

Universidad Central "Marta Abreu" de las Villas
Facultad de Ciencias Agropecuarias
Departamento de Agronomía



Tesis para aspirar al título de Ingeniero Agrónomo

Efecto alelopático del extracto acuoso de Anamú (*Petiveria alliacea*
L.) sobre *Rhizoctonia solani* Kühn y *Sclerotium rolfsii* Sacc

Diplomante: Claudia Aracelis Méndez Martínez

Tutor: Dr. C. Ray Espinosa Ruíz

Santa Clara, 2016

“La agricultura es igual que la guerra, para ganar la batalla hay que conocer el terreno”

Fidel Castro Ruz

Dedicatoria

A mi abuela Elia porque me enseñó a ser niña, adolescente, joven y una mujer muy preparada para la vida; por haberme educado en esos valores con los cuales me siento tan orgullosa, por sus sabios consejos y por tenerla a mi lado.

A mis padres Maday y Rafael por darme la vida, por haberme proporcionado siempre los mayores apoyos emocionales y materiales, por su sacrificio, por colaborar en mi desarrollo profesional.

A mi hermana Laura por darme todo su cariño y apoyo, y por defenderme mucho.

A mi novio Idelvís por demostrarme cuanto me ama, cuanto me necesita, porque llegó a mi vida cuando menos lo esperaba y me ha hecho la mujer más feliz, gracias porque siempre me está apoyando en todo lo que hago, para mí es un honor compartir mis éxitos con él y siempre está ahí cuando lo necesito.

Agradecimientos

Son muchas las personas que me han acompañado en esta difícil y linda aventura que comenzó hace algunos años. Gracias a ellas, en parte, soy lo que soy. Ahora ha llegado el momento de cerrar un capítulo, de pasar página, y no puedo hacerlo sin antes agradecerles a:

- *Mis padres por la vida, mi hermana la alegría, mi abuela la constancia y mi novio el amor.*
- *Todos mis familiares tíos, tías y primos especialmente a mi tía Marilín y a Papillo que de una u otra forma contribuyeron a la realización del presente trabajo y me han preparado para la vida.*
- *Chan por llevarme tantas veces al tren y ser como mi segundo papá y a Yoan por colaborar durante el desarrollo de esta tesis y arreglarme mucho la computadora.*
- *Mi suegra, a mi suegro, a mi cuñada y a mi concuño por apoyarme durante este tiempo.*
- *Miguelo por sus sabios consejos*
- *Mi tutor Dr C. Ray Espinosa Ruíz por su dedicación, paciencia y sobre todo por su tiempo dedicado a mi tesis.*
- *Dr C. Manuel Díaz Castellanos (yia) por tener en cuenta cada detalle de mi trabajo, brindarme su incondicional apoyo y sus conocimientos.*

- *Los especialistas Msc. Annarella Chea Gonzalez, Ing. René Cupull y al Lic. Ángel Mollineda, por su tiempo dedicado en la realización de los experimentos.*
- *Deivi trabajador del IBP por ayudarme en la esterilización de la cristalería para llevar a cabo mi ensayo biológico.*
- *Profesor Héctor Pablo por brindarme las bandejas cuando las necesité.*
- *Profesor Enmanuel Delgado Portal por brindarme las semillas de frijol.*
- *Yagner Delgado y Julio Pérez por ayudarme a traer la tierra desde las Antillas hasta la FCA.*
- *La técnica de laboratorio Anisley Blanco por su ayuda en el laboratorio de Fisiología Vegetal.*
- *Jorge González Preval por ofrecerse gentilmente a resolver cuantos problemas o dudas me surgieron en este tiempo.*
- *Yunita Sarduy y Daímary Fernández por estar a mi lado durante todo el desarrollo de mi trabajo de diploma.*
- *Todos mis compañeros y amigos que he tenido durante estos años en la universidad, por seguir regalándome su amistad.*

