedades.

La familia *Rutaceae* ha sido empleada para la obtención de extractos vegetales, debido a la presencia en la mayor parte de sus representantes de metabolitos secundarios con actividad antifúngica (Casado *et al.* 2011). En este sentido, el género más utilizado es *Citrus*, del cual se han obtenido extractos vegetales a partir de la corteza, hesperidio o el jugo de sus frutos (Bejarano *et al.*, 2009) siendo poco empleadas las hojas con este propósito. Sin embargo, en el departamento de Biología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, se han realizado estudios que emplean extractos obtenidos de hojas de *Citrus aurantium* L., *Citrus aurantium* L. subf. *sinensis* L. M. Hiroe, *Citrus reticulata* Blanco, *Citrus aurantiifolia* Christm. Swingle y *Citrus latifolia* Tanaka ex Yu. Tanaka, en los cuales se han cuantificado un elevado contenido de metabolitos bioactivos (Herrera, 2011) con

actividad antifúngica *in vitro* frente a los patógenos de tomate *Passalora fulva* (Cooke) U. Braun & Crous y *Alternaria solani* (González, 2013).

Teniendo en cuenta que los estudios realizados con especie de cítricos referencian que sus hojas constituyen una importante fuente de metabolitos secundarios con actividad antifúngica (Iglesias, 2012) y que en la familia *Rutaceae* existen otros géneros como *Zanthoxylum*, *Amyris* y *Swinglea* en cuya composición fitoquímica destacan compuestos bioactivos tales como alcaloides (Taborda *et al.*, 2007), terpenos (Dubey *et al.*, 2011) y flavonoides (Toro *et al.*, 2010); es posible, que especies endémicas de Cuba como *Zanthoxylum nannophyllum* y *Zanthoxylum pseudodumosum* de las cuales no existen estudios publicados, resulten una fuente similar de compuestos con actividad antifúngica que puede ser empleada con éxito. La importancia del estudio de estas especies reside en que se pudiera establecer una posible línea de producción nacional-endémica de biofungicidas, debido a que son propias del territorio nacional, además de evidenciar la riqueza farmacológica y etnobotánica de la flora de Cuba.

Objetivo general

1. Determinar la actividad antifúngica *in vitro* de extractos de hojas de *Zanthoxylum nannophyllum*, *Zanthoxylum pseudodumosum*, *Zanthoxylum flavum*, *Amyris balsamifera* y *Swinglea glutinosa* frente a *Mycosphaerella fijiensis* y *Alternaria solani*.

Objetivos específicos

2. Caracterizar fitoquímicamente los extractos de hojas de *Zanthoxylum nannophyllum*, *Zanthoxylum pseudodumosum*, *Zanthoxylum flavum*, *Amyris balsamifera* y *Swinglea glutinosa*.
3. Calcular el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de *M. fijiensis* y *A. solani* por los extractos de hojas de *Zanthoxylum nannophyllum*, *Zanthoxylum pseudodumosum*, *Zanthoxylum flavum*, *Amyris balsamifera* y *Swinglea glutinosa*.
4. Identificar la fracción química de los extractos con actividad antifúngica frente a *Mycosphaerella fijiensis* y *Alternaria solani*.

2. Revisión bibliográfica

2.1. *Musa* spp.

Musa spp. es oriundo del sudeste asiático, principalmente de las zonas de Filipinas, India y Nueva Guinea (Palencia *et al.*, 2006). Este cultivo se encuentra presente de forma significativa en más de 130 países, desde su lugar de origen hasta Oceanía y América del Sur. Además, se cultiva en regiones como en Sudáfrica, Líbano, Israel e Islas Canarias, lugares donde, además, son aptas las variedades enanas del grupo Dwarf Cavendish, resistentes al frío necesita y las cuales necesitan riego adicional (Franz Augstburger *et al.*, 2002).

El cultivo de *Musa* spp. se practica con éxito en zonas tropicales y subtropicales debido a las elevadas temperaturas y humedad relativa. Además, se ve favorecido por precipitaciones que oscilan entre los 120-150 mm mensuales. Sin embargo, no es conveniente para su desarrollo la exposición a períodos largos de sequía o cortos de inundaciones (Sáez Sáez-Puche, 2003).

Musa spp. se utiliza principalmente para su consumo fresco, siendo sólo una pequeña parte la que se comercializa en forma deshidratada. Constituye una de las frutas tropicales más importantes desde el punto de vista económico a nivel mundial, sólo superada por el trigo (*Triticum* spp.), el arroz (*Oryza sativa* Hochst. ex Steud.) y el maíz (*Zea mays* L.). Su producción es continua durante todo el año, lo que la hace especialmente valiosa como alimento en la época entre cosechas de otras especies vegetales (Palencia *et al.*, 2006).

En el cultivo comercial de *Musa* spp. tienen mayor importancia las variedades del grupo Cavendish, aunque existen variedades comerciales ampliamente divulgadas, como las procedentes de algunas localidades de regiones tropicales, que se emplean de diversas maneras en los sistemas de producción y se pueden combinar entre ellas (Franz Augstburger *et al.*, 2002). De esta forma, es comercializado internacionalmente a través de empresas multinacionales establecidas en Ecuador, Perú, Colombia y Brasil, siendo América del Sur la principal fuente regional de exportación, debido a que Ecuador genera aproximadamente un tercio de las exportaciones globales (Torres *et al.*, 2009). No obstante, el principal productor es la India, donde se produce la cuarta parte de los frutos comercializados en el mundo (Sáez Sáez-Puche, 2003).

En Cuba, la producción de *Musa* spp. se ha visto considerablemente afectada desde el año 1990 debido a la ineficiencia de los productores primarios y a la incidencia de las enfermedades propias del cultivo (González *et al.* 2006). Esta última, constituye la causa principal de que la producción real se encuentre por debajo de la potencialidad productiva de las variedades empleadas, lo que ha limitado el cultivo de algunos clones de gran demanda y calidad comercial como son los del subgrupo Cavendish (AAA) (Morales *et al.*, 2010).

A partir del año 1990, con el objetivo de mejorar la producción de esta fruta se introdujeron nuevos clones procedentes de la Fundación Hondureña de Investigaciones Agrícolas (FHIA), con el apoyo del banco de germoplasma del género *Musa* del Instituto de Investigaciones de Viandas Tropicales (INIVIT). Estos clones se usaron para realizar estudios comparativos más profundos en Cuba, con el fin de investigar la variabilidad genética de *Musa* spp. existente, así como para lograr el incremento de esta variedad con germoplasma obtenido a través de diferentes métodos de cruzamiento y propagación, ya sean tradicionales o biotecnológicos (variación somaclonal, mutagénesis y transformación genética), con vistas a conformar futuros programas de mejora más eficientes (González *et al.* 2006).

En este sentido, se introdujeron clones como los tetraploides pertenecientes a los subgrupos Cavendish (AAA), Plantain (AAB) y Burros (ABB), que poseían altos rendimientos pero eran poco tolerantes a las principales plagas y enfermedades que afectaban a este cultivo (Milán *et al.*, 2013). Es por ello que, en muchas zonas de Cuba (Guantánamo, La Habana y Ciego de Ávila) se han sustituido los cultivares triploides por tetraploides (AAAA, AAAB, AABB) que han tenido una buena aceptación por parte de la población cubana, por su sabor y su consistencia (González *et al.*, 2006).

De modo similar, se encuentran introducidos, pero en menor cantidad de áreas, otros clones como FHIA-01 (AAAB) y FHIA-02 (AAAB), los cuales presentan caracteres con cierta resistencia a la enfermedad del rayado negro de la hoja o Sigatoka negra y a las principales especies de nemátodos que afectan el cultivo (Leiva-Mora, 2006). Además, se ha utilizado el clon FHIA-25 (AAA), con el que se han obtenido rendimientos superiores al resto de los clones y una significativa resistencia a Sigatoka negra y nemátodos. También, se ha generalizado el clon Manzano INIVIT, que aunque su grupo genómico sea AAB, se

utiliza para consumo fresco (fruta), por presentar similitud con el Manzano criollo (Milán *et al.* 2013).

Aunque se ejecuten programas de mejoras genéticas con resultados positivos, debido a las condiciones climáticas características de las regiones donde se cultiva *Musa* spp., esta planta es atacada por bacterias, virus y hongos, siendo estos últimos los causantes de las enfermedades más destructivas (Leiva-Mora, 2006). Por el significado de su afectación, las enfermedades foliares son las de mayor interés por la comunidad científica y estas incluyen a tres hongos ascomicetes patógenos relacionados entre sí: *Mycosphaerella fijiensis* Morelet (anamorfo *Pseudocercospora fijiensis* Deighton) que provoca la Sigatoka negra, *M. musicola* Leach ex Mulder (anamorfo *P. musae* Zimm.), responsable de la Sigatoka amarilla, y *M. eumusae* Deighton, agente causal de la mancha foliar Septoria (Hidalgo *et al.*, 2006).

Estos hongos son difíciles de distinguir basándose en su sintomatología ya que las lesiones que producen constan de gran parecido, además de que sus estados sexuales (teleomorfos) son similares. No obstante, las especies pueden ser identificadas basándose en las diferencias morfológicas entre sus estados asexuales (anamorfos), independientemente de si son observados directamente en las hojas enfermas o después de aislarlas (Jean Carlier *et al.*, 2003). De estas tres especies, *M. musicola* provoca una defoliación extensa en la planta, pero *M. fijiensis* se caracteriza por tener un mecanismo de patogenicidad más fuerte en un amplio rango de hospedantes, lo que la hace la patología foliar de *Musa* spp. más destructiva (Barrios, 2006).

2.1.1. *Mycosphaerella fijiensis*

M. fijiensis fue identificado por primera vez por Stover como el hongo causante de la Sigatoka negra, siendo descrita como un hongo ascomicete heterotálico por Leach en 1964. En consecuencia con estos estudios y según Morelet, *M. fijiensis* pertenece al reino Fungi, phylum *Ascomycota*, clase *Dothideomycetes*, orden *Capnodiales*, familia *Mycosphaerellaceae* (Bonilla, 2009).

Este hongo se reproduce de forma asexual y sexual durante su ciclo de vida, lo que dificulta su manejo (Martínez *et al.*, 2011). La fase asexual (*P. fijiensis*), se presenta en las primeras lesiones de la enfermedad donde se observa la aparición de un número

relativamente bajo de conidióforos, en tanto la fase sexual es la más importante en la expansión de la enfermedad al producir un gran número de ascosporas a partir de estructuras llamadas pseudotecios. Estas ascosporas son septadas, hialinas con 14-20 μm de longitud y de 4-6 μm de ancho (Mosquera *et al.*, 2009).

M. fijiensis ha alcanzado una amplia variedad genética y patogénica debido a su gran capacidad reproductiva que le ha permitido adaptarse a diversas condiciones ambientales. De esta forma, las abundantes precipitaciones, temperaturas cálidas y una alta humedad relativa del aire favorecen su permanencia en el hospedante y son determinantes en el nivel de severidad de ataque en los cultivos (definen la dinámica del inóculo, o sea el desarrollo, permanencia e impacto de la enfermedad) (Sáez Sáez-Puche, 2003). Además, a consecuencia de la variada disponibilidad de estructuras reproductivas (asexuales y sexuales) que presenta, se cree que la dispersión de la enfermedad a larga distancia se realiza por la transferencia de germoplasma (retoños infectados u hojas enfermas) y por ascosporas mediante el viento (Jean Carlier *et al.*, 2003).

Mecanismo de patogenicidad y sintomatología

El establecimiento de *M. fijiensis* en un cultivar susceptible se inicia con la penetración estomatal y un esparcimiento intercelular debido a un modo de nutrición biotrófica que tiene lugar inicialmente durante un periodo de 3-4 semanas, antes de que aparezcan los síntomas necróticos en las hojas (Torres *et al.*, 2009). Los conidióforos aparecen en la etapa de primeras rayas, principalmente en la superficie inferior del lado abaxial de la hoja, dando lugar a los conidios a partir de las primeras lesiones de la enfermedad que son en forma de pizcas o estrías (Barrios, 2006). Con el desarrollo de la lesión, las cavidades estomáticas colonizadas por el hongo son rápidamente utilizadas para la fecundación de hifas mediante espermacios compatibles que dan origen a peritecios; estructuras fructíferas sexuales que contienen ascas con ocho ascosporas, las cuales aparecen cuando el tejido se necrosa y adquiere una coloración café claro a gris (Folleco-Zapata, 2006).

Los conidios son obclavados o cilíndricos-obclavados, rectos o curvados, de coloración oliváceo muy pálido, y constituyen el medio más importantes de propagación local, ya que su liberación es principalmente a través del agua en forma de lluvia o rocío (Martínez *et al.*, 2011). En el segundo estado de estría hay una mayor producción de conidios con mayor

esporulación y facilidad de diseminación por causa del viento y el agua (Jean Carlier *et al.*, 2003).

Según Barrios (2006), la enfermedad produce inicialmente pequeñas manchas de color blancuzco o amarillo con pequeños puntos negros en la zona central, siendo este síntoma visible en el lado abaxial de la hoja. Luego surge una raya de color café visible en el lado abaxial de la hoja que cambia progresivamente a negro. Posteriormente, la raya se hace más grande y bajo ciertas condiciones (poco inóculo y condiciones climáticas favorables), puede alcanzar una longitud de 2-3 cm hasta que la infección se vuelve visible por el haz de la hoja, como una mancha negra claramente apreciada a simple vista. Finalmente, la mancha se vuelve totalmente negra, y se forma un halo amarillo que la rodea y se extiende en el lado adaxial de la hoja. El centro de la mancha negra se seca y adquiere un color gris claro rodeado por un halo de color amarillo brillante.

M. fijiensis provoca una destrucción rápida del área foliar (pérdida parcial o total del follaje) acompañada de una fuerte necrosis, además de la reducción de la capacidad fotosintética por lo que la planta llega a la floración con un reducido número de hojas funcionales. También, estimula la maduración precoz de los racimos y daña la calidad de la fruta, al reducir hasta en un 60% el peso de los racimos, lo que genera grandes pérdidas económicas. (Palencia *et al.*, 2006). Independientemente del origen de la infección y de las condiciones climáticas imperantes, el estado nutricional de la planta es importante para la permanencia y desarrollo de la enfermedad (Leiva-Mora, 2006). En este sentido, se ha determinado que altas concentraciones de nitrógeno reducen la producción de compuestos fenólicos con acción fungistática, y de lignina en las hojas, disminuyendo la resistencia a los patógenos (Hernández *et al.*, 2009). En contraste, el fósforo presente en la planta favorece el crecimiento y aumenta la resistencia de la planta a la infección (Torres *et al.*, 2009).

Estrategias de control fitosanitario

El control de esta enfermedad se realiza fundamentalmente mediante el empleo de fungicidas químicos, realizándose con estos una aplicación alterna y en mezcla de fungicidas protectores y sistémicos. Dentro de los fungicidas protectores se incluyen el mancozeb (Dow AgroSciences Colombia S.A) cuyo principio activo es zinc con etileno bis ditiocarbamato de manganeso y el clorotalonil (HELM en Argentina) cuyo principio activo

es metil-N-fenilacetil. Entre los sistémicos se destacan los benzimidazoles, aminas, triazoles, estrobirulinas y anilinopirimidinas (Álvarez y Delgadillo, 2004). Además, se encuentran en proceso de registro nuevos fungicidas de dos grupos químicos nunca antes utilizados en plátanos que son las carboxamidas y guanidinas (Martínez *et al.*, 2011).

M. fijiensis ha desarrollado resistencia a los benzimidazoles, triazoles y estrobirulinas, lo cual ha reducido su eficacia en el campo y ha limitado su uso. Se ha incrementado el empleo de aminas y anilinopirimidinas, que suponen un riesgo debido al aumento en la presión de selección que se ejerce sobre el patógeno, que se refiere a la interacción selectiva que tiene la planta frente a diferentes cepas del patógeno reaccionando de manera diferente frente a cada una de ellas (Martínez-Guzmán, 2010).

Agrotecnia

Con la finalidad de generar un ambiente menos favorable para la enfermedad o afectar de manera considerable la reproducción, diseminación e infección del patógeno se han modificado ciertas prácticas del cultivo orientadas a la destrucción de los conidios debido a que los mismos son vitales para la propagación de la enfermedad (Jean Carlier *et al.*, 2003). Entre estas medidas se incluyen: el control de malezas, el drenaje adecuado, la nutrición balanceada, la correcta distribución de plantas y la deshoja sanitaria (despunte y cirugía) con intervalos semanales (una semana si y la otra no). Esta última junto a la floración (eliminación en concordancia con la floración de las tres hojas más viejas de cada planta) constituye una de las prácticas más utilizada para la reducción del inóculo del patógeno (Martínez *et al.*, 2011).

Control biológico

La aparición de fungoresistencia por parte de *M. fijiensis* a consecuencia del uso indiscriminado de fungicidas químicos, ha favorecido la aparición de investigaciones orientadas a la búsqueda de alternativas más saludables respecto al control de la Sigatoka negra, entre las cuales el hongo antagonista *Trichoderma* constituye una opción viable. En este sentido, existen estudios que demuestran que cepas de *Trichoderma* spp. tienen efectos antibióticos y micoparásitos sobre *M. fijiensis* al inhibir el crecimiento del micelio del hongo a partir de la producción de glucanasas y quitinasas (Ochoa, 2002). El antagonismo de *Trichoderma* spp. se basa en la colonización del área que ocupa el hospedante ocasionando una competencia por espacio y nutrientes. Esta constituye una

manera de ejercer el biocontrol a partir de la reducción del espacio y el detenimiento del crecimiento micelial (Arzate-Vega *et al.*, 2006).

De modo similar, se ha probado el efecto de otros hongos biocontroladores como *Paecilomyces lilacinus* Thom. Samson, *Penicillium* spp. y *Fusarium* spp. capaces de producir metabolitos quitinolíticos que inhiben significativamente la germinación de las ascosporas de *M. fijiensis* (Carr, 2009).

El empleo de extractos vegetales constituye otra alternativa sostenible en el control de esta patología. En este sentido, se han realizado estudios *in vivo* donde se ha logrado reducir el índice de infección de *M. fijiensis* a valores de 25-33% cuando se emplearon extractos de *Swinglea glutinosa* Merr., *Salvia officinalis* Pall., *Azadirachta indica* A. Juss y *Carica papaya* L. (Marín *et al.*, 2008).

2.2. *Solanum tuberosum* L.

S. tuberosum (papa) es originario de las áreas montañosas de los Andes en América del Sur, en los alrededores del lago Titicaca y Perú. Fue introducido en Europa en el siglo XVI y de allí llevada al resto del mundo, desarrollándose en ese tiempo variedades de maduración precoz adaptadas a las condiciones del norte, especialmente a días más cortos. Se siembra en más de 125 países y más de un billón de personas alrededor del mundo la consumen (Estévez- González, 2010).

La papa aporta una notable cantidad de carbohidratos a la dieta, por lo que resulta indispensable en el consumo básico de millones de personas en países subdesarrollados de América del Sur, África y Asia. En Perú, la papa es el principal cultivo en superficie sembrada y representa el 25% de la producción nacional agraria, además constituye la base de la alimentación de la zona andina (Chávez, 2008).

La importancia económica de la papa, se basa en su elevada capacidad de producir sustancias alimenticias por unidad de superficie en un período de tiempo relativamente corto, siendo esta capacidad varias veces mayor, que la de los cereales, lo que le permite estar contemplada en el tercer lugar entre los 10 cultivos con el más alto valor de producción ha-día (López, 2004). Además, el almidón de la papa se utiliza para la elaboración de papel, textiles, pegamentos, bebidas alcohólicas y varios alimentos que son de gran utilidad para el hombre y la industria (Andrade *et al.*, 2002).

Se cultiva fundamentalmente en las regiones templadas, donde actualmente se concentra más del 90% de la producción mundial y muy poco en las regiones tropicales húmedas, debido a su tendencia a ser infestada por numerosos organismos patógenos y plagas (Estévez *et al.*, 2007). China es el primer productor mundial con 730 000 t, seguida por Rusia con 664 000 t e India con 250 000 t; siendo los Países Bajos los principales exportadores a nivel mundial con 1,5 millones de t, seguido por Alemania con 1,1 millones de t y Francia con 1 millón de t (FAOSTAT, 2013).

Según datos de la FAO, el valor de la producción mundial supera los 307,4 millones de t en 18 millones de ha, con un rendimiento medio de 16,5 t (FAOSTAT, 2010) debido a que esta planta posee una gran capacidad de adaptación, por lo que es capaz de desarrollarse en condiciones y climas muy diversos (Norba, 2008).

En Cuba, a partir de 1959 es que se comienza a prestar especial atención al cultivo de la papa, incrementándose la superficie cultivable de 7 220 ha en 1959 a 16 800 ha en la campaña 1989-1990 (Vázquez *et al.*, 2014). No obstante, hay limitantes en el hecho de tener y mantener una producción totalmente propia ya que la mayor parte de la semilla de papa que se utiliza en nuestro país es importada desde Canadá y Europa, obteniéndose el resto nacionalmente pero no con la misma calidad (Quiñones *et al.*, 2004). De esta forma, en el sector productivo se emplean 33 variedades comerciales foráneas mayormente holandesas, desarrollándose bajo riego por aspersión durante su ciclo productivo (Estévez-González, 2006).

Las patologías fúngicas son las que ocasionan mayores afectaciones económicas al cultivo de la papa (Van der Waals *et al.*, 2003). Los daños más graves son provocados por los hongos foliares como *Phytophthora infestans* Mont. Causante del tizón tardío y por *Alternaria solani* Sor. causante del tizón temprano (Leiva *et al.*, 2006). El tizón temprano se presenta con mayor incidencia principalmente en países como India, Uruguay, Brasil y en la región del Caribe, o en otros continentes como África, provocando pérdidas entre 10-50% de los rendimientos totales del cultivo (Martín-Thurston, 2005).

2.2.1. *Alternaria solani*

A. solani fue descrito por primera vez por Ellis y Martín en 1882 a partir de hojas muertas en campos de papa de New Jersey y nombrado *Macrosporium solani* hasta que en 1896 Sorauer lo nombró *Alternaria solani*. Esta especie se ubica taxonómicamente dentro de los hongos imperfectos, phylum *Ascomycota*, clase *Dothideomycetes*, orden Pleosporales y familia *Pleosporales* (Agrios, 2005).

Es un hongo mitospórico, lo cual indica que sus esporas son producidas solamente por división nuclear mitótica. Produce conidios en varias formas, pero nunca por división del citoplasma en el esporangio (Deacon, 2006). Presenta un micelio ramificado y septado, los conidióforos son cortos y oscuros y se pueden presentar individuales o agrupados. Los conidios son muriformes, de color marrón oscuro y presentan una prolongación filiforme, hialina, a menudo bifurcada (Pupo *et al.*, 2011).

Mecanismo de patogenicidad y sintomatología

El hongo ingresa a los tubérculos generalmente a través de las heridas y aberturas naturales, iniciando su desarrollo y produciendo esporangios que pueden infectar los tejidos suculentos de los tubérculos sanos (Gudmestad *et al.*, 2013). Los esporangios que se incrementan bajo estas condiciones, son llevados por el aire y diseminados hacia los campos de papa en desarrollo. Finalmente, las oosporas, que se encuentran en los residuos vegetales o en el suelo y tienen una viabilidad de 2 años, constituyen otra fuente de infección (Torres *et al.*, 2005). Sin embargo, en el campo el hongo a veces se presenta sólo en la etapa de senescencia (Gudmestad *et al.*, 2013).

Los conidióforos se encuentran solos o formando pequeños grupos, son rectos o flexuosos, septados, de color variable (de marrón pálido a marrón oliváceo), solitarios o en grupos. Los conidios del hongo germinan e ingresan directamente a las hojas de la planta a través de la epidermis. La infección se inicia en las hojas del tercio inferior de la planta y ocurre, a partir de los 45 días después de la siembra. Los tubérculos en desarrollo son susceptibles pero los tubérculos maduros son resistentes (Yanar *et al.*, 2011).

El patógeno sobrevive mediante el micelio presente en los tubérculos infectados que constituyen residuos de cosechas. Este micelio bajo condiciones ambientales favorables

produce esporangios, los cuales se diseminan por el aire o con la neblina a otros campos de papa en desarrollo (Veitía *et al.*, 2007). El crecimiento máximo de este micelio se ve favorecido con temperaturas de 27°C, mientras que los conidióforos y conidios requieren de una temperatura óptima entre 19-23°C (Escuredo *et al.*, 2010). La enfermedad tiene mayor incidencia cuando los campos de papa están expuestos a una alternancia de períodos lluviosos y secos y cuando el riego por aspersión se practica de manera frecuente (Torres *et al.*, 2005).

Los síntomas son visibles en las hojas de la planta a partir de la aparición de pequeñas manchas irregulares de color verde pálido a verde oscuro. En condiciones ambientales óptimas de temperatura de 12-15°C y humedad relativa 100%, estas pequeñas manchas irregulares que se desarrollan generalmente en los bordes y en el ápice de los folíolos crecen rápidamente, dando lugar a lesiones necróticas grandes de color marrón a negro. En el lado abaxial de las hojas, coincidente con las manchas que se observan en el lado adaxial, se desarrolla una capa blanquecina, constituida por esporangioforos y esporangios (Estévez- González, 2010). Las manchas se rodean de un halo clorótico y forman lesiones necróticas con anillos concéntricos de color marrón claro en todo el área foliar, estas pueden llegar a medir aproximadamente hasta 2 cm de diámetro, pero su crecimiento está restringido por las nervaduras de los folíolos. Además, pueden unirse y formar áreas muy grandes que abarcan gran parte de las hojas. Cuando esto ocurre, se produce defoliación y muerte temprana de la planta (Estévez, 2006).

En los tallos, los síntomas se presentan como lesiones oscuras continuas, ubicadas generalmente en el tercio medio o superior de la planta y alcanzan en algunos casos más de 10 cm de longitud. Estas lesiones son frágiles y de consistencia vidriosa, se quiebran fácilmente con la fuerza del viento o por contacto con las maquinaria (tractores) o las personas que transitan por el campo durante las labores culturales (Estévez-González, 2010).

En los tubérculos afectados que aparentemente se muestran sanos al momento del almacenamiento, la enfermedad se desarrolla lentamente y el hongo esporula, produciendo así nuevas estructuras infectivas. Sin embargo, existen elevadas probabilidades de que los tubérculos infectados puedan destruirse completamente, debido a que las lesiones son puerta de entrada para bacterias como *Erwinia* spp. y hongos

como *Fusarium* spp. que se encuentran en la superficie de los tubérculos y causan pudrición total del mismo (Torres *et al.*, 2005).

Estrategias de control fitosanitario

El control de esta enfermedad se realiza mediante la ejecución de un conjunto de medidas agrotécnicas orientadas a eliminar los residuos de plantas infectadas, en las cuales se conserva el inóculo, sin incurrir en el riesgo constante de infección (Rodríguez, 2009). Una parte importante de este programa de control consiste en evitar el riego por aspersión, utilizando preferentemente el riego por goteo, para de esta manera evitar cualquier posible propagación de las esporas del hongo. Además, se emplean como semilla tubérculos sanos (Estévez- González, 2010).

Otra variante prometedora consiste en el uso de variedades resistentes de papa, lo cual constituye una seguridad de producción futura, a partir de un incremento considerable en la productividad y adaptabilidad del cultivo a las condiciones tropicales. No obstante, esta opción no deja de tener detractores, pues la obtención de variedades resistentes a *A. solani* y con desarrollo aceptable, resulta dificultosa debido a que la papa posee un genoma altamente heterocigótico y poliploide, que dificulta el cruzamiento genético y por tanto el mejoramiento genético del cultivo por reproducción sexual (Veitía, 2000).

Control químico

El control químico se realiza a través de la aplicación de fungicidas tradicionales de contacto como mancozeb (Dow AgroSciences Colombia S.A) cuyo principio activo es zinc con etileno bis-ditiocarbamato de manganeso y Maneb (Dow AgroSciences Colombia S.A) con principio activo de Sales de Zn + formaldehído. Estos actúan en la superficie de las hojas inhibiendo el crecimiento micelial y la germinación de las zoosporas con un efecto residual corto. También, se emplean clortalonil (HELM en Argentina) con principio activo metil-N-fenilacetil y Zineb (SYNGENTA AGRO, S.A) con principio activo Zinebzetilen-bis-dico-carbamato de Zn, cuya acción es antiesporulante y se basa en la reducción de la diseminación fúngica. Además, del Captafol (Grupo Pujol San José, Costa Rica) y el Daconil (SYNGENTA CROP PROTECTION S.A) con principio activo clortalonil + carbendazepina que actúan inhibiendo la movilidad de las zoosporas (Álvarez y Delgadillo, 2004). Similarmente, en trabajos realizados en San Ramón, Perú se comprobó que combinando dyrene (cuyo principio activo es el 4,6-dicloro-N-[2-clorofenil]-1,3,5-

triazin-2-amina) y mancozeb, se controlaba eficientemente la enfermedad (Torres-H. *et al.*, 2005).

Control biológico

Frente a este hongo, el uso de alternativas ambientalmente seguras se ha visto potenciado por resultados promisorios obtenidos con el género *Trichoderma*. De esta forma, en estudios consultados se evidencia que con el empleo de cepas de *T. harzianum* Rifai, *T. viride* Pers. Y *T. virens* (Miller *et al.*) von Arx se obtuvieron porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de 72%, 66% y 59%, respectivamente (Ganie *et al.*, 2013). Además, Reinoso *et al.* (2007) aisló un total de 85 cepas bacterianas, de las cuales 18 mostraron efecto antagónico *in vitro* frente a *A. solani* debido a que los metabolitos producidos por estas cepas inhibieron en más de 50% el crecimiento micelial del hongo. También, seis cepas de *Trichoderma* redujeron significativamente los diámetros de las colonias de *A. solani* en comparación con el control usado, resultando la de *T. harzianum* la más efectiva en la reducción del diámetro de la colonia de *A. solani* (Raziq *et al.*, 2010).

Otra alternativa de control biológico lo constituye el empleo de extractos vegetales. En este sentido, se ha estudiado el uso de extractos de flores de *Tagetes erecta* L., obteniéndose resultados promisorios (porcentajes de inhibición del crecimiento micelial superiores al 65 %), superiores a los alcanzados con el zineb (fungicida comercial) (Pupo *et al.*, 2009). De modo similar, con extractos de hojas de *Lauris nobilis* L. y *Salvia officinalis* Pall. se alcanzaron porcentajes de inhibición de crecimiento micelial del 79% y 76%, respectivamente (Yanar *et al.*, 2011), así como con extractos de hojas y flores de *Lantana camara* L. y la planta completa de *Cleome viscosa* L., donde en el cálculo de la inhibición de la germinación de conidios se alcanzaron resultados superiores al 80% (Pupo *et al.*, 2010).

2.3. Uso de extractos vegetales como productos antifúngicos en *Musa* spp. y *Solanum tuberosum*

El uso de extractos vegetales constituye una alternativa viable en comparación al empleo de fungicidas químicos. Con estos biopreparados se han alcanzado resultados prometedores (Tabla I), debido a que poseen un origen biológico, son biodegradables y

manifiestan un impacto negativo mínimo sobre la salud humana y el medio ambiente (Pedroso *et al.*, 2012).

Tabla I. Extractos vegetales con actividad antifúngica frente a hongos patógenos de *Musa* spp. y *Solanum tuberosum*

Hongo patógeno	Extractos vegetales	Actividad antifúngica <i>in vitro</i> / <i>in vivo</i>	Referencias
<i>M. fijiensis</i>	<i>Plantago major</i> L.	67% Inhibición del crecimiento micelial	López <i>et al.</i> (2004)
	<i>Ruta graveolens</i> L.	72% Inhibición del crecimiento micelial	
	<i>Lippia alba</i> Mill	83% Inhibición del crecimiento micelial	
	<i>Cestrum</i> spp.L.	91% Inhibición del crecimiento micelial	Trujillo (2007)
	<i>Lepidaplo alehmannii</i> (Engl) H. Rob.	89% Inhibición del crecimiento micelial	
	<i>Mikania iloensis</i> Hieron.	88% Inhibición del crecimiento micelial	
	<i>Cinnamomum zeylanicum</i> Blume	22 mm de radio de inhibición del crecimiento micelial	Folleco-Zapata (2006)
	<i>Azadirachata indica</i> Juss	18 mm de radio de inhibición del crecimiento micelial	
	<i>Lantana camara</i> L.	8 mm de radio de inhibición del crecimiento micelial	
	<i>Momordica charantia</i> L.	80% de reducción del índice de infección	Morales <i>et al.</i> (2010)
	<i>Salvia officinalis</i> Pall.	80% de reducción del índice de infección	
	<i>Cymbopogon citratus</i> (DC) Stapf	80% de reducción del índice de infección	
			Mosquera <i>et al.</i> (2009)
	<i>Clusia multiflora</i> Kunth	92% Inhibición del crecimiento micelial	
	<i>Topobea cf discolo</i>	100% Inhibición del	

Hongo patógeno	Extractos vegetales	Actividad antifúngica <i>in vitro / in vivo</i>	Referencias
<i>F. oxysporum</i> f <i>sp.cubense</i>	<i>rL.</i>	crecimiento micelial	
	<i>Passiflora danielii Killip</i>	95% Inhibición del crecimiento micelial	
	<i>Swinglea glutinosa</i> Merr.	80% Inhibición del crecimiento micelial	Marín (2008)
	<i>Salvia officinalis</i> Pall.	80% Inhibición del crecimiento micelial	
	<i>Carica papaya</i> L.	80% Inhibición del crecimiento micelial	
	<i>Phyllanthus niruri</i> L.	92% inhibición del crecimiento micelial	Sanabria <i>et al.</i> (2006)
	<i>Lippia organoides</i> (H.B.K.).	90 % inhibición del crecimiento micelial	
<i>A. solani</i>	<i>Cereus deficiens</i> Otto &Dietr.	73% inhibición del crecimiento micelial	Zapata <i>et al.</i> (2003)
	<i>L. camara</i>	80% Inhibición de la germinación de los conidios	Pupo <i>et al.</i> (2011)
	<i>Cleome viscosa</i> L.	80% Inhibición de la germinación de los conidios	
	<i>Lippia dulcis</i> Trev.	93% Inhibición de la germinación de los conidios	
	<i>Careya</i> ArbóreaRoxb.	14 mm de inhibición del crecimiento micelial	Sambath <i>et al.</i> (2006)
	<i>Yuccaschidigera</i> Ortgies	76% Inhibición del crecimiento micelial	
	<i>Quillja saponaria</i> L.	57% Inhibición del crecimiento micelial	Chapagain (2007)
	<i>Cinnamomum zeylanicum</i> Blume	100% Inhibición del crecimiento micelial	Mishra <i>et al.</i> (2009)
	<i>Acorus calamus</i> L.	89% Inhibición del crecimiento micelial	Singh <i>et al.</i> (2010)
	<i>Celestrus paniculatus</i> L.	79% Inhibición del crecimiento micelial	
<i>Tagetes erecta</i> L.	65% Inhibición del crecimiento micelial	Pupo <i>et al.</i> (2009)	

Hongo patógeno	Extractos vegetales	Actividad antifúngica <i>in vitro / in vivo</i>	Referencias
	<i>Lauris nobilis</i> L.	79% Inhibición del crecimiento micelial	Yanar <i>et al.</i> (2011)
	<i>Datura stramonium</i> Thunb.	68% de reducción del índice de infección	Nashwa (2013)
	<i>Azadirachta indica</i> A. Juss	55% de reducción del índice de infección	
	<i>Aliumsativum</i> L.	71% de reducción del índice de infección	
	<i>Cyperus capitatus</i> Vend.	91% Inhibición del crecimiento micelial	Maswada y Abd-Allah (2012)
	<i>Stipagrostis lanata</i> (Forssk) De Winter	100% Inhibición del crecimiento micelial	
	<i>Asparagus stipularis</i> (Forssk) De Winter	91% Inhibición del crecimiento micelial	
	<i>Azadirachta indica</i>	46% Inhibición del crecimiento micelial	Jabeen (2013)
	<i>Datura stramonium</i> Thunb.	61% Inhibición del crecimiento micelial	Ganie <i>et al.</i> (2013)
	<i>Artemisia absinthium</i> L.	58% Inhibición del crecimiento micelial	
	<i>Juglans regia</i> L.	38% Inhibición del crecimiento micelial	
<i>P. infestans</i>	<i>Allium sativum</i> L.	71% Inhibición del crecimiento micelial	Abd-El-Khair y Wafaa (2007)
	<i>Flourensia cernua</i> DC.	88% Inhibición del crecimiento micelial	Hernández <i>et al.</i> (2011)
	<i>Origanum mejorana</i> L.	100% Inhibición del crecimiento micelial	
	<i>Bouvardia ternifolia</i> Schtdl.	77% Inhibición del crecimiento micelial	
	<i>Artemisia ludoviciana</i> Nutt	60% Inhibición del crecimiento micelial	Badillo <i>et al.</i> (2010)
	<i>Lavandula pubescens</i> Decne	78% Inhibición del crecimiento micelial	Baka (2010)
	<i>Bidens pilosa</i> L.	77% Inhibición del crecimiento micelial	Fonseca <i>et al.</i> (2011)

Hongo patógeno	Extractos vegetales	Actividad antifúngica <i>in vitro</i> / <i>in vivo</i>	Referencias
	<i>Calendula officinalis</i> Hohen.	72% Inhibición del crecimiento micelial	Uscategui (2013)
	<i>Mentha spicata</i> L.	62% Inhibición del crecimiento micelial	
	<i>Ruta graveolens</i> L.	58% Inhibición del crecimiento micelial	
	<i>Cymbopogon citratus</i> Stapf	100% Inhibición del crecimiento micelial	Joseph <i>et al.</i> (2013)
	<i>Ocimum gratissimum</i> Forssk	100% Inhibición del crecimiento micelial	
	<i>Phyllanthus niruri</i> Linn.	100% Inhibición del crecimiento micelial	Rodríguez <i>et al.</i> (2006)
<i>Rhizoctonia solani</i> Khün	<i>Ruta graveolens</i> L.	99% Inhibición del crecimiento micelial	Uscategui (2013)
	<i>Thymus vulgaris</i> Sibth. & Sm.	100% Inhibición del crecimiento micelial	
	<i>Mentha spicata</i> L.	100% Inhibición del crecimiento micelial	

Se han utilizado frente a hongos patógenos de *Musa* spp. extractos obtenidos de un total de 20 especies vegetales. El extracto más evaluado fue el obtenido de *S. officinalis* (Marín *et al.*, 2008; Morales *et al.*, 2010). El frecuente uso de esta planta puede deberse a la presencia en sus hojas de compuestos como lectinas, terpenoides, saponinas, azúcares, fenoles, taninos, grupos amino, alcaloides, flavonoides y polifenoles totales (Sierra *et al.*, 2011).

En la literatura científica consultada se encontraron frente a *M. fijiensis* la mayor cantidad de estudios, entre los cuales se destaca el de *P. danielii* y *T. cf discolor* (Mosquera *et al.*, 2009) con porcentajes de inhibición del crecimiento micelial de 95% y 100%, respectivamente. La actividad antifúngica de estas plantas se debe a la presencia en sus hojas de compuestos como alcaloides, esteroides y triterpenos, saponinas, flavonoides, fenoles y taninos cuyo modo de acción se basa en la capacidad de destrucción del micelio del patógeno, interfiriendo en los procesos energéticos que tienen lugar en las membranas celulares (Mosquera *et al.*, 2009). La frecuente evaluación de *M. fijiensis* se

justifica por la importancia de las afectaciones que provoca este hongo en la planta las cuales obstaculizan severamente los rendimientos productivos de este cultivo, dificultando su manejo y control (Morales *et al.*, 2010).

Frente a hongos patógenos de *S. tuberosum* se han utilizado extractos vegetales obtenidos de un total de 30 especies vegetales. El extracto más evaluado fue el obtenido a partir de las hojas de *A. indica* A. Juss (árbol del Neem) (Tabla I). (Hassanein *et al.*, 2008; Hadian, 2012; Jaben, 2013). El frecuente uso del árbol del Neem puede deberse a la presencia de compuestos terpenoides, nimbina y azadiractina, cuyo modo de acción se basa en la capacidad de deformación del micelio del patógeno a partir de la inducción de un shock osmótico, ocasionado por una elevada acumulación de vacuolas en el citoplasma y severas irregularidades en la pared celular (Razzaghi *et al.*, 2005).

El hongo más evaluado por los investigadores fue *A. solani* frente al que se probaron 21 extractos, entre los cuales se destaca el de *C. zeylanicum* y el de *Citrus latifolia* Tanaka ex Yu. Tanaka (Iglesias, 2012) con porcentajes de inhibición del crecimiento micelial de 100% y 95%, respectivamente. La actividad antifúngica de *C. zeylanicum* se debe a la presencia en sus hojas de los compuestos esteroides, triterpenoides, alcaloides y flavonoides (Padrón *et al.*, 2003), mientras que la de *C. latifolia* se justifica por la presencia de compuestos como alcaloides quinonas y flavonoides (Iglesias, 2012).