Resumen

Rhizoctonia solani Kühn. y *Sclerotium rolfsii* Sacc. se destacan entre las especies de hongos fitopatógenos del suelo más importantes en Cuba. Se han reportado pérdidas entre 25 y 50 % por la acción de dichos hongos en el frijol común. Se determinó el efecto alelopático del extracto acuoso de *P. alliaceae* a diferentes altitudes (5, 100 y 450 msnm) y procesos de secado (sol y sombra) y extracción (maceración en agitación (MA) 24 h y maceración en reposo (MR) (24, 48 y 72 h)) sobre el crecimiento micelial de estos hongos. Se realizó el tamizaje fitoquímico al extracto acuoso del anamú, se cuantificó el metabolito de mayor concentración y su relación con la altitud de las plantas, finalmente se evaluó *in vitro* el efecto alelopático del extracto acuoso del anamú y en condiciones semicontroladas con tratamientos de inmersión y peletización de la semilla sobre los hongos. El secado a la sombra fue superior al del sol en cuanto a los TDS; no existieron diferencias estadísticas entre MR 48 y 72 h, y la MA 24 h, los metabolitos presentes: saponinas, carbohidratos reductores, taninos, alcaloide y fenoles, este fue menor en las plantas secadas al sol a 450 msnm. En condiciones *in vitro* el extracto de plantas a 5 msnm presentó mayor toxicidad y a 450 msnm no presentó efecto alguno. El tratamiento de peletización con polvo presentó los resultados más favorables, el extracto de plantas secadas al sol a 5 msnm provocó el menor ISE. La inmersión provocó las mayores afectaciones al tallo y la raíz.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	4
2.1. ALELOPATÍA	4
2.3. NATURALEZA QUÍMICA DE LOS AGENTES ALELOPÁTICOS	6
2.4. MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS AGENTES ALELOPÁTICOS	8
2.5. FACTORES QUE INFLUYEN EN LOS EFECTOS ALELOPÁTICOS	9
2.6. ALELOPATÍA SOBRE HONGOS FITOPATÓGENOS DEL SUELO	10
2.7. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA DEL ANAMÚ (<i>PETIVERIA ALLIACEAE L.</i>)	12
2.8. GENERALIDADES DEL FRIJOL COMÚN (<i>PHASEOLUS VULGARIS L.</i>)	13
2.9. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE <i>SCLEROTIUM ROLFSII SACC.</i>	13
2.10. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE <i>RHIZOCTONIA SOLANI KÜHN.</i>	15
3. MATERIALES Y MÉTODOS	18
3.1. INFLUENCIA DE LA ALTITUD DE CRECIMIENTO DE LAS PLANTAS, TIPO DE SECADO Y FORMA DE EXTRACCIÓN EN FUNCIÓN DEL TDS	18
3.2. EFECTO ALELOPÁTICO DE <i>P. ALLIACEAE</i> SOBRE <i>R. SOLANI</i> Y <i>S. ROLFSII</i> BAJO CONDICIONES CONTROLADAS	20
3.3. TAMIZAJE FITOQUÍMICO Y CUANTIFICACIÓN DE METABOLITOS MAYORITARIOS	22
3.3.1. CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN EL EXTRACTO ACUOSO DE <i>P. ALLIACEAE</i>	23
3.4. EFECTO ALELOPÁTICO DEL EXTRACTO ACUOSO DE <i>P. ALLIACEAE</i> SOBRE EL DESARROLLO DE LA ENFERMEDAD PRODUCIDA POR <i>R. SOLANI</i> Y <i>S. ROLFSII</i> EN CONDICIONES SEMICONTROLADAS	25
3.4.1. EFECTO DEL TRATAMIENTO A LA SEMILLA POR INMERSIÓN EN EL EXTRACTO ACUOSO DE <i>P. ALLIACEAE</i> SOBRE <i>R. SOLANI</i> Y <i>S. ROLFSII</i> EN CONDICIONES SEMICONTROLADAS	26
3.4.2. EFECTO DEL TRATAMIENTO POR PELETIZACIÓN DE LA SEMILLA CON EL EXTRACTO ACUOSO DE <i>P. ALLIACEAE</i> SOBRE <i>R. SOLANI</i> Y <i>S. ROLFSII</i> EN CONDICIONES SEMICONTROLADAS	27
3.4.3. EFECTO DEL TRATAMIENTO POR PELETIZACIÓN DE LA SEMILLA CON EL MATERIAL PULVERULENTO DE <i>P. ALLIACEAE</i> SOBRE <i>R. SOLANI</i> Y <i>S. ROLFSII</i> EN CONDICIONES SEMICONTROLADAS	27