La frecuente evaluación de *A. solani* se justifica por la importancia de las afectaciones que provoca en las hojas del vegetal (Mónaco *et al.*, 2001). Además, este hongo posee características culturales muy ventajosas como su acelerado crecimiento *in vitro* (Capote *et al.*, 2002) lo cual permite una rápida determinación de la actividad antifúngica.

Del total de estudios consultados, solo se determinó la actividad antifúngica en condiciones *in vivo* con extractos de *M. charantia*, *S. officinalis* y *C. citratus* (Morales *et al.*, 2010) y con extractos de *D. stramonium*, *A. indica* y *A. Sativum* (Nashwa, 2013). La escasa existencia de investigaciones *in vivo*, pudiera ser una de las causas de no contar en el mercado con un fungicida natural que pueda emplearse como una estrategia de manejo integrado de las enfermedades fúngicas que afectan a *Musa* spp. y *S. tuberosum*, pues generalmente los resultados *in vitro* no son extrapolables a las condiciones *in vivo*, debido a la complejidad de interacciones que se establecen en los patosistemas que influyen en las actividades de los metabolitos y los resultados de la acción final del extracto.

2.4. Características de la familia Rutaceae

La familia *Rutaceae* se compone de 155 géneros y 1 500 especies, casi cosmopolitas, pero más abundante en los trópicos y subtropicos de América, África y Australia. Los géneros más grandes son *Zanthoxylum* L.(200 especies), *Agathosma* Willd.(180 especies) y *Ruta* L.(60 especies) (Beurton, 2008).

Rutaceae tiene taxones de varios géneros que constan de gran importancia para el uso humano, por sus propiedades comerciales, médicas e industriales. De esta forma, a partir de géneros como *Citrus* L. se obtienen frutos de alto valor para el consumo humano, otros como *Murraya* L., *Amyris* L. y *Ruta* L. son portadores de aceites esenciales usados en la perfumería y de *Zanthoxylum* L. se emplea la madera para la confección de piezas artesanales (Beurton, 2008). De modo similar, otras especies son muy usadas en la medicina tradicional como *Pilocarpus* spp. que contiene alcaloides empleados en el tratamiento del glaucoma (Payo *et al.*, 1996).

Las especies pertenecientes a la familia *Rutaceae* han sido empleadas para la obtención de extractos vegetales, debido a la presencia en sus hojas y frutos de glándulas odoríferas que contienen esencias fuertemente aromáticas como aceites esenciales en cuya composición destacan compuestos moleculares (fenoles y aldehídos) (Alam *et al.*, 2011). En esta familia uno de los géneros más estudiados es el género *Citrus* debido a que cuenta con una amplia gama de actividades biológicas entre las que se destacan antioxidantes (Johann *et al.*, 2007) y antimicrobianas (Vasudeva y Sharma, 2012). Estas propiedades se deben a la presencia de metabolitos secundarios entre los que se destacan alcaloides, aceites esenciales y compuestos fenólicos como los flavonoides y las cumarinas (Peterson *et al.*, 2006)

No obstante, la flora de Cuba es rica en otras rutáceas endémicas, entre las cuales se destaca el género *Zanthoxylum* del cual han sido estudiadas las especies *Z. dumosum* (González-García *et al.* 2004), *Z. martinicensis* (Reyes-Acosta, 2010) y *Z. duplicipunctatum* Wright (Santiago, 2011), a consecuencia de que contienen elevadas concentraciones de metabolitos bioactivos, con actividades biológicas demostradas. Sin embargo, no existen estudios publicados acerca de la composición fitoquímica o actividad antifúngica de las especies endémicas *Z. pseudodumosum* y *Z. nannophyllum*, así como de otros géneros presentes en Cuba tales como *Amyris* y *Swinglea*.

***Zanthoxylum pseudodumosum* Beurton**

Son arbustos erectos muy ramosos, de 1-4 m de alto con presencia de ramas zigzagueantes o geniculadas; con acúleos rojo parduscos volviéndose gris claro, rectos, aislados o pareados. Presentan hojas 2-foliadas o con un tercer foliolo rudimentario, coriáceas, de margen recurvado a revoluto, pelúcidos-glanduloso. Además, tienen foliolos ovales, oblongo-obovados, a veces con acúleos medial-abaxiales recurvados y peciolo filodiiforme excepto en la base (Zamora, 2006).

La especie *Z. pseudodumosum* hasta finales de la década del 80 era considerada como *Z. dumosum* hasta que Beurton en 1987 la clasificó como tal (Beurton, 2008). Antes de ocurrida la segregación de *Z. dumosum* se habían realizado tamizajes químicos que revelaron la presencia de aminas, taninos, coumarinas, flavonoides y trazas de alcaloides y fenoles en tallos y hojas (Payo *et al.*, 1996). Sin embargo, en la bibliografía consultada no se encontraron estudios acerca de la composición fitoquímica de *Z. pseudodumosum* lo cual puede deberse a la reciente separación de la misma y quedar como una especie independiente.

***Zanthoxylum nannophyllum* (Urb.) Alain**

Son arbustos glabros o con pelos, verrucoso-glanduloso, con acúleos rectos. Poseen hojas mayormente fasciculadas en braquiblastos; peciolo sulcado y foliolos de 3 a 5 con peciólulo de 0,8-1 mm de largo, glandulosos, de margen entero o crenulado y con glándulas muy grandes. En los estudios consultados no se refieren análisis fitoquímicos de la especie por lo que se desconoce la cantidad y naturaleza de los metabolitos secundarios que presente (Beurton, 2008).

***Zanthoxylum flavum* Vahl.**

Son árboles inermes de 3-8 m (menos de 20 m) de alto con un estrellado pubescente en las partes jóvenes. Presentan hojas frecuentemente agrupadas hacia el ápice de las ramas, usualmente imparipinnadas; poseen pecíolos oblongos-aovados, cartáceos a subcoriáceos, pelúcido-glandulosos y con margen subrevoluto, entero o crenulado. Generalmente la madera es dura y pesada, con un olor distintivo de aceite de coco, y es la única de las tres especies que se usa para la fabricación de muebles finos, traviesas y decorado interiores (Berazain *et al.*, 2005).

***Amyris balsamifera* L.**

Van desde arbusto a árboles, aromáticos todos ellos, de 2-13 m de alto, generalmente glabros o en partes hispidulo por la presencia de pelos diminutos. Poseen hojas opuestas con pecíolos y raquis glabros o hispidulos, con o (en Cuba) sin alas y presentan folíolos ovados, cartáceos o coriáceos, de base redondeada a cuneiforme y margen entero o crenulado generalmente, y presentan glándulas oleíferas. Tamizajes químicos han revelado la presencia de saponinas y trazas de alcaloides, en tanto los aceites esenciales de las hojas contienen una fuerte proporción de valerianol (Pino *et al.*, 2006), así como terpenoides (Setzer *et al.*, 2006), taninos, esteroides, antraquinonas, glicósidos cardiotónicos, azúcares reductores y flavonoides (Dahiya *et al.*, 2013).

***Swinglea glutinosa* Merr.**

Es un arbusto de follaje abundante, hojas trifoliales con flores y frutos de aroma agradable que liberan resina mucilaginosa pegajosa. Los frutos son bayas modificadas de forma ovoide, longitudinalmente alargada con una corteza dura. La corteza de estas frutas tienen de 8-10 venas longitudinales (similares a las que se observan en un melón), correspondiente con el número de lóbulos. Las paredes de los lóculos están alineadas con grandes glándulas de mucílago cargadas de aceites esenciales que descargan dentro las cavidades de las semillas el material mucilaginoso; en el cual esta las semillas embebidas (Aponte, 2010).

Se han publicado estudios de esta especie que revelan la existencia en sus aceites esenciales de algunos tipos de alcaloides acridónicos y del tipo severina, además de acetatos en los frutos y cortezas del arbusto (Pino *et al.*, 2006). De igual modo, han sido hallados triterpenos de los cuales se ha determinado la actividad antimicrobiana, actividad antitumoral, actividad antiviral y actividad antiinflamatoria (Aponte, 2010).

Los estudios realizados en relación a *Citrus spp* referencian que extractos obtenidos de sus hojas constituyen una importante fuente de metabolitos secundarios a los cuales se les ha determinado la actividad antifúngica *in vitro* frente a *Passalora fulva* y *A. solani* (Iglesias, 2012). Con estos extractos a concentraciones de 20mg EAG/mL de extracto se han obtenido porcentajes de inhibición del crecimiento micelial y de la germinación de conidios superiores al 50%. Teniendo en cuenta estos resultados, otras especies de la familia *Rutaceae* como las de los géneros *Zanthoxylum*, *Amyris* y *Swinglea* pueden ser empleados con propósitos similares.

3. Materiales y métodos

3.1 Obtención de extractos de hojas de *Z. nannophyllum*, *Z. pseudodumosum*, *Z. flavum*, *S. glutinosa* y *A. balsamifera*

La colecta de las hojas de *Z. nannophyllum* y *Z. pseudodumosum* se realizó en áreas del cuabal Los Caneyes del reparto José Martí, Santa Clara. Las hojas de *Z. flavum* y *A. balsamifera* se colectaron en áreas de cayo Santa María al norte de Villa Clara y las hojas de *S. glutinosa* en áreas del centro de estudios Jardín Botánico de la Universidad “Martha Abreu” de Las Villas. Las especies vegetales se identificaron taxonómicamente por especialistas del centro de estudios Jardín Botánico de la Universidad “Martha Abreu” de Las Villas y una muestra de cada una se depositó en el herbario de dicha institución [I. Castañeda y J. A. Ramírez No. 10260, 1026, I. Castañeda No. 10165, M. Faife No. 9126, R. Pérez No. 10764 (ULV)]. El material colectado se lavó con agua destilada y se secó en una estufa a 70°C durante 72 h. Posteriormente, se trituró en un molino de cinco pulgadas (Chrisly y Norris, Chelmsford, Reino Unido).

A 2g del material vegetal pulverizado se le adicionaron 20 mL de metanol 70%, etanol 70% o agua destilada según correspondiese. Las soluciones se sometieron a baño ultrasónico (Branson Ultrasonic Corporation, Estados Unidos) durante 20 min y fueron filtradas al vacío (Liuyi, China).

3.2. Caracterización fitoquímica de extractos de hojas de *Z. nannophyllum*, *Z. pseudodumosum*, *Z. flavum*, *S. glutinosa* y *A. balsamifera*

Se realizó la caracterización fitoquímica según el método descrito por Scabra *et al.* (1984). Se determinó la presencia de saponinas, fenoles, taninos, aminoácidos, aminas, cumarinas volátiles, triterpenos, esteroides, quinonas y azúcares reductores. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

3.2.1. Cromatografía en placa delgada

Se realizó un análisis cromatográfico donde se empleó como fase estacionaria placas del sílica gel 60 F254, (Merck, Alemania) y tres sistemas de fase móvil: n-butanol-ácido acético-agua (4:1:5) [BAA] para separar saponinas y fenoles totales (Mahlo *et al.*, 2010); n-propanol-acetato de etilo-agua (40:40:30) [PAA] para separar quinonas y fenoles y acetato de etilo-metanol-agua (40:5:4) [AMA] para separar alcaloides y fenoles (Mahlo *et al.*, 2010).

Se aplicaron 10 μ L de los extractos crudos en forma de manchas circulares sobre uno de los extremos del cromatograma, manteniendo una distancia de 1,5 cm entre las bandas. La detección de compuestos fenólicos, quinonas, alcaloides y saponinas se realizó bajo luz ultravioleta 365 nm en un transiluminador (Liyi, China). Las detecciones se realizaron por duplicado. Se calculó la movilidad relativa de cada compuesto (R_f) midiendo el desplazamiento de cada mancha en el cromatograma, respecto al frente del solvente.

3.2.2. Cuantificación del contenido de fenoles, flavonoides y flavonoles totales

La cuantificación de fenoles totales, se realizó según el método descrito por Tuberoso *et al.* (2009) con modificaciones. A 1 mL de extracto se le adicionaron 80 μ L del reactivo Folin-Ciocalteu 1N y se dejó reposar durante 5 min. Luego se añadieron 800 μ L de carbonato de sodio 7%, se completó hasta 2 mL con agua destilada, se agitó fuertemente y se dejó reposar durante 90 min. Se midió la absorbancia en un espectrofotómetro UV-VIS (Rayleigh 1601, China) a una longitud de onda de 750 nm, el contenido de fenoles totales se calculó mediante extrapolación en una curva de calibración empleando como patrón ácido gálico a diferentes concentraciones. El contenido de fenoles totales de cada extracto se expresó en mg equivalentes de ácido gálico/mL de extracto (EAG/mL), todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

El contenido de flavonoides totales se cuantificó según el método descrito por Liu y Zhu (2007) con modificaciones. A 1 mL de extracto se le adicionaron 60 μ L de nitrito de sodio 5% y se agitó fuertemente durante 5 min. Luego se añadieron 60 μ L de tricloruro de aluminio 5%, se mezcló mediante vortex y se dejó reposar durante 6 min. Posteriormente se adicionaron 400 μ L de hidróxido de sodio 1 M, y se dejó reposar 10 min. Se midió la absorbancia en un espectrofotómetro UV-VIS (Rayleigh 1601, China) a una longitud de onda de 415 nm antes de transcurrido 30 min, y el contenido de flavonoides totales se

calculó mediante extrapolación en una curva de calibración empleando como patrón quercetina a diferentes concentraciones. El contenido de flavonoides totales de cada extracto se expresó en mg equivalentes de quercetina/mL de extracto (mg EQ/mL), todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

La cuantificación del contenido de flavonoles totales, se realizó según el método descrito por Adewusi y Afolayan (2009) con modificaciones. A 1 mL de extracto se le adicionó 1 mL de tricloruro de aluminio en etanol al 2%, luego se le añadieron 1,5 mL de acetato de sodio a una concentración de 50 g/L. Se dejó reposar y se realizó la lectura espectrofotométrica después de 150 min. Se midió la absorbancia en un espectrofotómetro UV-VIS (Rayleigh 1601, China) a una longitud de onda de 440 nm, el contenido de flavonoles totales se calculó mediante extrapolación en una curva de calibración empleando como patrón quercetina a diferentes concentraciones. El contenido de flavonoles totales de cada extracto se expresó en mg equivalentes de quercetina/mL de extracto (mg EQ/mL), todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

3.3. Determinación de la actividad antifúngica *in vitro* de extractos de hojas de *Z. nannophyllum*, *Z. pseudodumosum*, *Z. flavum*, *S. glutinosa* y *A. balsamifera*

Los aislados de *M. fijiensis* y *A. solani* fueron suministrados por el Laboratorio de Microbiología Aplicada del Instituto de Biotecnología de las Plantas, Villa Clara, Cuba. Los microorganismos fueron transferidos a placas de Petri (9 x 9 cm) con medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (PDA), durante siete días para *A. solani*, y durante 21 días para *M. fijiensis* a 27°C en oscuridad total.

3.3.1. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) de extractos de hojas de *Z. nannophyllum*, *Z. pseudodumosum*, *Z. flavum*, *S. glutinosa* y *A. balsamifera* frente a *M. fijiensis* y *A. solani*

La concentración mínima inhibitoria (MIC) de los extractos se determinó empleando el método de microdilución descrito por Wilson *et al.* (1997). Para cada extracto y controles las determinaciones se realizaron por triplicado y el experimento se repitió una vez.

En una microplaca de ELISA de 96 pocillos, se colocaron en cada pocillo 100 μ L de medio de cultivo Caldo Papa Dextrosa (PDB). Al primer pocillo de cada fila se le añadió 100 μ L de extracto a una concentración de fenoles totales de 40 mg EAG/mL de extracto, a partir de esta concentración se realizaron diluciones seriadas hasta 0,1562 mg/mL de extracto empleando 100 μ L. Posteriormente, se agregó 100 μ L de una suspensión de 5×10^5 propágulos/ mL de *A. solani* y *M. fijiensis* respectivamente, a cada pocillo según correspondió.

Como control positivo se empleó el microorganismo en medio de cultivo PDB con el fungicida Oleot (Tebuconazol) (Bayer Crop Science AG, Alemania) al 0,1% y como controles negativos, el microorganismo en medio de cultivo PDB puro o con el solvente diluido en agua a la misma proporción de dilución de los extractos. En todos los ensayos se colocaron controles de esterilidad que contenían el medio de cultivo PDB sin el microorganismo. Las placas se incubaron a 27°C durante siete días con 100% de humedad relativa, en oscuridad.

Como indicador de desarrollo del hongo se añadió a cada pocillo 40 μ L de una solución de p-iodonitrotetrazolio violeta (INT) a 0,2 mg/mL. La INT incolora actúa como aceptor de electrones y es reducida apareciendo una coloración roja en presencia de organismos biológicamente activos. Cuando existe inhibición de la actividad biológica de los organismos, la INT se torna incolora o reduce marcadamente su coloración roja inicial. La MIC se definió como la menor concentración del extracto que inhibió el desarrollo del hongo.

3.3.2. Cálculo del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de *A. solani* y *M. fijiensis* por los extractos de hojas de *Z. nannophyllum*, *Z. pseudodumosum*, *Z. flavum*, *S. glutinosa* y *A. balsamifera*

Se determinó el efecto de los extractos según el método de dilución en agar descrito por Guerrero-Rodríguez (2007). Para cada extracto y controles se realizaron tres réplicas y el experimento se repitió una vez.

En placas de Petri (9 x 9 cm) se vertieron los extractos (a una concentración según los resultados alcanzados en el acápite anterior), con medio de cultivo PDA. Después de la solidificación, se colocó en el centro de cada placa un disco de 0,6 cm de diámetro de micelio de un cultivo de siete y 21 días de *A. solani* y *M. fijiensis* respectivamente. Las

placas fueron incubadas por siete días en el caso de *A. solani* y 21 días para *M. fijiensis* en oscuridad a una temperatura de 27°C. A partir de las 72 h de realizado el experimento, se midió diariamente el diámetro del micelio crecido. Se calculó el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial utilizando la fórmula $[(C-T)/C * 100]$, donde C y T corresponden a la extensión hifal (cm) en los cultivos control y tratados, respectivamente. Se consideraron promisorios los extractos que mostraron valores de inhibición superiores al 50%.

En este ensayo se utilizó como control de esterilidad el medio de cultivo PDA sin el microorganismo, como control positivo el microorganismo en medio de cultivo PDA con el fungicida Oleot y como controles negativos, el microorganismo en medio de cultivo PDA puro o con el solvente diluido en agua a la misma proporción de dilución de los extractos.

3.3.3. Identificación de la fracción química de los extractos de hojas de *Z. nannophyllum*, *Z. pseudodumosum*, *Z. flavum*, *S. glutinosa* y *A. balsamífera* que inhibe el crecimiento de *A. solani* y *M. fijiensis*

Se determinó según el método bioautográfico descrito por Mahlo *et al.* (2010) con modificaciones. Los cromatogramas obtenidos como se describió en el acápite 3.2.2 se dejaron secar a 25°C durante cinco días hasta que el solvente remanente fuera eliminado. Posteriormente, se les asperjó una suspensión de *A. solani* y *M. fijiensis* obtenida a partir de un cultivo crecido en PDB durante 72 h. Los cromatogramas se incubaron dentro de una placa de Petri en oscuridad a 27°C y 100% de humedad relativa durante 24 h. Transcurrido ese tiempo se asperjaron con una solución de 2 mg/ml de INT y se incubaron durante 24 h en las condiciones descritas.

La aparición de zonas blancas en los cromatogramas indicó la inhibición del crecimiento fúngico. Las áreas de inhibición se compararon con los R_f relativos a las manchas en las placas de TLC de referencias.

3.4. Procesamiento estadístico

Los datos fueron analizados con el paquete estadístico PASW *Statistics*, versión 18 para Windows, verificándose los supuestos de normalidad Shapiro Wilk. Los datos que no seguían distribución normal se procesaron mediante análisis de varianza para dos variables no relacionadas, U de Mann Whitney, y varias muestras independientes, Kruskal Wallis. En todos los casos las diferencias se consideraron significativas para un valor de $p < 0,05$.

4. Resultados

4.1 Obtención de extractos de hojas de *Z. nannophyllum*, *Z. pseudodumosum*, *Z. flavum*, *S. glutinosa* y *A. balsamifera*

Se obtuvieron cinco extractos en etanol al 70%: *Z. nannophyllum* (ZN-et), *Z. pseudodumosum* (ZP-et), *Z. flavum* (ZF-et), *A. balsamifera* (AB-et) y *S. glutinosa* (SG-et); cinco en metanol 70%: *Z. nannophyllum* (ZN-met), *Z. pseudodumosum* (ZP-met), *Z. flavum* (ZF-met), *A. balsamifera* (AB-met) y *S. glutinosa* (SG-met); y cuatro en agua destilada: *Z. nannophyllum* (ZN-a), *Z. flavum* (ZF-a), *A. balsamifera* (AB-a) y *S. glutinosa* (SG-a).

4.2. Caracterización fitoquímica de extractos de hojas de *Z. nannophyllum*, *Z. pseudodumosum*, *Z. flavum*, *S. glutinosa* y *A. balsamifera*

En todos los extractos obtenidos a partir de las especies de los géneros *Zanthoxylum*, *Amyris* y *Swinglea* se identificaron compuestos químicos como saponinas, triterpenos, esteroides, azúcares reductores, aminoácidos, aminas, taninos y fenoles, siendo los azúcares reductores, aminas y aminoácidos los de mayor presencia. Los compuestos de menor presencia fueron las saponinas que solo se presentaron en el extracto de AB-a y las quinonas y cumarinas que no se presentaron en ningún extracto (Tabla II). En los extractos de ZN-met y ZP-met fue en los que mayor variedad de compuestos químicos se determinaron, mientras que en los extractos de ZN-a y ZF-a fue donde se determinó la menor variedad de compuestos químicos.

Tabla II. Compuestos químicos identificados mediante análisis fitoquímico en extractos de hojas de *Zanthoxylum nannophyllum* (ZN), *Zanthoxylum pseudodumosum* (ZP), *Zanthoxylum flavum* (ZF), *Amyris balsamifera* (AB) y *Swinglea glutinosa* (SG) en etanol 70% (-et), metanol 70% (-met) y agua destilada (-a)

Compuesto químico	Extractos de hojas de <i>Rutaceae</i>														
	Etanol 70%					Metanol 70%					Agua destilada				
	ZN	ZP	AB	SG	ZF	ZN	ZP	AB	SG	ZF	ZN	AB	SG	ZF	
Saponinas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	
Taninos y fenoles	+++	+++	-	-	-	+++	+++	-	-	-	-	-	-	-	
Cumarinas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Aminoácidos y aminas	+++	+++	+++	+++	-	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-	
Azúcares reductores	+	+	+	+++	+++	++	++	+	+	+++	++	+++	+++	++	
Triterpenos	-	-	-	-	-	++	+	-	-	+++	-	-	-	-	
Esteroides	-	-	-	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Quinonas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

(+, ++, +++) Presencia relativa del compuesto químico (-) No presencia del compuesto químico

4.2.1. Cromatografía en placa delgada

En el sistema de fase móvil PAA se identificaron en todos los extractos antraquinonas (amarillo) (Figura 1A). Sin embargo, en la caracterización fitoquímica este compuesto no se encontró en ningún extracto. La presencia de flavonoles 3 glicosilados y flavonas (rojos) fue determinada en los extractos ZF-et, SG-met y AB-et mientras que los flavonoides 3,5 metoxilados y cumarinas fueron hallados en el extracto de AB en los tres solventes de extracción.

La presencia de saponinas (azul) (Figura 1A) se evidenció en el sistema de fase móvil BAA en los extractos de ZF-et, ZN-met, ZF-met, SG-met, AB-met y AB-a. En contraste, en la caracterización fitoquímica solo se encontró este compuesto en el extracto de AB-a.

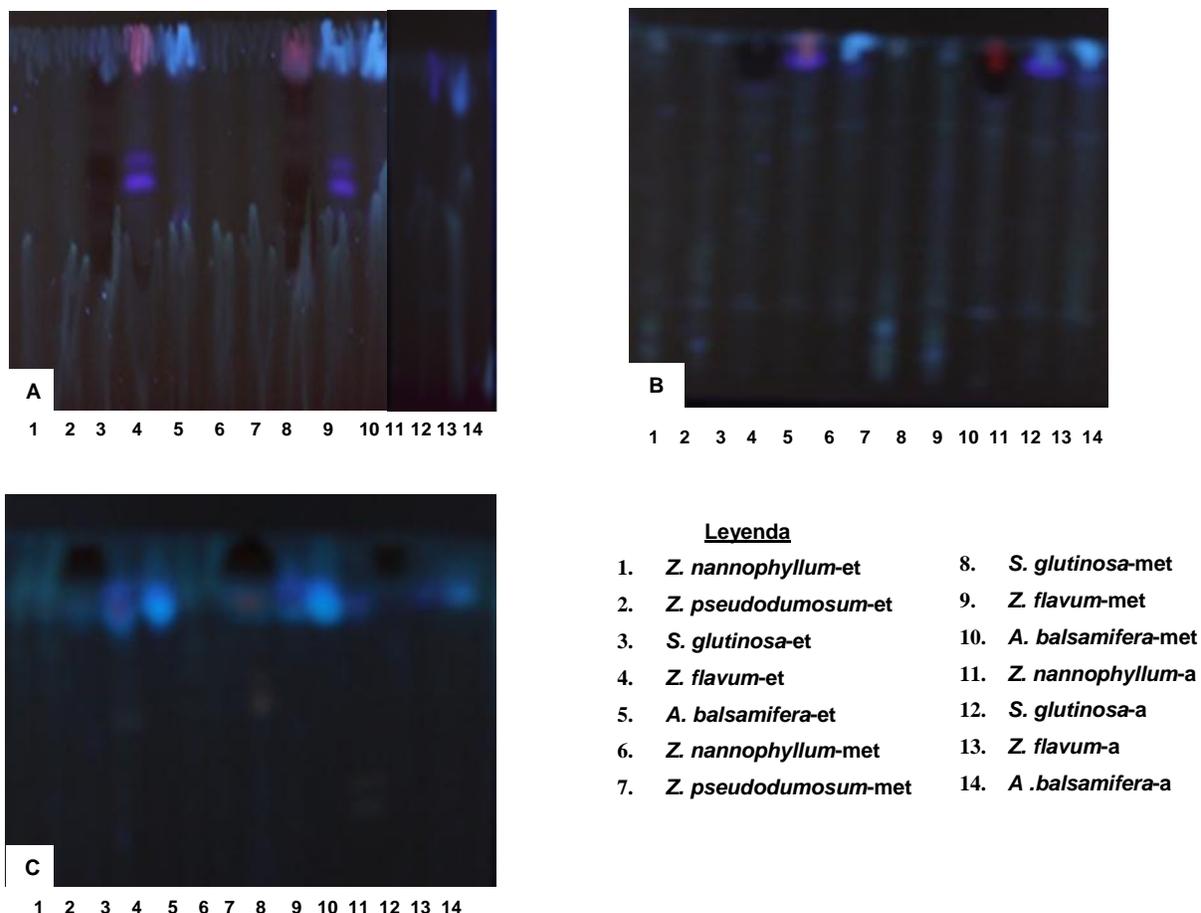


Figura 1. Cromatogramas de extractos de hojas de *Z. nannophyllum*, *Z. pseudodumosum*, *Z. flavum*, *A. balsamifera* y *S. glutinosa* en etanol 70%, metanol 70% y agua destilada, desarrollados mediante TLC con diferentes sistemas de solventes evaluados a 365 nm. (A) propanol-acetato de etilo-agua [PAA], (B) butanol-ácido acético-agua [BAA] y (C) acetato de estilo-metanol-agua [AMA].

La identificación de los compuestos químicos, así como su valor de R_f para cada extracto se muestran en la tabla III. Los extractos de ZF-et y SG-met fueron los que mostraron más clases y variedad de compuestos químicos.

Tabla III. Compuestos químicos identificados en extractos de hojas de ZN, ZP, ZF, AB y SG; en etanol 70% (-et), metanol 70% (-met) y en agua destilada (-a) por cromatografía en placa delgada sílica gel 60 F254; con tres sistemas de solventes (PAA, BAA y AMA) evaluados a 365 nm.

Extracto	Sistema de fase móvil	R _f del compuesto	Compuesto identificado
ZN-et	PAA	0,06-0,18	Antraquinona
		0,87-0,93	Antraquinona
ZP-et	PAA	0,06-0,09	Antraquinona
		0,90-0,93	Antraquinona
ZF-et	BAA	0,28-0,57	Flavonoles 3 glicosilados y flavonas
		0,71-0,82	Saponina
SG-et	PAA	0,62	Antraquinona
	AMA	0,73-0,76	Flavonoles 3 glicosilados y flavonas
	PAA	0,81-0,93	Antraquinona
	AMA	0,8-0,86	Antraquinona
AB-et	BAA	0,76-0,8	Antraquinona
		0,82-0,89	Flavonoles 3 glicosilados y flavonas
ZN-met	PAA	0,68	Antraquinona
		0,87-0,93	Antraquinona
	AMA	0,76-0,8	Flavonoides 3,5 metoxilados y cumarinas
	BAA	0,72-0,82	Saponina
ZP-met	PAA	0,06-0,18	Antraquinona
		0,8-0,86	Antraquinona
ZF-met	BAA	0,06-0,18	Antraquinona
		0,8-0,86	Antraquinona
SG-met	PAA	0,71-0,82	Saponina
		0,62	Antraquinona
	BAA	0,28-0,82	Flavonoles 3 glicosilados y flavonas
	AMA	0,72-0,82	Saponina
AB-met	PAA	0,65	Antraquinona
		0,07	Antraquinona
	BAA	0,88-1	Antraquinona
	AMA	0,71-0,82	Saponina
SG-a	AMA	0,93	Antraquinona
		0,76-0,8	Flavonoides 3,5 metoxilados y cumarinas
AB-a	BAA	0,8-0,86	Antraquinona
		0,67-0,78	Saponina
	AMA	0,76-0,8	Flavonoides 3,5 metoxilados y cumarinas

4.2.2. Cuantificación de fenoles totales, flavonoides totales y flavonoles totales de extractos de hojas de *Z. nannophyllum*, *Z. pseudodumosum*, *Z. flavum*, *S. glutinosa* y *A. balsamifera*.

En todos los extractos se obtuvieron concentraciones de fenoles totales, flavonoides totales y flavonoles totales superiores a los 39 mg EAG/mL, 8 mg EQ/mL y 0,08 mg EQ/mL, respectivamente, como se muestra en la tabla IV. El extracto que mostró la mayor concentración de fenoles totales fue el de AB-met mientras que las mayores concentraciones de flavonoides y flavonoles totales la mostró el extracto de ZN-et. Sin embargo, el extractos de ZF-a mostró las menores concentraciones de fenoles totales, el de ZN-a las menores concentraciones de flavonoides totales y los de ZF-a y ZN-a las menores concentraciones de flavonoles totales.

Tabla IV. Concentración de fenoles totales, flavonoides totales y flavonoles totales en extractos de hojas de ZN, ZP, ZF, AB y SG; en etanol 70% (-et), metanol 70% (-met) y agua (-a). Letras distintas indican que las medias difieren estadísticamente para $p < 0,05$ (Kruskal Wallis/ U de Mann Whitney).

Extracto	Fenoles totales (mg EAG/ mL)	Flavonoides totales (mg EQ/mL)	Flavonoles totales (mg EQ/mL)
ZN-et	106,67±4,7 ^c	12±0 ^b	0,93±0,7 ^a
ZN-met	104,67±2,9 ^c	10,67±0,33 ^c	0,08±0,009 ^e
ZN-a	121±10,3 ^{ab}	8±0 ^d	0,04±0,003 ^f
ZP- et	100,67±0,33 ^c	11,33±0,33 ^c	0,17±0,03 ^c
ZP- met	103,33±2,33 ^c	11,67±0,33 ^c	0,3±0 ^b
ZF-et	113,5±8,5 ^{abc}	9±0 ^d	0,2±0 ^c
ZF-met	89±3 ^d	9±0 ^d	0,15±0,05 ^c
ZF-a	39±0,33 ^f	8±0 ^e	0,04±0,003 ^f
SG-et	109±3 ^c	46±2 ^a	1±0 ^a
SG-met	89,5±0,5 ^c	11,5±0,5 ^c	0,15±0,05 ^d
SG-a	48,67±0,66 ^e	11,33±0,3 ^c	0,2±0 ^c
AB-et	116,5±0,5 ^b	11±1 ^c	0,3±0 ^b
AB-met	125±4 ^a	9±0 ^d	0,15±0,05 ^d
AB-a	97,67±6,17 ^c	9±0 ^d	0,1±0 ^d

En todos los extractos con excepción de *Z. pseudodumosum* se encontraron diferencias significativas en la concentración de fenoles totales y flavonoides totales según el solvente de extracción utilizado. Cuando se empleó agua como solvente de extracción se obtuvieron las menores concentraciones de fenoles totales a excepción del extracto de ZN y las menores concentraciones de flavonoides totales en los extractos de ZN y ZF. De modo similar, existieron diferencias significativas en la concentración de flavonoles totales según el solvente de extracción, obteniéndose las menores concentraciones de estos metabolitos al emplear agua, a excepción de los extractos de SG y AB.

4.3. Determinación de la actividad antifúngica *in vitro* de extractos de hojas de *Z. nannophyllum*, *Z. pseudodumosum*, *Z. flavum*, *S. glutinosa* y *A. balsamifera*

4.3.1. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) de extractos de hojas de *Z. nannophyllum*, *Z. pseudodumosum*, *Z. flavum*, *S. glutinosa* y *A. balsamifera* frente a *M. fijiensis* y *A. solani*.

Todos los extractos mostraron actividad antifúngica a concentraciones de fenoles superiores a 40 mg EAG/mL frente a *M. fijiensis* y *A. solani* (Tabla V). Los extractos que mostraron las menores MIC frente a *M. fijiensis* fueron los de ZN-et, ZP-et, AB-et y SG-a, mientras que los extractos de ZF-et, SG-et, ZN-met, ZP-met, ZF-met, AB-met, ZN-a y AB-a mostraron los mayores valores.

Frente a *A. solani* el extracto que mostró la menor MIC fue AB-a. Los mayores valores de MIC se obtuvieron al emplear los extractos de ZN-et, ZP-et, ZF-et, AB-et, ZN-met, SG-met, ZN-a y ZF-a.

Tabla V: Concentración mínima inhibitoria (MIC) de los extractos de ZN, ZP, ZF, AB y SG; en etanol 70% (-et), metanol 70% (-met), agua (-a) y empleando el fungicida Oleot como control positivo frente a *M. fijiensis* y *A. solani*.

Extracto/ control positivo	MIC (mg EAG/ mL)	
	<i>Mycosphaerella fijiensis</i>	<i>Alternaria solani</i>
Oleot	< 0,04	< 0,04
ZN-et	0,0119	40
ZP-et	0,0119	40
ZF-et	40	40
SG-et	40	10
AB-et	0,0119	40
ZN-met	40	40
ZP-met	40	10
ZF-met	40	20
SG-met	10	40
AB-met	40	2,5
ZN-a	40	40
ZF-a	10	40
SG-a	0,0119	5
AB-a	40	0,312

Teniendo en cuenta estos resultados, se estableció para los restantes ensayos de determinación de la actividad antifúngica una concentración de trabajo de 20 mg EAG/mL extracto. Se seleccionaron para el cálculo de porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de *M. fijiensis* los extractos de ZN-et, ZP-et, AB-et y SG-met que mostraron los menores valores de MIC frente a este hongo así como los extractos de ZP-met, SG-a, ZF-met, AB-a, AB-met y SG-et con los que se obtuvieron los menores valores de MIC frente a *A. solani*.

4.3.2. Cálculo del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de *A. solani* y *M. fijiensis* por los extractos de hojas de *Z. nannophyllum*, *Z. pseudodumosum*, *Z. flavum*, *S. glutinosa* y *A. balsamifera* frente a *M. fijiensis* y *A. solani*.

Todos los extractos analizados mostraron porcentajes de inhibición del crecimiento micelial superiores al 50%, frente a *M. fijiensis* (Figura 2). Los extractos de SG-met y AB-et inhibieron totalmente el crecimiento micelial del hongo (100%), con resultados similares al fungicida químico empleado como control. Cuando se empleó el extracto de ZN-et se obtuvo el menor valor de inhibición del crecimiento micelial.

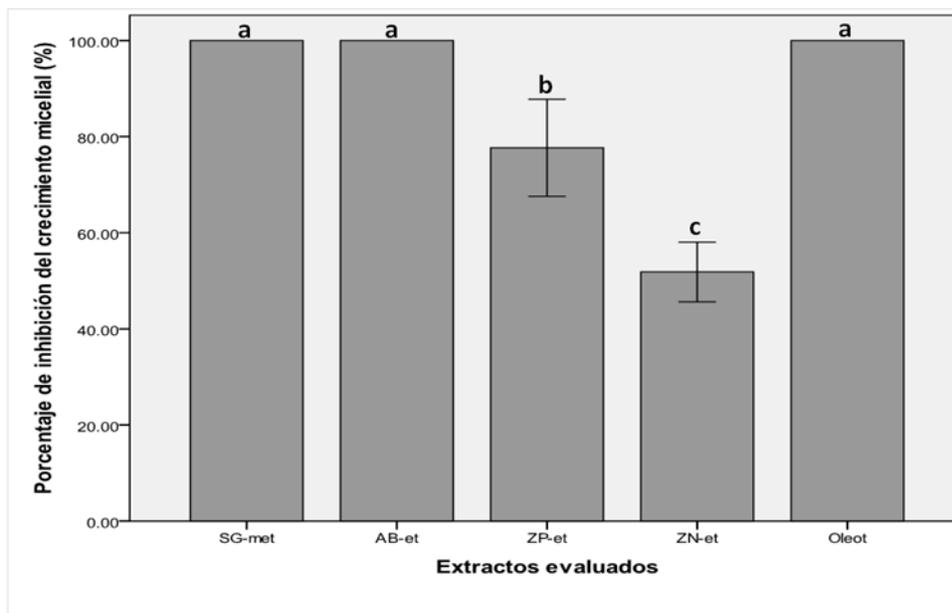


Figura 2. Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial *in vitro* de *M. fijiensis* por extractos de hojas de ZN, ZP, ZF, AB y SG; en etanol 70% (-et), metanol 70% (-met) y agua (-a), a los 21 días de incubación. Cada barra representa la media de tres réplicas independientes \pm el error estándar. Letras distintas en las barras indican que las medias difieren estadísticamente para $p < 0,05$ (Kruskal Wallis/ U de Mann Whitney).

Frente a *A. solani* los extractos evaluados mostraron porcentajes de inhibición del crecimiento micelial superiores al 50%, con excepción de los extractos de AB-met y AB-a. Los extractos de ZP-met y SG-et inhibieron totalmente el crecimiento micelial del hongo (100%), resultados que coinciden con el del fungicida químico empleado como control.

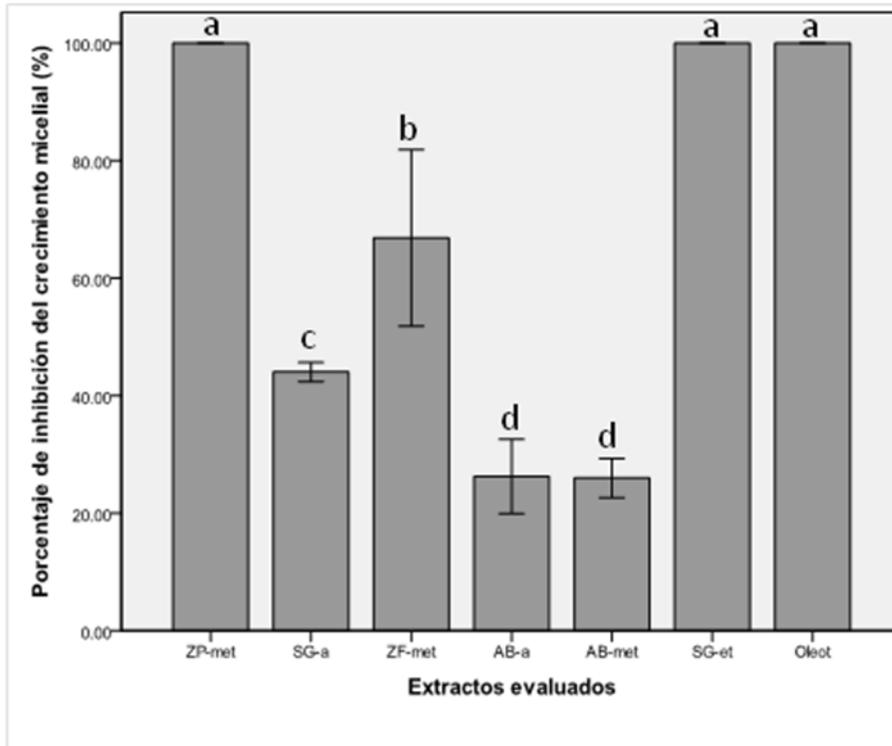


Figura 3. Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial *in vitro* de *A. solani* por extractos de hojas de ZN, ZP, ZF, AB y SG; en etanol 70% (-et), metanol 70% (-met) y agua (-a), a los 7 días de incubación. Cada barra representa la media de tres réplicas independientes \pm el error estándar. Letras distintas en las barras indican que las medias difieren estadísticamente para $p < 0,05$ (Kruskal Wallis/ U de Mann Whitney).

4.3.3. Identificación de la fracción química de los extractos de hojas de *Z. nannophyllum*, *Z. pseudodumosum*, *Z. flavum*, *S. glutinosa* y *A. balsamífera* que inhibe el crecimiento de *A. solani* y *M. fijiensis*.

Todos los extractos evaluados mostraron zonas de inhibición de la actividad de ambos hongos (Figura 4).

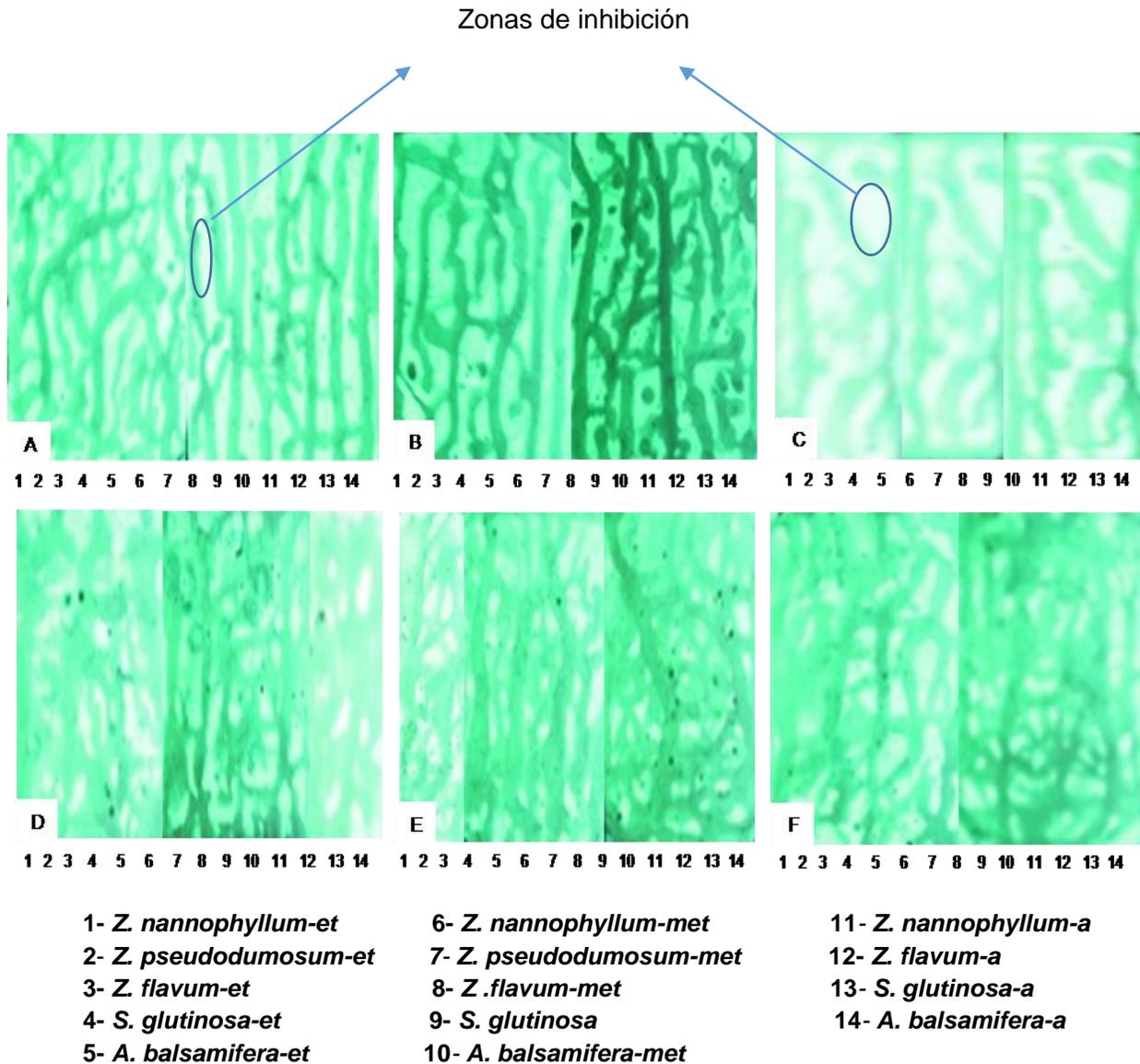


Figura 4. Bioautogramas asperjados con *M. fijiensis* (A, B y C) y *A. solani* (D, E y F) desarrollados con diferentes sistemas de solventes. (A y D) propanol-acetato de etilo-agua [PAA], (B y E) butanol-ácido acético-agua [BAA], (C y F) acetato de etilo-metanol-agua [AMA].

En todos los extractos de hojas de cítricos se calcularon valores de R_f de compuestos con actividad antifúngica no identificados por TLC, de igual manera, compuestos identificados mediante TLC no mostraron esta actividad (Anexo 1).

En la tabla VI se muestran los compuestos químicos de cada extracto, con actividad antifúngica frente a *M. fijiensis* y *A. solani*.

Tabla VI. Compuestos químicos identificados en extractos de hojas de ZN, ZP, ZF, AB y SG; en etanol 70% (-et), metanol 70% (-met) y agua (-a) con actividad antifúngica frente a *M. fijiensis* y *A. solani*.

Extractos	Compuestos identificados	Actividad antifúngica	
		<i>Mycosphaerella fijiensis</i>	<i>Alternaria solani</i>
ZN-et	Antraquinonas	+	+
	Otros	+	+
ZP-et	Antraquinonas	+	+
	Otros	+	+
SG-et	Antraquinonas	+	+
	Otros	+	+
ZF-et	Flavonoles 3 glicosilados y flavonas	+	+
	Saponina	-	+
	Antraquinonas	+	+
	Otros	+	+
AB-et	Flavonoides 3,5 metoxilados y cumarinas	-	+
	Antraquinonas	+	+
	Flavonoles 3 glicosilados y flavonas	+	-
	Otros	+	+
ZN-met	Antraquinonas	+	+
	Saponina	+	+
	Otros	+	+
ZP-met	Antraquinonas	+	+
	Otros	+	+
SG-met	Antraquinonas	+	+
	Flavonoles 3 glicosilados y flavonas	+	+
	Saponina	-	+
	Otros	+	+
ZF-met	Antraquinonas	-	+
	Flavonoides 3,5 metoxilados y cumarinas	+	+

Extractos	Compuestos identificados	Actividad antifúngica	
		<i>Mycosphaerella fijiensis</i>	<i>Alternaria solani</i>
	Saponinas	+	-
	Otros	+	+
SG-met	Flavonoles 3 glicosilados y flavonas	-	+
	Antraquinonas	+	+
	Otros	+	+
AB-met	Flavonoides 3,5 metoxilados y cumarinas	+	-
	Saponinas	+	+
	Antraquinonas	-	+
	Otros	+	+
ZN-a	Otros	+	+
ZF-a	Antraquinonas	+	+
	Otros	+	+
SG-a	Antraquinonas	+	+
	Otros	+	+
AB-a	Flavonoides 3,5 metoxilados y cumarinas	+	+
	Saponina	+	+
	Antraquinona	-	+
	Otros	+	+

De los compuestos identificados por TLC, las antraquinonas fueron los más activos frente a ambos hongos. Los extractos que mostraron mayor cantidad de compuestos con actividad frente a *M. fijiensis* fueron ZF-et, AB-et, ZN-met, ZF-met, SG-met, AB-met y AB-a. Sin embargo, los extractos de ZF-et, SG-met y AB-a poseen la mayor cantidad de compuestos antifúngicos frente a *A. solani*. Los extractos etanólicos y metanólicos mostraron mayor cantidad de compuestos químicos con actividad antifúngica.

5. Discusión

5.1 Obtención de extractos de hojas de *Z. nannophyllum*, *Z. pseudodumosum*, *Z. flavum*, *S. glutinosa* y *A. balsamifera*

En la presente investigación se empleó el método de extracción asistido por ultrasonido, lo que posibilitó la obtención de extractos con concentraciones elevadas de metabolitos secundarios adecuadas, sin pérdida de la actividad biológica de interés. Además, no se emplearon para la extracción solventes orgánicos, los cuales tienen como desventajas que requieren largos tiempos de extracción, con riesgo de degradación de algunos metabolitos (Morillo *et al.*, 2010). Se utilizó como tiempo de extracción 20 min, que resulta el más adecuado según la bibliografía consultada, debido a que se emplea comparativamente menos solvente (Pino, 2006) y aumenta la velocidad de transferencia de materia y por tanto el rendimiento de extracción de compuestos químicos del extracto (Espert *et al.*, 2012).

5.2. Caracterización fitoquímica de extractos de hojas de *Z. nannophyllum*, *Z. pseudodumosum*, *Z. flavum*, *S. glutinosa* y *A. balsamifera*

Los estudios fitoquímicos de extractos vegetales permiten determinar cualitativamente los compuestos químicos presentes en la planta.

En la familia *Rutaceae*, los estudios fitoquímicos a sus representantes se han realizado generalmente a los aceites esenciales. De esta forma, a partir de aceites esenciales extraídos mediante percolación de las partes aéreas y frutos de *Zanthoxylum americanum* Mill. y *Haplophyllum tuberculatum* Juss., se detectaron compuestos químicos como α - y β -felandreno, limoneno, limonoides, β -ocimeno, β -cariofileno, mirceno (Abad *et al.*, 2007), los alcaloides (3-metoxi -9-metil-9H-carbazo-2-ol) además de cumarinas, flavonoides, lignanos y terpenos (Taborda-Caborda, 2007). También, con extractos de *Citrus sinensis* L. y *C. latifolia* Tanaka ex Yu. Tanaka obtenidos mediante rotoevaporación se identificaron compuestos como taninos, terpenos, esteroides, flavonoides, antraquinonas, antocianinas, saponinas, alcaloides y cumarinas (MacMullen-Hassan, 2012).

Es común en los extractos evaluados en los estudios citados con anterioridad la presencia de flavonoides, lo que se corresponde con los resultados de esta investigación (Tabla II). Las diferencias apreciadas, pueden deberse al empleo de diferentes géneros de plantas,

así como diferentes órganos, al uso de diferentes solventes orgánicos y técnicas de extracción en la preparación de los extractos.

De modo similar, en aceites esenciales extraídos de *S. glutinosa*, mediante el método de extracción con solvente asistida por Soxhlet, fueron hallados compuestos como carvacrol, timol, p-cimeno, 1,8-cineol y limonoides (Dubey *et al.*, 2011), además de alcaloides, flavonoides, benzoamidas y alcaloides acridónicos mediante extracción por solvente asistida por Soxhlet (Toro *et al.*, 2010). También, de extractos obtenidos de la corteza de esta planta mediante rotoevaporación se identificaron sesquiterpenos, fenoles, eugenol, linajol, citronelol y geraniol, acridínicos, alfa-cubebeno, beta-pineno, elixeno, beta-cariofileno, beta-felandreno, alfapineno, delta-limoneno, flavonas y anozol (Ivonne *et al.*, 2010).

Los estudios referidos con anterioridad analizan los aceites esenciales, donde se encuentran contenidos mayor variedad de compuestos químicos. Si se tiene en cuenta que en este estudio se emplean extractos hidroalcohólicos de hojas, se explica de esta forma la menor detección de metabolitos.

5.2.1. Cromatografía en placa delgada

Mediante el análisis por TLC, se corroboraron los resultados del estudio fitoquímico, con el empleo de tres sistemas de fases móviles diferentes. No obstante, existieron diferencias en la identificación de saponinas pues en el análisis fitoquímico, estas solo se visualizaron en el extracto de *A. balsamifera* (Figura 1 y Tabla II). De modo similar, en el análisis químico no se observaron quinonas en ningún extracto mientras que en los cromatogramas se detectó la presencia de antraquinonas en todos los extractos. Esto pudo deberse a que la TLC es una técnica de mayor especificidad y a que las concentraciones en las que se encuentra este compuesto en el resto de los extractos, están por debajo del índice de detección de la técnica empleada en la caracterización fitoquímica (Uribe, 2013).

5.2.2. Contenido de fenoles, flavonoides y flavonoles totales de extractos de hojas de *Z. nannophyllum*, *Z. pseudodumosum*, *Z. flavum*, *S. glutinosa* y *A. balsamifera*

El estudio del contenido aproximado de diferentes metabolitos constituyentes de especies vegetales, como los fenoles resulta importante, pues estas concentraciones están asociadas con las actividades biológicas que puedan tener estos compuestos (Halliwell *et al.* 2005). Específicamente en la cuantificación de fenoles totales, uno de los ensayos fotométricos más universales, es el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu, basado en la reducción del ácido fosfomolibdico hasta óxidos azules de molibdeno (Iglesias, 2012). Sin embargo, en los estudios consultados de especies de la familia *Rutaceae*, existen diferencias en la cuantificación de fenoles totales basadas en la forma de expresión de los resultados analíticos, debido a que se emplean diferentes unidades de medidas como g de GAE/100 g de peso seco (Islam *et al.* 2014) y mg GAE/g de extracto (Adekunle *et al.*, 2012).

En la cuantificación realizada a extractos metanólicos de hojas, flores y frutos de *Zanthoxylum bungeanum* Maxim. y a extractos etanólicos de ramas de *Z. zanthoxyloide* L., se obtuvieron concentraciones de fenoles totales de 3,13 g equivalentes de ácido gálico /100 g de peso fresco; y 2,46 mg equivalentes de ácido gálico /g de extracto (Adekunle *et al.*, 2012) inferiores a las alcanzadas en este trabajo con los extractos de especies de este género. Sin embargo, con extractos metanólicos de ramas de *Z. rhetsa* DC. se obtuvieron concentraciones de fenoles de 117,95 mg equivalentes de ácido gálico /g (Payum *et al.*, 2013) y con extractos etanólicos de semillas de *Z. budrunga* Wall. concentraciones de fenoles totales de 338,77 mg equivalentes de ácido gálico /100 g de material seco (Islam *et al.*, 2014) superiores a los estudios anteriores pero inferiores modularmente a las concentraciones de fenoles alcanzadas en este trabajo para *Z. nannophyllum*, *Z. pseudodumosum* y *Z. flavum*.

Existen variedad de estudios, donde se cuantifican flavonoides totales en especies del género *Zanthoxylum*. Sin embargo, no se encontraron estudios publicados donde se cuantifiquen estos metabolitos en las especies endémicas *Z. nannophyllum* y *Z. pseudodumosum*.

La comparación de los resultados de estos estudios se dificulta debido al empleo de diferentes técnicas de cuantificación así como el modo de expresar los resultados analíticos. De esta forma, se cuantifican estos metabolitos mediante sistemas de HPLC, obteniéndose mediante esta técnica concentraciones de flavonoides totales de 27,7 mg/

100 g de peso fresco con extractos secos de retoños de *Z. ailanthoides* Siebold & Zucc. (Yang *et al.*, 2008). También, mediante el método de tricloruro de aluminio se han cuantificado flavonoides totales obteniéndose concentraciones de 6,66 mg equivalentes de quercetina /g con extractos etanólicos del fruto de *Zanthoxylum alatum* Roxb. (Batool *et al.*, 2010) y 22,80 mg equivalentes de quercetina /g con extractos etanólicos y en hexano de frutos y hojas de *Zanthoxylum armatum* DC (Barkatullah *et al.*, 2012).

Los extractos evaluados en el presente trabajo se obtuvieron a una concentración de dos gramos de material vegetal por mL de solvente. En la Tabla IV se muestran los resultados de la cuantificación de fenoles y flavonoides totales expresados en mg de ácido gálico/mL de extractos y mg de quercetina/mL de extracto respectivamente, donde los extractos metanólicos y acuosos de hojas de *A. balsamifera* y *Z. nannophyllum* y los extractos etanólicos de *S. glutinosa* y *Z. nannophyllum* mostraron concentraciones de fenoles y flavonoides totales superiores a los presentados por los estudios analizados.

5.3. Actividad antifúngica *in vitro* de extractos de hojas de *Z. nannophyllum*, *Z. pseudodumosum*, *Z. flavum*, *S. glutinosa* y *A. balsamifera*

La creciente necesidad de un sistema de manejo agroecológico integrado en cultivos de interés económico, ha motivado el desarrollo de investigaciones orientadas a buscar alternativas naturales y efectivas para el control de enfermedades causadas por hongos, como es el uso de extractos vegetales. Entre las especies vegetales evaluadas, ocupan un lugar significativo las de la familia *Rutaceae* de las cuales se han determinado actividades como la de *S. glutinosa* frente a *Colletotrichum* sp. Corda (Zambrano *et al.*, 2013) y *A. balsamifera* frente a *Candida albicans* (C.P. Robin) Berkhout (Dahiya-Manglik, 2013).

5.3.1. Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) de extractos de hojas de *Z. nannophyllum*, *Z. pseudodumosum*, *Z. flavum*, *S. glutinosa* y *A. balsamifera* frente a *M. fijiensis* y *A. solani*

El estudio de la MIC de un producto antimicrobiano resulta provechoso para determinar la dosis exacta a aplicar ante un microorganismo. La comparación de los resultados de MIC de diferentes extractos vegetales entre los diferentes estudios es limitada por el uso de diversas metodologías y definiciones de este parámetro (Klančnik *et al.*, 2010).

De esta forma, mediante difusión en agar se han realizado estudios de determinación de la MIC frente a *M. fijiensis* con extractos en diclorometano de *Piper pessaesatum* L., los cuales mostraron valores de 1 mg EAG/mL (Niño *et al.* 2011) y de 1 000 mg/L (Giraldo, 2012). A consecuencia de presentar alcaloides en toda la planta así como amidas, saponinas, flavonoides, coumarinas y taninos. Sin embargo, mediante dilución en agar, con los aceites esenciales de *Monodora myristica* Dunal, *Eucalyptus citriodora* Hook., *Ocimum gratissimum* Forssk. y *Eucalyptus torelliana* F.Muell. se obtuvieron valores de MIC de 1 mg/mL de extracto los tres primeros, y 5 mg/ml de extracto el último (Daouda *et al.*, 2010), debido a la presencia en el extracto de compuestos fenólicos.

Los valores de MIC referidos con anterioridad son modularmente superiores a los obtenidos en este trabajo con los extractos etanólicos de *Z. nannophyllum*, *Z. pseudodumosum* y *A. balsamifera*, así como con los extractos acuosos de *S. glutinosa*. Si se tiene en cuenta que en estos trabajos se determina la MIC mediante el método de difusión o dilución en agar, la difusión de los componentes que tendrá lugar en el medio de cultivo semisólido que emplean estos ensayos, será menor que en el medio de cultivo líquido de la microdilución (Hadacek y Greger, 2000), lo cual explica que los valores de este parámetro sean mayores.

Frente a *A. solani* se han realizado diversos estudios de determinación de la MIC mediante el método de microdilución en agar, como los de extractos acuosos de *Datura stramonium* Thunb. (270 mg/mL) (Jalander y Gachande, 2012), cuya actividad puede deberse a la presencia de compuestos como las saponinas: tigloidina, tigloxitropano-a-ol, tropina, apoatropino, hiosciamina, escopolamina presentes en el género *Datura*; así como el de extractos etanólicos de hojas de *Ageratum conyzoides* Sieber ex Steud., mediante difusión en agar, cuyos valores de MIC fueron de 78 mg/ mL de extracto (Madhusmita *et al.*, 2012) superiores al del presente estudio, aunque estas plantas presentan metabolitos como saponinas, taninos, glicósidos, alcaloides, terpenos y flavonoides.

Además, mediante microdilución en agar, con el extracto metanólico de raíces de *Muntingia calabura* L., se obtuvo un valor de MIC de 1 mg/mL frente a *A. solani* debido a la presencia en el extracto de compuestos con actividad antifúngica como el estigmasterol (Rajesh *et al.*, 2014), mientras que con el extracto de hojas de *Tithonia diversifolia* A.Gray en éter de petróleo y mediante dilución en agar la MIC fue de 8 mg/mL de extracto (Linthoingambi y Singh, 2013), resultado atribuido a la presencia de compuestos biológicamente activos como alcaloides, flavonoides y otros compuestos fenólicos.

Con extractos obtenidos de especies de la familia *Rutaceae* se han determinado valores de MIC de 1 250 y 625 µg/mL con aceites esenciales de *Amyris elemifera* Koen. ex Blume mediante el método de microdilución en agar (Setzer *et al.*, 2006) frente a *C. albicans* (C.P. Robin) Berkhout y *Aspergillus niger* Tiegh.. Los autores atribuyen la actividad antifúngica de este extracto a la presencia de compuestos en los aceites esenciales de dichas plantas tales como monoterpenoides, sesquiterpenoides, limonoides, linalool, β-cariofileno, 3-hexadecanonoides, cariofileno oxidado y β-sesquifelandreno. De forma semejante, extractos etanólicos de aceites esenciales de hojas, flores y raíces de *Swinglea glutinosa* Merr. frente a *Candida krusei* (Castell.) Berkhout y *Aspergillus fumigatus* Fresen. mediante el método de microdilución en agar, mostraron valores de MIC inferiores a los 500 µg/mL de extracto (Correa-Royero *et al.*, 2009) a consecuencia de la presencia en esta planta de compuestos como terpenos, geraniol y nerol. También, con extractos etanólicos de *Citrus aurantiifolia* (Christm.) Swingle y *Citrus reticulata* Blanco en etanol mediante microdilución en agar se obtuvieron valores de MIC de 5 mg EAG/mL de extracto a consecuencia de presentar compuestos como quinonas, flavonoides y alcaloides (Iglesias, 2012).

Aunque en los estudios citados con anterioridad se emplea como método de determinación de la MIC la microdilución en agar, los resultados son modularmente superiores a los obtenidos en este trabajo con extractos de los géneros *Swinglea* y *Amyris*, esto puede deberse a la presencia en estos extractos de elevadas concentraciones de metabolitos activos como antraquinonas y flavonoides.

5.3.2. Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de *A. solani* y *M. fijiensis* por los extractos de hojas de *Z. nannophyllum*, *Z. pseudodumosum*, *Z. flavum*, *S. glutinosa* y *A. balsamifera*

La evaluación *in vitro* de la inhibición del crecimiento micelial de un hongo constituye una vía rápida y confiable para determinar la eficacia de un producto antimicrobiano, que pueda ser empleado con carácter curativo, para tratar patologías que afectan especies vegetales o animales (Iglesias, 2012).

Frente a *M. fijiensis* se han realizado estudios de cálculo de inhibición del crecimiento micelial con extractos etanólicos de partes aéreas de *Commelina diffusa* Blanco, *Momordica charantia* L., *Sida rhombifolia* L., *Syzygium aromaticum* L. y *Piper peltatum* L.

los cuales inhibieron totalmente (100%) el crecimiento de este hongo (Celis *et al.*, 2008), debido a la presencia en estas plantas de compuestos fenólicos como los flavonoides (Alka *et al.*, 2012). Estos resultados coinciden con los obtenidos por los extractos de *S. glutinosa* en metanol y *A. balsamífera* en etanol frente a este hongo, lo que pudiera deberse a la presencia en sus hojas de metabolitos como flavonoides y otros como antraquinonas.

La inhibición del crecimiento micelial de *A. solani* mostrada por los extractos etanólicos y metanólicos de *S. glutinosa* y *Z. pseudodumosum* evaluados en este trabajo mediante la dilución en agar, resultó superior a los valores obtenidos con extractos de *Datura stramonium* (61%) y *Artimesia absinthium* L. (58%) mediante este mismo método de determinación de la actividad antifúngica (Ganie *et al.*, 2013). Las diferencias en cuanto a los porcentajes de inhibición entre ambos estudios, pudo deberse a que en los extractos de hojas de *Rutaceae* fueron halladas elevadas concentraciones de aminas, aminoácidos y antraquinonas, compuestos que no se encontraron en los extractos de *Datura stramonium* y *Artimesia absinthium* que solo poseían resinas y canabiol.

Se han realizado estudios de inhibición del crecimiento micelial con extractos pertenecientes al género *Zanthoxylum*. De esta forma, se han obtenido, mediante el método de difusión en agar, porcentajes de inhibición de 51% y 80% con extractos de *Z. monophyllum* frente *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* Prill. & Delacr.) W.C. Snyder & H.N. Hansen y *Botrytis cinerea* Pers. respectivamente (Moreno, 2011) y valores de inhibición superiores al 50% con extractos de *Z. armatum*, mediante dilución en agar, frente a *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. y *Aspergillus flavus* Link (Barkatullah *et al.*, 2012). Los resultados de los trabajos referidos con anterioridad son semejantes a los obtenidos en este trabajo, pues aunque la técnica de determinación de la actividad antifúngica empleada en este estudio fue la dilución en agar, los extractos de *Z. nannophyllum*, *Z. pseudodumosum* y *Z. flavum* poseen altas concentraciones de flavonoides, al igual que las especies *Z. monophyllum* y *Z. armatum*.

En contraste, con extractos etanólicos de *S. glutinosa* mediante el método de difusión en agar, se calcularon porcentajes de inhibición del crecimiento micelial de 98% frente a *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. (Osorio *et al.*, 2012). Estos resultados son similares a los obtenidos en este trabajo cuando se emplea este extracto y al realizado con extractos etanólicos de *Citrus latifolia* (Iglesias, 2012) frente a *A. solani*. La diferencia está en que se emplea una técnica de determinación de la actividad

antifúngica diferente y que en la composición del extracto se destacan elevadas cantidades de terpenos, metabolitos no detectados en nuestro estudio.

5.3.3. Fracción química de los extractos de hojas de *Z. nannophyllum*, *Z. pseudodumosum*, *Z. flavum*, *S. glutinosa* y *A. balsamifera* que inhibe el crecimiento de *M. fijiensis* y *A. solani*

Los compuestos derivados del metabolismo secundario de las plantas, desempeñan un rol importante como productos antifúngicos (Cowan, 1999) y son varios los trabajos publicados acerca de estos metabolitos y sus acciones específicas. Esta condición se estudia con el propósito de demostrar de forma específica, qué metabolito en particular presenta la actividad fungicida y su modo de acción contra patógenos vegetales (Iglesias, 2012).

Los resultados del presente estudio muestran la actividad antifúngica de flavonoides, saponinas, antraquinonas y otros compuestos no identificados, frente a *M. fijiensis* y *A. solani* (Tabla VIII), resultados que coinciden con estudios de bioautografía realizados a los extractos de hojas de *Citrus aurantium* L. var *sinensis* L., *C. aurantium* L., *C. latifolia* y *C. aurantiifolia* frente a *A. solani* (Iglesias, 2012).

La actividad antifúngica de las cumarinas se debe a la interacción que tiene lugar entre la región hidrofílica de su estructura y el lado polar de las membranas microbiales, pues su anillo benceno y su cadena alifática irrumpen en la estructura de mosaico fluido de las membranas microbianas, provocando el colapso celular (Viuda-Martos *et al.*, 2008).

Se ha demostrado que el heraclenino, un derivado cumarínico, aislado del fruto de *Aegle marmelos* (L.) Corrêa posee actividad antifúngica frente a *Aspergillus niger*, *Rhizopus oryzae* Went & Prins. Geerl. y *Aspergillus flavus* (Mangala *et al.*, 2011). Similarmente, la cumarina sintética 7-6-alquilo-3-*n*-butil-7-hidroxi-4-metilcumarinas es activa frente a *Rhizoctonia solani* J.G. Kühn, *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl. , *Drechslera oryzae* (Breda de Haan) Subram. & B.L.Jain, *Pythium phanidermatum* (Edson) Fitzp., *Colletotrichum falcatum* Went. Archief voor de Java Suikerindustrie, *Fusarium solani* y *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. (Singh *et al.*, 2007), así como derivados sintéticos de la 3-aminocumarina son activos frente a *Aspergillus niger*, *Penicillium italicum* Wehmer y *Fusarium oxysporum* Schltdl. (Al Haiza *et al.*, 2005).

Los flavonoides poseen actividad fungicida debido a que alteran las zonas hidrofóbicas e hidrofílicas de las membranas micóticas, interfiriendo con su fluidez. Además, provocan la fusión de orgánulos citoplasmáticos, forman complejos con la pared de las células de los hongos y con las proteínas solubles en el citoplasma, alterando la función de estas estructuras (Gonzalez, 2013).

Flavonoides extraídos de *Phaleria macrocarpa* Scheff., como el kaempferol, miricetina, narangina, y el rutin poseen actividad antifúngica frente a *Aspergillus niger* (Hendra *et al.*, 2011) y los extraídos de *Retama raetam* Webb & Berthel son activos frente a *Candida albicans*, *C. glabrata* (H.W. Anderson) S.A. Mey. & Yarrow, *C. parapsilosis* (Ashford) Langeron & Talice y *C. krusei* (Edziri *et al.*, 2012). De modo similar, flavonoides obtenidos de *Mangifera indica* L., tales como epicatekin-3-O- β -glucopiranosido, 5-hidroxi-3-(4-hidroxifenil) pirano [3,2-g]cromeno-4(8H)-one, 6-(*p*-hidroxibenzil)taxifolin-7-O- β -D-glucosido, además del quercetin-3-O- α -glucopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopiranosido y epicatekin(2-(3,4-dihidroxifenil)-3,4-dihidro-2H-cromeno-3,5,7-triol presentaron actividad antifúngica frente a *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler, *Aspergillus fumigatus* Fresenius, *A. niger* van Tieghem, *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. y *Penicillium citrii*. Link (Kanwal *et al.*, 2010).

Estos compuestos, obtenidos sintéticamente, también pueden presentar actividad antifúngica, tal es el caso del 2-fenil-cromo-4 flavona frente a *Colletotrichum gloeosporioides*, *Aspergillus niger*, *A. flavus* y *Penicillium* sp. Link (Alam, 2004).

Las actividad antifúngica de las saponinas se basa en la habilidad de estos compuestos de formar complejos con los esteroides de las membranas plasmáticas y provocar la aparición de poros transmembranales, causando la lisis de las células (Caulier *et al.*, 2011).

Se ha estudiado que la sapogeninas, aliogenina y neoagigenina, aislados de aceites esenciales de *Allium minutiflorum* Regel mostraron actividad antifúngica frente a *Trichoderma* sp. Pers. y *Pythium ultimum* Trow (Barile *et al.*, 2007), así como saponinas aisladas de *Capsicum frutescens* L. fueron activas frente a *Candida* spp. Berkhout y *Aspergillus fumigatus* Fresen.. De modo similar, las saponinas 6 α -O-[β -D-xilopiranosil-(1 \rightarrow 3)- β -D-quinovopiranosil]-(25,S)-5 α -espirostan-3 β -ol aisladas de las hojas de *Solanum hispidum* Pers., tienen actividad antimicótica frente a *Trichophyton mentagrophytes* (C.P. Robin) R. Blanch. y *Trichophyton rubrum* (Castell.) Sabour. (Abad *et al.*, 2007) y la hederogenina-3-O- α -L-arabinosida presentes en *Sapindus mukurossi* L.,

Mohave yucca L. y *Quillaja saponaria* Poir., mostraron actividad frente a *Candida albicans* (Tamura *et al.*, 2012).

Las quinonas son metabolitos bioactivos debido a que pueden obstaculizar la cadena de transporte de electrones de la mitocondrias de las células del hongo e inhibir de esta manera la síntesis de ATP. Además forman complejos irreversibles con los aminoácidos hidrofílicos de las proteínas de las membranas microbianas, lo cual conduce a la inactivación de las mismas (González, 2013).

Se ha determinado que quinonas como el krisofanol (1,8- dihidroxi-3-metilantracenediona) contenida en los aceites esenciales de *Citrus sinensis* posee actividad antifúngica frente a *Candida albicans* (García-Sosa *et al.*, 2006). De igual manera combinaciones de determinados metales (Níquel, cromo, hierro, cobre y cobalto) con la 5-amino-8-hidroxi-1,4-naptoquinona son activas frente a *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus intermedius*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus uberis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus cereus*, *Salmonella typhimurium*, (Brandelli *et al.*, 2004).

De modo similar quinonas identificadas en *Ocinum bacilicum* L., *Lantana camara* L., *Cymbopogon citratus* Stapf, *Nerium oleander* L. y *Olea europea* L. mostraron actividad antifúngica frente a *Trichophyton mentagrophytes*, *Microsporum canis* (E. Bodin) E. Bodin, *Trichophyton equinum* Gedoelst, *Trichophyton verrucosum* E. Bodin y *Microsporum gypseum* (E. Bodin) Guiart & Grigoraki (Bokhari, 2009). Además, naptoquinonas, como la 8-dihidroxi-1,4-naptoquinona son activas frente a *Candida* spp. y *Aspergillus niger* (Riffel *et al.*, 2002).

En el presente estudio se encontró actividad antifúngica de compuestos no identificados por las técnicas cromatográficas empleadas, sin embargo en la literatura consultada se ha estudiado la actividad de otras clases de compuestos tales como los taninos y sus formas hidrosolubles que poseen actividad antifúngica frente a *Botrytis cinerea* Pers., *Aspergillus niger*, *Colletotrichum graminicola* (Ces.) G.W. Wilson, *Gloeophyllum trabeum* (Pers.) Murrill, *Trichoderma viride* Pers., y *Penicillium* sp. Link (Lattanzio *et al.*, 2006). Así como compuestos fenólicos de diverso tipo como el catecol y el ácido protocatecuico, activos frente a *Colletotrichum circinans* (Berk.) Voglino. De modo similar, compuestos cetónicos como benzaldehídos inhiben totalmente la germinación de esporas de *Botrytis cinerea* y de *Monilia fructicola* L.R. Batra (Lattanzio *et al.*, 2006).

Los terpenos son los principales responsables de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales, la cual se basa en su capacidad para dañar las biomembranas, pues interactúan con las enzimas transportadoras e interfieren en procesos vitales como la osmosis, la síntesis de esteroides, fosfolípidos y sus derivados (Gonzalez, 2013). Se ha demostrado que los sesquiterpenos lactonas poseen actividad antifúngica frente a *Candida albicans*, *Trychophyton rubrum* y *Scytalidium dimidiatum* (Penz.) B. Sutton & Dyko, (Verma *et al.*, 2011) además de actividad antimicrobiana frente *Staphylococcus aureus*, *Brochotrix thermosphacta*, *Escherichia coli*, *Salmonella spp.* y *Listeria monocytogenes* (Di Pasqua *et al.*, 2005).

Los alcaloides son capaces de intercalarse en el ADN microbiano e inhibir la actividad de la proteína topoisomerasa, involucrada en la síntesis de este ácido nucleico, causando cambios morfológicos y lisis en las células (Karou *et al.*, 2006). Algunos de ellos, como la isoquinolina, la hunnemanina y la norsanguinarina, aisladas de *Eschscholtzia californica* L., son activos frente a *Alternaria melongenae* Rangaswami & Samb., *Curvularia lunata* (Wakker) Boedijn, *C. maculans* (C.K. Bancr.) Boedijn, *Helminthosporium penniseti* A.P. Misra, *H. oryzae* Breda de Haan, *Fusarium lini* Bolley (Singh *et al.* 2009). Similarmente, alcaloides del tipo aporfina, β -magnoflorina y α -magnoflorina, obtenidos de *Clematis parviloba* Gardner & Champ. poseen actividad antifúngica frente a *Penicillium avellaneum* Thom & Turesson (Chen *et al.* 2009) y los extraídos de *Phyllanthus amarus* L. frente a *Alternaria alternata*, *A. solani*, *Curvularia lunata*, *C. pallescens* Boedijn, *C. maculans*, *Colletotrichum spp.* Corda, *C. musae* (Berk. & M.A. Curtis) Arx, *C. gloeosporioides*, *Fusarium udum* E.J. Butler, *Helminthosporium echinoclova* A.P. Misra, *H. penniseti* A.P. Misra y *Heterosporium spp.* Klotzsch ex Cooke (Singh *et al.*, 2007).

Teniendo en cuenta que la técnica empleada para la determinación de los metabolitos con actividad antifúngica fue la TLC, poco específica y donde la visualización de un compuesto depende de la concentración del mismo, cualquiera de los compuestos antes mencionados podría estar presente en los extractos evaluados, y ser uno de los no identificados.

Los resultados de este trabajo demuestran el potencial antifúngico de los extractos obtenidos a partir de hojas de cinco especies de la familia *Rutaceae* frente a *M. fijiensis* y *A. solani*, los que constituyen una alternativa viable para su empleo como una estrategia de manejo agroecológico de estos microorganismos.

6. Conclusiones

1. Los extractos obtenidos a partir de hojas de *Zanthoxylum nannophyllum*, *Zanthoxylum pseudodumosum*, *Zanthoxylum flavum*, *Swinglea glutinosa* y *Amyris balsamifera* se caracterizaron fitoquímicamente, identificándose la presencia de fenoles, aminoácidos, aminas, azúcares reductores y varias clases de flavonoides.
2. Los extractos evaluados se consideraron promisorios frente a *Mycosphaerella fijiensis* siendo los extractos de *Swinglea glutinosa* en metanol y *Amyris balsamifera* en etanol los que mostraron mayores porcentajes de inhibición (100%).
3. Los extractos evaluados se consideraron promisorios frente a *Alternaria solani* siendo los extractos de *Swinglea glutinosa* en etanol y *Zanthoxylum pseudodumosum* en metanol los que mostraron mayores porcentajes de inhibición (100%).
4. Las antraquinonas fueron los compuestos químicos presentes en los extractos evaluados con mayor actividad antifúngica frente a *Mycosphaerella fijiensis* y *Alternaria solani*.

7. Recomendaciones

- Determinar la actividad antifúngica de los extractos frente a hongos patógenos de otros cultivos de interés económico.
- Determinar la actividad antifúngica *in vitro* de las fracciones puras de los compuestos identificados con actividad antifúngica.

Abad, M. J. A., M; Bermejo (2007): "Active antifungal substances from natural sources." **ARKIVOC** 2: 116-145.

Abd El-Khair y Wafaa, F.T (2007): Food preservative activity of phenolic compounds in l extracts of *Allium sativum* L. **Lucrări Științifice**. 53: 457-464.

Adeyemi, L. y Oladiji, A. (2009): *Musa* spp. ,características e importancia. Variedades. **International Crops and Products**. 28: 149-156.

Adewusi, E.A y Afolayan, A.J (2009): Antibacterial, antifungal and antioxidant activity of the roots and leaves of *Pelargonium reniforme* Curtis (*Geraniaceae*). **African journal of biotechnology**. 8: 6425-6433.

Adekunle, A. S. K. J. P. R. J. B. T. (2013): "Antioxidant activity and HPLC analysis of *Zanthoxylum zanthoxyloide*." **Report and Opinion**. 4: 8.

Al-Haiza, M. A. M., M.S; El-Kady, M.Y (2005): "Preparation of some new coumarin derivatives with biological activity." **Scientific Journal of King Faisal University (Basic and Applied Sciences)**. 1426.

Alam, S. (2004): "Synthesis, antibacterial and antifungal activity of some derivatives of 2-phenyl-chromen-4-one." **Journal Chemical Science**. 116: 325-331.

Agrios, G.N (2005): **Plant Pathology**. Academic Prey. 5 th edition. Estados Unidos. 952

Álvarez, R y Delgadillo, F (2004): Enfermedades del tomate y chile Bell. Memorias del IV Simposio Nacional de Horticultura. Invernaderos: Diseño, Manejo y Producción. Torreón: México.

Alka, J. P., K; Chitra, J (2012): "Antifungal activity of flavonoids of *Sida acuta* Burm f. against *Candida albicans*." **International Journal of Drug Development & Research** 4: 5.

Andrade, R.; García, R.; Castillo, O.; Rosabal, L. (2002): Características del cultivo de *Solanum tuberosum*. **Revista UDO Agrícola** Programa de Fitopatología y Programa de Horticultura. 6: 100-108.

Aponte, C. F. L (2010): Estudio fitoquímico y alelopático de extractos polares de hojas de *Swinglea glutinosa* Merr. (*Rutaceae*). **Grupo Polifenoles UTP**. Universidad Tecnológica de Pereira. 3:162.

- Arzate-Vega, J. M.-A., A.C; Domínguez-Márquez, V.M; Santos-Eméstica, O.A (2006): "Antagonismo de *Trichoderma* spp. sobre *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, agente causal de la Sigatoka Negra del Plátano (*Musa* sp.) *in vitro* e Invernadero." **Revista Mexicana de Fitopatología**. 24: 98-104.
- Augstburger, F.; Heldenberg, W; Staufendhause, A.; Keiser, L. (2002): Plátano. Variedades y resistencia fitoquímica en campo a principales enfermedades. **Lebensm.-Wiss. u.-Technol**. 35: 300-305.
- Barile, E. B., G; Antignan, V; Zolfaghari, B; Sajjadi, I.S, Scala, F; Lanzotti, V (2007): "Saponins from *Allium minutiflorum* with antifungal activity." **Phytochemistry**. 68: 596-603.
- Barkatullah; Ibrar, M. M., N; Tahir, L (2012): "Antimicrobial evaluation, determination of total phenolic and flavonoid contents in *Zanthoxylum armatum* DC." **Journal of Medicinal Plants Research**. 6: 2105-2110.
- Barrios, M. A(2006): Estudio de hongos endofíticos como inductores de resistencia para el control de Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) en plátano. **Escuela de posgraduados**. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. 28:12
- Batool,J. I.; Welles, A.R; Richardson, E.A (2010): Chemical analysis and antimicrobial activities of *Zanthoxylum alatum* Roxb. **Journal of Medicinal Plants Research**. 6: 2105-2110.
- Bejarano R.J, y Centeno, S.J (2009): Extracto de *Citrus limon* para el control de aflatoxinas y hongos aflatoxigénicos en alimentos concentrados para pollos de engorde producidos en Venezuela. **Research Science Virochal** 29: 57-6.
- Berazain, R. (2008): Actualización de la lista de los géneros endémicos cubanos espermatófitos. **Revista del Jardín Botánico Nacional**. 29: 3-10
- Beurton, Ch. (2008): *Rutaceae* En Greuter, W. (ed.). Flora de la República de Cuba. Serie A. Plantas Vasculares. Fascículo 8 . Pp. 68. **Koeltz Scientific Books**, Königstein.
- Blainski, A. C., G; Palazzo de Mello, J.F (2013): "Application and analysis of the Folin Ciocalteu method for the determination of the total phenolic content from *Limonium Brasiliense* L." **Molecules**. 18: 6852-6865.
- Bokhari, F. M. (2009): "Antifungal activity of some medicinal plants used in Jeddah, Saudi Arabia." **Mycopathology**. 7: 51-57.

Bonilla, J. A. (2009): "Caracterización de los genes MAT 1-1 y MAT 1-2 del hongo *Mycosphaerella fijiensis*, agente causal de la Sigatoka negra, en la provincia de Guayas". **Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar: 4:74**

Brandelli, A. B., D; Martinelli, M; Stefani, W; Engel, A (2004): "Antimicrobial activity of 1,4-naphthoquinones by metal complexation". **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences. 40: 247-254.**

Capote, A. R., N; Pérez, O; Marrero, N (2002): Fitotoxicidad de los filtrados de cultivos de *Alternaria solani* Sorauer. II. Efecto sobre el crecimiento de callos y plántulas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cultivados *in vitro*. **Revista de Protección Vegetal. Instituto de Investigaciones Fundamentales en Agricultura Tropical "Alejandro de Humboldt" (INIFAT). 17: 34-39.**

Carr, A.D 2009: "Hongos biocontroladores frente a *Mycosphaerella fijiensis*." **Agronomía Colombiana. 27:14.**

Casado, C. M. G., Y.I; Rodríguez, E (2011): Acercamiento al género *Murraya* (*Rutaceae*) y a la especie *Murraya paniculata* (L.) Jack. **Revista Cubana de Plantas Medicinales. Universidad de La Habana, Instituto de Farmacia y Alimentos. 16: 408-418.**

Caulier, G. V. D., S; Gerbaux, P; Eeckhaut, I; Flammang, P (2011): "Review of saponin diversity in sea cucumbers belonging to the family *Holothuriidae*." **SPC Beche-de-mer Information. 31: 48-54.**

Calier, J.; Crous, P.W; Grenewall, A. (2003): Interanting morphological and molecular data sets on *Mycosphaerella fijiensis* with specific reference to species occurring in *Musa* spp. **Session 1 INIVAP: *Mycosphaerella* leaf spot diseases on bananas. 1-12.**

Celis, A. M., C; Pachón, M; Cardona, J; Delgado, W; Cuca, L.E (2008): Extractos vegetales utilizados como biocontroladores con énfasis en la familia *Piperaceae*. **Agronomía Colombiana. 26:12**

Correa-Royero, J. T., V; Durán, C; Stashenko, E; Mesa-Arango, A (2009): *In vitro* antifungal activity and cytotoxic effect of essential oils and extracts of medicinal and aromatic plants against *Candida krusei* and *Aspergillus fumigatus*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy. University of Antioquia, Department of Microbiology and Parasitology: 8:14**

Coulibaly, R; Ramones, A.; Yusuf, C.; Castillo, O. (2007): Producción y comercialización de variedades resistentes de *Musa* spp. y *Solanum tuberosum* L. **Agronomía Costarricense**. 31:24-27.

Cowan, M. M. (1999): "Plant Products as Antimicrobial Agents." **National Institutes of Health. US National Library of Medicine**. 12:18.

Chávez, P. (2008): "La Papa, Tesoro de los Andes." **Centro Internacional de la Papa (CIP)**: 25.

Chapagain, B.P, Z. Wiesman y T. Srór: (2007): *In vitro* study of the antifungal activity of saponin-rich extracts against prevalent phytopathogenic fungi. **International Crops and Products**. 26:109-115.

Chen, Y.; Zhan, T.; Ju, Y.; (2009): Extracts of *Clematis parviloba* used against *Penicillium avellaneum*. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**. 5: 38-45.

Dahiya, P. y. M., A (2013): "Evaluation of antibacterial, antifungal and antioxidant potential of essential oil from *Amyris balsamifera* against multidrug resistant clinical isolates". **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**. 6: 57-60.

Daouda, K. B., C; Odjoutchoni, B; Mohamed, D; Sibirina, S; Aya, N; Edson, B (2010): Fungicides and biological products activities towards fungi causing diseases on banana and vegetable in Côte d'Ivoire. **African journal of biotechnology**. 9:31.

Deacon, J (2006): **Fungal Biology**. Blackwell Publishing Ltd. 4th edition

Di Pasqua, R. D. F., V; Villani, F; Mauriello, G (2005): "*In vitro* antimicrobial activities of essential oils from Mediterranean *Apiaceae*, *Verbenaceae* and *Lamiaceae* against foodborne pathogens." **Annals of Microbiology**. 55: 139143.

Dubey, D. R., S; Sahu, M.C; Debata, N.K; Padhy, R.N (2012): "Antimicrobials of plant origin against TB and other infections and economics of planta drugs- Introspection." **Indian Journal of Traditional Knowledge**. 11: 225-233.

Edziri, H. M., M; Mahjoub, M.A; Mighri, Z; Mahjoub, A (2012): "Antibacterial, antifungal and cytotoxic activities of two flavonoids from *Retama raetam* flowers". **Molecules**. 17: 7284-7293.

Escuredo, O.; Seijo, M.C; Fernández-González, M.; Iglesias, I. (2010): Effects of meteorological factors on the levels of *Alternaria* spores on a potato crop. **International journal of biometeorology**. 6: 1-10.

- Espert, M. (2012): Aplicación de ultrasonidos o energía de microondas a la extracción de compuestos antioxidantes en infusiones de hojas de *Stevia*. **Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del medio natural**. Universidad politécnica de Valencia: 15
- Estevez, A. y Gonzalez (2010): El cultivo de la papa en Cuba. **Instituto Nacional de Ciencias Agropecuarias**. 534
- Estevez, A. y Gonzalez, M.E (2006):. "La Papa, características y evolución económica." **Instituto Nacional de Ciencias Agropecuarias Cap. I: 35**.
- Faostat (2013): <http://faostat.fao.org>. Accessed: 15 de febrero de 2013.
- Folleco, J.V. y Zapata, J.C (2006): "Evaluación *in vitro* de extractos vegetales sobre *Mycosphaerella fijiensis* Morelet." **Agronomía**. 14: 37-50.
- Fonseca, Y. A. C., D.E; León, T.E (2011): Efecto antagónico *in vitro* de actinomicetos aislados de purines de chipaca (*Bidens pilosa* L.) frente a *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary. **Revista de la Facultad Nacional Agraria de Medellín**. 64: 6111-6119.
- Fungal Database Nomenclature and Species Banks. (<http://www.mycobank.org>).
- Ganie, S. A. G., M.Y; Nissar, Q; Rehman; S (2013): "Bioefficacy of plant extracts and biocontrol agents against *Alternaria solani*." **African Journal of Microbiology Research** 7: 4397-4402.
- García-Sosa, K. V.-A., N; Lübben, P; Peña-Rodríguez, L.M (2006): "Chrysophanol, an antimicrobial anthraquinone from the root extract of *Colubrina greggii*." **Journal Mexican Chemical Society**. 50: 76-78.
- Giraldo, A. (2012): Estudio fitoquímico de *Piper pesaresanum* y *Piper crassinervium*. **Facultad de Tecnología**. Escuela de Tecnología Química, Universidad Tecnológica de Pereira: 116.
- González, L. R., T; Rodríguez, S; Román, M.I; Hernández, M; Beovides, Y; Ramón, J; Reinaldo, E (2006): Caracterización morfoagronómica de genotipos de plátanos pertenecientes al Banco de Germoplasma de *Musa* spp. del INIVIT. Cuba: 15
- Gonzalez, P. y. R., R (2006): Instructivo tecnico. 15: 39.
- Gonzalez, D. (2013): Modo de acción de extractos de hojas de *Citrus* spp. frente a *Passarola fulva* (Cooke)U. Braun & Crous 2003 y *Alternaria solani* Sor. hongos

fitopatógenos de *Lycopersicon esculentum* Mill. [Tesis de Diploma]. Santa Clara: Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas.

Gonzalez-García , K; J.A. González -Lavaut,; Agüero-Agüero, J. Rivas-Vega, Y. Urquiola-Cruz, A (2004): Evaluación fitoquímica preliminar de cuatro especies endémicas cubanas de *Zanthoxylum* (*Rutaceae*) **Acta Farmacia Bonaerense**. 23: 71-4

Guerrero-Rodríguez, E, S. Solís-Gaona, F.D. Hernández-Castillo, A. Flores-Oliva y V. Sandoval-López (2007): Actividad biológica *in vitro* de extractos de *Flourensia cernua* D.C. en patógenos de postcosecha: *Alternaria alternata* (Fr: Fr.) Keissl, *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc y *Penicillium digitatum* (Pers.:Fr) Sacc. **Revista Mexicana de Fitopatología**. 25: 48-53.

Gutierrez, A. (2012): Caracterización de ciclótidos de *Leonia triandra* (*Violaceae*) con actividad antifúngica contra *Mycosphaerella fijiensis* Morelet en el plátano. **Facultad de Tecnología. Biotecnología-productos Naturales**. Universidad Tecnológica de Pereira.

Gudmestad, N.C; Arabiat, S.; Miller, J.S; Pasche, J.S (2013): Prevalence and impact of SDHI fungicide resistance in *Alternaria solani*. **Plant Disease**. 17: 97

Hadacek, F y Greger, H (2000): Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice. **Phytochemical analysis**. 11:137-147.

Hadian, J. (2012): Compounds presence in vegetals extracts of leaves and roots of *Azadirachta indica* Juss. **Current Science**. 99: 4.

Halliwell, B. R., J; Jenner, A (2005): "Health promotion by flavonoids, tocopherols, tocotrienols, and other phenols: direct or indirect effects? Antioxidant or not?" **The American Journal of Clinical Nutrition**. 81: 14.

Hamildendin, A.M; Hussin, N.M; Ahmad,S; Ramli, R; Mahmood, M; Soleiman, M.R; Aziz, K.N.K. (2014): Actual situation of some cultivs with global importance and antifungal activity of extracts and phenolic compounds from *Cinnamomum zeylanicum* Blume and *Azadirachata indica* Juss against some fungal pathogens from this cultivate. **African journal of biotechnology**. 8: 2835-2842.

Hassanein, M; Yussuf, A., Bafuchter, M (2008): Chemical analysis of leaves of *Azadirachta indica* Juss. **International Journal of Molecular Sciences**. 9: 1002-1040.

Hendra, R. A., S; Sukari, A; Shukor, M.Y; Oskoueian, E (2011): "Flavonoid analyses and antimicrobial activity of various parts of *Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl fruit." **International Journal of Molecular Sciences**. 12: 3422-3431.

Hernández, J. B. S., N; Blanco, B; Pérez, A (2009): Predicción de Sigatoka negra en plátano Hartón bajo condiciones de fertilización del suelo en el municipio de Veroes del estado de Yaracuy, Venezuela. **Agronomía Tropical**. 59: 317-322.

Herrera, Y (2011): Actividad antioxidante *in vitro* y toxicidad frente a *Artemia salina* de extractos hidroalcohólicos de cinco especies de cítricos. **[Tesis de Diploma]**. Santa Clara: Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas.

Hidalgo, M. T., A; Rodríguez, W; Serrano, E (2006): "Efecto de la Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*) sobre la fotosíntesis y transpiración foliar del banano (*Musa* sp. AAA, cv. Valery)" . **Agronomía Costarricense**. 30: 35-41.

Iglesias, D. (2012): Actividad antifúngica *in vitro* de extractos hidroalcohólicos de hojas de *Citrus* spp. frente a hongos fitopatógenos de *Lycopersicum esculentum* Mill. **[Tesis de Diploma]**. Santa Clara: Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas.

International Plant Name Index (IPNI) (<http://www.ipni.org>).

Islam, K. N., N; Saha, S; Hossain, H; Ara, I; Khan, T.A; Awang, K; Shilpi, J.A (2014): "Antinociceptive and antioxidant activity of *Zanthoxylum budrunga* Wall (*Rutaceae*) seeds Md." **The Scientific World Journal**. 10:7.

Ivonne, L.E; Casimiro, E.L; Lorenzo, M.R; Imilza, R.A. (2010): Análisis fitoquímico de *Swinglea glutinosa* . **Agrociencia**. 46:508-512.

Jabeen, K. (2013). "Antifungal Activity of *Azadirachta Indica* against *Alternaria Solani*." **Journal of Life Sciences and Technologies**. 1: 5.

Jalander, V. y. Gachande, B.D (2012): "Efecto de extractos acuosos de hojas de *Datura* sp. contra dos hongos fitopatógenos". **International Journal of Food, Agriculture and Veterinary Sciences**. 2: 131-134.

Johann, S. P., M.G; Donnicill, C.L; De Resende, M.A (2007): "Antifungal properties of plants used in Brazilian traditional medicine against clinically relevant fungal pathogens." **Brazilian Journal of Microbiology**. 38: 10.

- Jorrín, J. V. A., M.N; Bárcena, J.A (2011): Separación de aminoácidos por cromatografía en capa fina y detección mediante reacción con ninhidrina. **Departamento de Bioquímica y Biología Molecular**. Córdoba, Campus Universitario de Rabanales: 11.
- Kanwal. A; Ilboudo, D.P; Simpore, J (2010): "Flavonoids: A review of their uses, phytochemistry and biological activities." **Pakistan Journal of Biological Sciences**. 14: 149-169.
- Karou, D, A. Savadogo, A. Canini, S. Yameogo, C. Montesano, J. Simpore, V. Colizzi y A.S. Traore (2006): Antibacterial activity of alkaloids from *Sida acuta*. **African journal of biotechnology**. 5: 195-200.
- Kishore, V. P. G., S. K; Singh, S (2008): "Biological control of *Alternaria solani*, the causal agent of early blight of tomato." **Journal of Biological Control**. 22: 67-72.
- Klančnik, A, S. Piskernik, B. Jeršek, S. Smole (2010): Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. **Journal of microbiological methods**. 81: 121-126.
- Kumar, S. y. P., A.K (2013): "Chemistry and Biological Activities of Flavonoids." **The Scientific World Journal**. 11: 16.
- Lattanzio, V.; Veronicos, M. T.; Cardinali, C. (2006): Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects. **Phytochemistry**. 2: 23-67.
- Lassois, L. F., P; De Bellaire, L; Lepoivre, P; Jijakli, H (2011): "Identification of genes involved in the response of banana to crown root disease." **Molecular plant-microbe interactions**. 24: 143-153.
- Leiva-Mora, M. V., N; Alvarado-Capó, Y . (2006): "Protocolo para la diferenciación de genotipos de papa mediante la inoculación artificial de suspensiones miceliales de *Alternaria solani* Sor. en cantero y campo." **Biotecnología Vegetal**. 6: 45-49.
- Linthoingambi, W. y. Singh, M.S (2013): "Antimicrobial activities of different solvent extracts of *Tithonia diversifolia* (Hemsely) A. Gray." **Asian Journal of Plant Science and Research**. 3: 50-54.
- López, R. (2004): Papa. Características e importancia. **Temas Agrarios**. 10: 10 -20
- McMullen, Ch. y Hassan, H. (2012): The Comparison of Flavonoids in Orange. **UNIVE**. 7:1-4.

Madhusmita, M. K., M; Sahu, R.K (2012): "Bioefficacy of some plant extracts on growth parameters and control of diseases in *Lycopersicum esculentum*." **Asian Journal of Plant Science and Research**. 2: 129-142.

Mahlo, S.M, L.J. McGaw y J.N. Eloff (2010): Antifungal activity of leaf extracts from South African trees. **Crop Protection**. 29: 1529 -1533.

Mangala, P. H., K; Kishore, H; Manjusha, O; Biswas, S; Murty, U.S.N (2011): "Microbial transformation of (+)-heraclenin by *Aspergillus niger* and evaluation of its antiplasmodial and antimicrobial activities." **CURRENT SCIENCE**. 100: 6.

Marín, O. J. M., M.J; Barrera, J; Robles, J (2008): "Evaluación de extractos de extractos vegetales para el control de *Mycosphaerella fijiensis* en platano en Tierralta- Córdoba". **Temas Agrarios**. 1: 25-31.

Martín -Thurston, A.O. (2005): "Tizón temprano de la papa." **Corbana. Dirección de investigaciones sección de fitopatología**. 1: 3.

Martínez-Guzmán, L.F.(2010): Control fitosanitario en cultivos de *Musa* spp. **Agrociencia**. 46:65-69.

Martínez-Nicolás, J. C., A; Porras, I; Ortuño, A; Del Río, J.A (2013): "Distribución de flavononas y flavonas en frutos de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck." **Science Reference N° C0351**. 6:5

Martínez, I. V., R; Soto, E; Murillo, G; Guzmán, M (2011). "Manejo de la Sigatoka negra en el cultivo del banano." **Corbana. Dirección de investigaciones sección de fitopatología**. 2: 2.

Maswada, H. F. A. y. A.-A., S.A.A (2012): "*In Vitro* antifungal evaluation of three wild plant extracts against three post-harvest pathogenic fungi." **Journal Agricultural Research Kafr El-Sheikh Univ**. 38:15.

Milán, M.D; Rodríguez, S.J; Morales, A.L; Espinosa, E; Ventura, J.C (2013): Instructivo técnico del cultivo del plátano. Identificación de variedades comerciales resistentes al cambio climático. 14. Ministerio de la agricultura e Instituto nacional de Investigaciones de Viandas Tropicales.pp 50.

Mishra, A. K. M., A; Kehri, H.K; Sharma, B; Pandey, A.K (2009): "Inhibitory activity of indian spice plant *Cinnamomum zeylanicum* extracts against *Alternaria solani* and

Curvularia lunata, the pathogenic dematiaceous moulds." **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**. 8: 7.

Mónaco, C, A. Nico, M. Rollán y M. Urrutia (2001): Efecto «in vitro» de dos fungicidas sobre la micoflora antagonista al tizón temprano del tomate. **Investigaciones Agrícolas: Producción y Protección Vegetal**. 16: 325-332.

Morales, L. M. U., M.A; Dávila, A; Maza, N (2010): Respuestas de cultivares de *Musa* spp. a *Mycosphaerella fijiensis* Morelet y contribución al manejo de la enfermedad mediante el empleo de extractos vegetales. **Agrociencia**. 16: 36-39

Moreno, J. P. (2011): Actividad antifúngica de los extractos vegetales de *Piper eriopodon* y *Zanthoxylum monophyllum* y sus metabolitos secundarios mayoritarios sobre dos hongos fitopatógenos del clavel. (*Dianthus caryophyllus*). **Facultad de Agronomía**. Universidad Nacional de Colombia: 159.

Morillo, A; Fernandez, A.;Rodriguez, L. (2010): Método de extracción por ultrasonido. Características y utilidades. **Agrociencia**. 46:40-49.

Moreno, S. S.-M., S.M; Cárdenas-Ávila, M.L; Hernández-Piñero, J.L; Núñez, M.A (2012): "Efecto antifúngico de Capsaicina y extractos de chile piquín (*Capsicum annuum* L. var *Aviculare*) sobre el crecimiento *in vitro* de *Aspergillus flavus*." **Polibotánica**. (34):171-184.

Mosquera, O. M. E., L.M; Niño, J (2009): "Evaluación de la actividad antifúngica de extractos vegetales sobre el hongo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet." **Scientia et Technica**.15: 5.

Naidoo, N. (2007): "The essential oil from *Cymbogon validus*." [Tesis de maestría], Durban University of Technology.

Nashwa, M. A. (2011): "Control of tomato early blight disease by certain aqueous plants extracts." **Plant Pathology Journal**. 10: 187-191.

Norba, A.M (2008): "Situacion de *Solanum tuberosum* L. en los tiempos actuales" **CIENCIA UANL**. 10: 14.

Niño, J. O. C., Y.J; Correa, Y.M; Rios, A; Mosquera, O.M (2013): "Evaluación de la actividad antifúngica de especies de las familias *Asteraceae*, *Euphorbiaceae*, *Piperaceae* y *Rubiaceae* de zonas de reservas de la ecoregión cafetera colombiana". **Vitae**. 18: 137.

Niño, J. O. O., J; Correa, Y.M; Mosquera, O.M (2007): "Determinacion de la actividad antifúngica de extractos vegetales sobre el hongo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet." **Scientia et Technica**. 13: 425-426.

Ochoa, A.D (2002): "Antagonismo de cepas de *Trichoderma* spp. frente al hongo *Mycosphaerella fijiensis*." **Fitosanidad**. 7: 45.

Osorio, R.R; Jimenez,C.; Rosaura, A.M (2012): Empleo de extractos de *Swinglea glutinosa* contra el hongo *Colletotrichum gloeosporioides*. **Ciencia Uanl**. 6: 6.

Padrón, B., Oranday, A; Rivas, C; Verde, M.J (2003): "Identificación de compuestos de *Melia azedarach*, *Syzygium aromaticum* y *Cinnamomun zeylanicum* con efecto inhibitorio sobre bacterias y hongos." **Ciencia Uanl**.6: 6.

Palencia, G. E. G., R; Martín, J.E (2006): Manejo sostenible del cultivo del plátano. **Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria**. 28:16-19.

Patiño, O. J. P., J.A; Lozano, J.M; Lesmes, L; Cuca, L.E (2011): Propiedades antibacterianas in vitro de metabolitos secundarios aislados de dos especies del género *Zanthoxylum* (*Rutaceae*). **Revista Cubana de Farmacia**. 45:123-125.

Payo, A; Dominicis, M.A; Oquendo, M., Sarduy, R. (1996): "Obtención de pilocarpina a partir de *Pilocarpus racemosus* Vahl. " **Plantas Medicinales**. 5:15-19.

Payum, T. D., A.K; Shankar, R; Hazarika, M (2013): "Folk use and antioxidants potential determination of *Zanthoxylum rhetsa* DC. shoot-a highly utilized hot spice folk vegetable of Arunachal Pradesh, INDIA." **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**. 4: 4597-4602.

Peterson, A.T; Koleff, P., Soberón, H. T. , Dávila, P.; Flores-Villela, O.; Golubov, J.; Halffter, G. (2008): Patrones de diversidad espacial en grupos selectos de especies y características de algunas especies de rutáceas en dependencia del patrón temporoespacial en la capital natural de México. **Conabio**. 1: 323-364.

Pino, H.; Cedeño, L.; Carrero, Ch.; Quintero, K.; Espinoza, W. (2006): Análisis fitoquímico de hojas y raíces de especies de la familia *Rutaceae*. **Interciencia**. 28: 174-177.

Pupo, Y. G. K., D; Herrera, L; Malheiros de Mendoncac, D.I, Vargas, B (2011): "Efecto de extractos vegetales en el crecimiento y germinación de esporas de *Alternaria solani* (E. & M.) J. & G. en condiciones *in vitro*." **Revista Iberoamericana de Micología**. 28: 1.

- Pupo, Y. H., L; Vargas, B; Marrero, Y; Arévalo, R; Jiménez, C (2009): "Efecto del extracto crudo de hojas de *Tagetes erecta* L. en el control de cuatro hongos patógenos de hortalizas en condiciones "in vitro". **Centro Agrícola**. 36: 77-81.
- Quiñones, T.R; Puche, A.T; Yerena, R.S. (2004). "Realidad de la semilla de papa en algunos países del Caribe." **UCV - Scientia**. 1: 9.
- Radojković, M. M. Z., Z.P; Vidović, S.S; Kočar, D.D; Mašković, P.Z; (2012): Free radical scavenging activity and total phenolic and flavonoid contents of mulberry (*Morus* spp. L., *Moraceae*) and Neem extracts. **Scientia et Technica** 33: 547-552
- Rajesh, R. J., N; Marimuthu, P (2014). "Antifungal metabolite from *Muntingia calabura* root against early leaf blight of tomato." **Journal of Medicinal Plant Research**. 8: 646-656.
- Raziq, F. y. I., S (2010): "Integrated control of *Alternaria solani* with *Trichoderma* spp. and fungicides under *in vitro* conditions". **Sarhad Journal Agriculture** 26: 8.
- Reyes, R. G., S.; Venegas, E.A; Chavez, M.H (2010): "Identificación preliminar de los metabolitos secundarios de los extractos acuosos y etanólicos del fruto y hojas de *Morinda citrifolia* L. "noni" y cuantificación espectrofotométrica de los flavonoides totales " **UCV - Scientia**. 2: 12.
- Reyes, O.J y Acosta, F. (2010): Fitocenosis en los bosques siempreverdes de Cuba Oriental. II. Guareo guidoniae-*Zanthoxyletum martinicensis* en Sagua Baracoa, Foresta Veracruzana. **Fitosanidad**. 12: 1-6
- Riffel, A. M., L.F; Stefani, V; Santos, R.C; Bizani, D; Brandelli, A (2002): "*In vitro* antimicrobial activity of a new series of 1,4-naphthoquinones." **Brazilian Journal of Microbiology Medical**. 35: 811-818.
- Rodríguez, D. S., M.E; Rodríguez, J.L (2006): Comparación del efecto de los extractos acuosos y etanólicos de *Phyllanthus niruri* ante *Phytophthora infestans*. 83: 5.
- Rodríguez, F. y. N., F.S (2005): Control biológico del tizón temprano (*Alternaria solani*) en el cultivo de papa (*Solanum tuberosum* L.) en condiciones de campo. **Fitosanidad**. 9: 35-37.
- Rodríguez, L. E. (2009): "Teorías sobre la clasificación taxonómica de las papas cultivadas (*Solanum* L. sect. *Petota* Dumort.)." **Agronomía Colombiana** 27: 305-312.
- Sáez-Sáez, V. y. Puche, M (2003). "Uso de índices climáticos para el estudio del hongo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet en cultivos de plátanos ". **Terra**. 19: 11-33.

Salomon, A; López, R; Hernández, A (2004): Rendimiento de variedades resistentes de *Musa* spp. y *Solanum tuberosum* L. **Agronomía Costarricense** 27:45-50.

Sanabria, M. E. R., D; Rodríguez, J.D (2006): "Inhibición de hongos fitopatógenos con extractos de *Phyllanthus niruri* L. y *Lippia origanoides* (H.B.K.)." **VII Congreso SEAE Zaragoza**. 7: 5.

Sambath. K.R, S. Thangavel, S.S. Rajagopal, S. Palanavel, N. Ramalingam, G. Malaya y K.M. Upal (2006): Antimicrobial and antioxidant activities of *Careya arborea* Roxb. Stem Bark. **Iranian Journal of Pharmacology & Therapeutics**. 5: 35-41.

Santiago, L.V (2011): Estudio fitoquímico de plantas de los Andes venezolanos: *Zanthoxylum rhoifolium* LAM (Rutaceae) y *Bulnesia arborea* Cl. Gay (Zygophyllaceae).

Université Bordeaux 7:23-25.

Schabra, S.C, F.C. Ulso y E.N. Mshin (1984): Phytochemical screening of tanzanian medical plants, **J. Ethnopharmacol.** 11:157-159.

Setzer, W. N. S., J.N; Noletto, J.A; Vogler, B (2006): Leaf oil compositions and bioactivities of abaco bush medicines. **Pharmacologyonline**. 3:794-802.

Shan, B. C., Z.Y; Sun, M; Corke, H (2005): "Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents." **Journal Agriculture Food Chemichal** 53: 7749-7750.

Singh, A. K. P., M.B; Singh, U.P (2007): "Antifungal activity of an alkaloid allosecurinine against some fungi." **Mycobiology**. 35: 62-64.

Singh, S. S., R; Choudhary, S (2010): "Antifungal and HPLC analysis of the crude extracts of *Acorus calamus*, *Tinospora cordifolia*, *Eschscholtzia californica* and *Celestrus paniculatus*." **Journal of Agricultural Technology**. 6: 149-158.

Sierra, R.; Álvarez, E; López, E. (2011): Identificación de compuestos fenólicos y otros en hojas de *Salvia officinalis* **Scientia Et Technica**. 15: 230-245

Taborda, M. E. y. Cabordan, L.E (2007): Un nuevo alcaloide carbozólico de *Zanthoxylum rhoifolium*. **Scientia Et Technica**. 13: 191-192.

Tamura, Y. M., M; Yamamoto, M (2012): Application of saponin-containing plants in foods and cosmetics. **http://dx.doi.org**: 86-99.

- Torres, C. P., D.J; Taborda, M.E; Márquez, R.L (2005): **Revista Dugandia de Ciencias Básicas**. 1: 9.
- Torres, H. A., A; Vicencio, J; Pavek, J.J (2009): Tizón temprano de la papa. **Manual de las enfermedades más importantes de la papa**. Universidad Nacional Del Peru, Centro Internacional de la Papa: 10.
- Torres, H. O. S., W.; Murillo, E.; Méndez, J.I (2009): Potencial antioxidante de hojas y corteza de *Bauhinia kalbreyeri* Harms: contribución de sus flavonoides en esta actividad. **Revista Tumbaga**. 4: 43-58.
- Torres, J. R., H. A; Rodríguez, E; Arango, R (2009): Aspectos bioquímicos de la resistencia del banano (*Musa acuminata*) al ataque del hongo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. **Umbaga**. 4: 85-96.
- Toro, L.; Marquez, L.; Everaldez, A. (2010): Análisis fitoquímico y actividad antifúngica de extractos de *Swinglea glutinosa* Merr. **Revista Dugandia de Ciencias Básicas**. 5: 10-15.
- Trujillo, J. O. (2007): Determinación de la actividad antifúngica *in vitro* de extractos vegetales sobre el hongo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. **Facultad de Tecnología**. 64
- Tuberoso, C.I.G, P. Montorob, S. Piacenteb, G. Coronac, M. Deianac, M.A. Dessic, C. Pizzab.y P. Cabrasa (2009): Flavonoid characterization and antioxidant activity of hydroalcoholic extracts from *Achillea ligustica* All. **Journal Pharmaceutical Biomedical Analysis**. 50: 440-448.
- Uribe, A. R. (2013). Cromatografía en placa fina o delgada. Fundamentos. **Innovaciencia**. 6:12-15.
- Uscátegui, Y. E. (2013): Bioactividad de hidrosoles, aceites esenciales y mezclas de extractos de especies vegetales para el control de *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora infestans* y *Fusarium oxysporum* en el cultivo de papa (*Solanum tuberosum*). [Tesis de maestría]. Cundinamarca. Universidad de la Sabana .
- Van der Waals, A.I; R.M. Cozijnsen, A.J. Vossen, J.P.M.J. van den Broek y P.J.G.M de Wit (2003): " Patologías fúngicas en cultivos de interés económico." **Molecular Gene Genetic**. 264: 257-284.
- Vasudeva, N y Sharma, T (2012): Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of *Citrus limettioides* Tanaka. **Journal of Pharmaceutical Technology & Drug Research**. 1: 1-7.

Vásquez, S. E. E.-S., m.a; Morales, D; Noé, C; Rodríguez-Herrera, R (2014): "Synergistic effects of ethanolic plant extract mixtures against food-borne pathogen bacteria." **African Journal of Biotechnolog.** 13: 6.

Veitía, N. B.-C., I; García, L.R; Acosta-Suárez, M; Alvarado-Capó, Y; Torres, D (2007): "Influencia del aislado en la fitotoxicidad del filtrado del cultivo de *Alternaria solani* Sor. sobre plantas de papa var. 'Desirée'." **Biotecnología Vegetal.** 7: 199-203.

Veitía, N. P., J.N; Bermúdez-Caraballoso, I; García, L; Acosta-Suárez, M (2006): "Rendimiento agrícola de líneas de papa plantadas fuera de época de siembra en una zona montañosa." **Biotecnología Vegetal.** 6: 41-43.

Verma, R. K. C., L; Kumar, M (2011): "Antifungal activity of essential oils against selected building fungi." **Indian Journal of Natural Products and Resources.** 2: 448-451.

Vicente, L. P. (2009): "Enfermedades de banano y plátano: Análisis retrospectivo y perspectivas." **Producción Agropecuaria.** 2: 11-18.

Viuda-Martos, M, Y. Ruiz-Navajas, J. Fernández-López y J. Pérez-Álvarez (2008): Antifungal activity of lemon (*Citrus lemon* L.), mandarin (*Citrus reticulata* L.), grapefruit (*Citrus paradisi* L.) and orange (*Citrus sinensis* L.) essential oils. **Food Control** 19:1130-1138.

Wilson, C.L, J.M. Solar, A. El Ghaouth, y M.E. Wisniewski (1997): Rapid evaluation of plant extracts and essential oils for antifungal activity against *Botrytis cinerea*. **Plant Disease** 81: 204-210.

Yanar, Y. G., A; Kadioglu, I; Çam, H; Whalon, M (2011): "*In vitro* antifungal evaluation of various plant extracts against early blight disease (*Alternaria solani*) of potato." **African Journal of Biotechnology.** 10: 8291-8295.

Yang, R. L., S; Kuo, G (2008): Content and distribution of flavonoids among 91 edible plant species. **Plant Disease.** 94: 5

Zambrano, C. A., Blanco, M.L; Sanchez, S.C (2009): "Evaluación a nivel de laboratorio del efecto de 7 extractos vegetales para el control de *Colletotrichum* sp agente causal de la antracnosis en el cultivo de tomate de árbol." **Innovaciencia:** 6: 12-17.

Zamora, N. 2006: Flora digital de la selva. **Organización para Estudios Tropicales.**

Zohuar, M. D., O; Lhotsky, D; Pavela, R (2009): "Effect of plant essential oils on mortality of the stem nematode (*Ditylenchus dipsaci*)." **Plant Protect Science.** 45: 66-73.

Anexos

Anexo 1. Compuestos químicos y R_f identificados en extractos de hojas de *Zanthoxylum nannophyllum* (ZN); *Zanthoxylum pseudodumosum* (ZP); *Zanthoxylum flavum* (ZF); *Amyris balsamifera* (AB) y *Swinglea glutinosa* (SG); en etanol 70% (-et), metanol 70% (-met) y agua (-a) con actividad antifúngica frente a *Mycosphaerella fijiensis* y *Alternaria solani*.

Extracto	Fase móvil	R_f	Compuestos identificados	Actividad antifúngica	
				<i>M. fijiensis</i>	<i>A. solani</i>
ZP-et	BAA	0,07-0,42		+	-
SG-et		0,07-0,42		+	-
		0,71-0,82		+	-
		0,28-0,57	Flavonoles 3 glicosilados y flavonas	+	-
ZF-et		0,71-0,82	Saponina	-	+
		0,06-0,13		-	+
		0,2-0,23		-	+
		0,36-0,4		-	+
		0,66-0,73		+	-
AB-et		0,06-0,13		-	+
		0,54-0,57		+	-
		0,82-0,89	Flavonoles 3 glicosilados y flavonas	+	-
		0,07-0,42		+	+
ZN-met		0,43-0,53		-	+
		0,56-0,66		-	+
		0,72-0,82	Saponina	+	+
ZP-met		0,07-0,46		+	-
		0,71-0,82		+	-
		0,76-0,8		-	+
		0,83-0,86		-	+
SG-met		0,07-0,5		+	-
		0,28-0,82	Flavonoles 3 glicosilados y flavonas	+	-
		0,72-0,82	Saponina	-	+
ZF-met		0,06-0,13		-	+
		0,07-0,42		+	-
		0,71-0,82	Saponina	+	-
SG-met		0,28-0,82	Flavonoles 3 glicosilados y flavonas	-	+
		0,06-0,13		-	+
		0,07-0,57		+	-
AB-met		0,71-0,82	Saponina	+	+
		0,13-0,2		-	+
		0,07-0,5		+	+
ZN-a		0,71-0,82		+	-
		0,86-0,9		-	+
		0,07-0,5		+	+
ZF-a		0,07-0,5		+	+

Extracto	Fase móvil	R_f	Compuestos identificados	Actividad antifúngica	
				<i>M. fijiensis</i>	<i>A. solani</i>
		0,53-0,6		-	+
		0,86-0,93		-	+
SG-a		0,26-0,4		-	+
SG-a		0,53-0,6		-	+
		0,9-1		-	+
AB-a		0,07-0,53		+	+
		0,67-0,78	Saponina	+	+
ZN-et	PAA	0,06-0,18	Antraquinona	+	+
		0,62-0,68		-	+
		0,87-0,93	Antraquinona	+	-
ZP-et		0,06-0,09	Antraquinona	+	+
		0,18-0,25		-	+
		0,75-0,78		-	+
		0,90-0,93	Antraquinona	+	-
SG-et		0,81-0,93	Antraquinona	+	-
		0,12-0,25		-	+
		0,31-0,37		-	+
		0,5-0,56		-	+
		0,59-0,68		-	+
ZF-et		0,62	Antraquinona	-	+
		0,15-0,18		-	+
		0,25-0,37		-	+
		0,46-0,56		-	+
		0,93	Antraquinona	+	-
		0,84-0,87		+	-
AB-et		0,68	Antraquinona	+	+
		0,87-0,93	Antraquinona	-	+
		0,21-0,43		-	+
		0,5-0,62		-	+
ZN-met		0,06-0,18	Antraquinona	+	+
		0,93	Antraquinona	-	+
		0,5-0,62		-	+
		0,68-0,81		-	+
ZP-met		0,06-0,18	Antraquinona	+	+
		0,31-0,37		-	+
		0,68-0,75		-	+
SG-met		0,65	Antraquinona	+	+
		0,78-0,93	Flavonoles 3 glicosilados y flavonas	-	+
		0,15-0,18		-	+
		0,31-0,34		-	+
ZF-met		0,62	Antraquinona	-	+
		0,84-0,93	Flavonoides 3,5 metoxilados y cumarinas	+	+
		0,34-0,37		-	+

Extracto	Fase móvil	R_f	Compuestos identificados	Actividad antifúngica	
				<i>M. fijiensis</i>	<i>A. solani</i>
		0,43-0,46		-	+
AB-met		0,93	Antraquinona	-	+
		0,18-0,25		-	+
ZN-a		0,25-0,37		-	+
		0,5-0,81		-	+
SG-a		0,78-0,87	Antraquinona	+	+
SG-a		0,06-0,18		-	+
ZF-a		0,25	Antraquinona	+	+
		0,56-0,62		-	+
		0,68-0,75		-	+
		0,87-0,93		-	+
AB-a		0,93	Antraquinona	-	+
		0,12-0,18		-	+
		0,25-0,31		-	+
		0,43-0,5		-	+
		0,62-0,65		-	+
ZN-et	AMA	0,07	Antraquinona	+	-
		0,88-1	Antraquinona	-	+
		0,13-0,15		-	+
ZP-et		0,06-0,13		-	+
		0,4-0,46		-	+
		0,6-0,73		-	+
		0,7-0,8		-	+
SG-et		0,8-0,86	Antraquinona	+	+
		0,06-0,1		-	+
		0,43-0,46		-	+
		0,76-0,8	Antraquinona	+	-
ZF-et		0,73-0,76	Flavonoles 3 glicosilados y flavonas	+	+
		0,73-0,8		+	-
		0,06-0,26		-	+
		0,36-0,4		-	+
		0,46-0,5		-	+
AB-et		0,76-0,8	Flavonoides 3,5 metoxilados y cumarinas	-	+
		0,2-0,26		-	+
		0,33-0,46		-	+
ZN-met		0,8-0,86	Antraquinona	-	+
		0,2-0,26		-	+
		0,43-0,56		-	+
		0,6-0,66		-	+
ZP-met		0,8-0,86	Antraquinona	+	-
		0,13-0,18		-	+
		0,33-0,4		-	+
SG-met		0,15-0,18		-	+

Extracto	Fase móvil	R_f	Compuestos identificados	Actividad antifúngica	
				<i>M. fijiensis</i>	<i>A. solani</i>
ZF-met		0,36-0,4	Flavonoides 3,5 metoxilados y cumarinas	-	+
		0,56-0,6		-	+
		0,8-0,86		+	-
AB-met		0,33-0,36		-	+
		0,76-0,8		+	-
ZN-a		0,06-0,1		-	+
		0,18-0,23		-	+
		0,33-0,36		-	+
		0,53-0,56		-	+
		0,46-0,53		+	+
		0,1-0,15	-	+	
SG-a		0,6-0,66	Antraquinona	-	+
		0,7-0,73		-	+
ZF-a		0,8-0,86		-	+
		0,1-0,15		-	+
AB-a		0,13-0,26	-	+	
		0,53-0,73	-	+	
		0,8-0,83	Flavonoides 3,5 metoxilados y cumarinas	+	+
		0,18-0,26	-	+	
	0,3-0,36	-	+		