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
4.1. INFLUENCIA DE LA ALTITUD DE CRECIMIENTO DE LAS PLANTAS, TIPO DE SECADO Y FORMA DE EXTRACCIÓN EN FUNCIÓN DEL TDS	31
TIPO DE SECADO: LAS CANTIDADES DE SÓLIDOS DISUELTOS FUERON MAYORES EN EL MÉTODO DE SECADO A LA SOMBRA CON RESPECTO AL SECADO AL SOL (FIGURA 1).	31
4.2. EFECTO ALEOPÁTICO DE <i>P. ALLIACEAE</i> SOBRE <i>R. SOLANI</i> Y <i>S. ROLFSII</i> BAJO CONDICIONES CONTROLADAS	33
4.3. TAMIZAJE FITOQUÍMICO Y CUANTIFICACIÓN DE METABOLITOS MAYORITARIOS	35
4.3.1. CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN EL EXTRACTO ACUOSO DE <i>P. ALLIACEAE</i> .	37
FIGURA 3. CURVA DE CALIBRACIÓN PARA LA CUANTIFICACIÓN DE FENOLES TOTALES	37
4.4. EFECTO ALEOPÁTICO DEL EXTRACTO ACUOSO DE <i>P. ALLIACEAE</i> SOBRE EL DESARROLLO DE LA ENFERMEDAD PRODUCIDA POR <i>R. SOLANI</i> Y <i>S. ROLFSII</i> EN CONDICIONES SEMICONTROLADAS	40
4.4.1. EFECTO DEL TRATAMIENTO A LA SEMILLA POR INMERSIÓN EN EL EXTRACTO ACUOSO DE <i>P. ALLIACEAE</i> SOBRE <i>R. SOLANI</i> Y <i>S. ROLFSII</i> EN CONDICIONES SEMICONTROLADAS	40
4.4.2. EFECTO DEL TRATAMIENTO POR PELETIZACIÓN DE LA SEMILLA CON EL EXTRACTO ACUOSO DE <i>P. ALLIACEAE</i> SOBRE <i>R. SOLANI</i> Y <i>S. ROLFSII</i> EN CONDICIONES SEMICONTROLADAS	42
4.4.3. EFECTO DEL TRATAMIENTO POR PELETIZACIÓN DE LA SEMILLA CON EL MATERIAL PULVERULENTO DE <i>P. ALLIACEAE</i> SOBRE <i>R. SOLANI</i> Y <i>S. ROLFSII</i> EN CONDICIONES SEMICONTROLADAS	43
5. CONCLUSIONES	46
6. RECOMENDACIONES	47
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48
8. ANEXOS	58

1. Introducción

En la actualidad los problemas ambientales se han convertido en el eje central de muchas ramas de la ciencia, incluida la agricultura. La búsqueda de alternativas ecológicas que puedan combinar eficiencia y seguridad para garantizar el desarrollo agrario, constituye una necesaria prioridad para los productores.

La alelopatía es un fenómeno biológico por el cual una planta produce uno o más compuestos químicos que influyen en el crecimiento, supervivencia o reproducción de otros organismos. Estos compuestos pueden conllevar a efectos benéficos (alelopatía positiva) o a efectos perjudiciales (alelopatía negativa).

En la naturaleza existe un número significativo de plantas que producen gran diversidad de agentes alelopáticos con cierto tipo de resistencia ante patógenos y plagas, desde el punto de vista biológico se han logrado resultados promisorios con alcaloides, terpenoides, carbohidratos reductores, taninos, saponinas, cumarinas y aceites esenciales (Pino *et al.*, 2013), el cual dice que se pueden desarrollar productos novedosos utilizando metabolitos secundarios en mezclas con otros productos fitosanitarios y como inductores de resistencia. El uso de extractos vegetales conocidos y la identificación de candidatos locales para el desarrollo de nuevos productos, ofrecen alternativas que pueden combinar eficiencia y seguridad en el manejo de plagas en la agricultura cubana. Algunos productos naturales derivados de las plantas han sido ampliamente estudiados por su capacidad para inhibir el crecimiento micelial de hongos fitopatógenos (Castillo *et al.*, 2015). Uno de los problemas críticos desde el punto de vista sanitario, presente a nivel mundial y en Cuba, es el control de hongos fitopatógenos del suelo que atacan a las plantas cultivadas (Borras, Pérez *et al.*, 1997) entre los que se encuentran *R. solani* y *S. rolfsii*, altamente destructivos en plantas de interés económico, pertenecientes principalmente a las familias *Fabaceae* y *Solanaceae* (Herrera, 2004), considerados una de las principales causas del damping-off y de las pudriciones de raíces e hipocotilos en frijol común (Díaz, 2011). En Cuba, se han desarrollado numerosos estudios sobre la bioecología y el control de *R. solani* y *S. rolfsii* (Herrera, 2004; Díaz,

2011; Nerey, 2009); sin embargo, las enfermedades producidas por éstos, continúan siendo una causa importante de los bajos rendimientos en el frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) (Díaz, 2011). Por la relevancia y alternativas de este cultivo es muy importante hacer énfasis en la relación de los factores ambientales, donde Benacchio *et al.* (2012) plantean que esta relación planta-ambiente puede favorecer el desarrollo de ciertas enfermedades fúngicas que atacan el cultivo, afectando su rendimiento.

Numerosos son los estudios que se han realizado sobre la flora cubana dada su gran diversidad. Muchas de esas plantas son utilizadas de forma empírica por los productores cubanos como repelentes o fungicidas (curativos o preventivos), mediante el uso de extractos preparados de forma artesanal o la aplicación directa del residuo vegetal al suelo. Entre las familias botánicas involucradas más importantes se encuentran: *Meliaceae*, *Asteraceae*, *Fabaceae*, *Solanaceae*, *Piperaceae*, *Lamiaceae*, *Apiaceae* y *Myrtaceae*, (Pino, 2013).

En tal caso se encuentra el anamú que, estudios preliminares sugieren la presencia de compuestos químicos en la parte aérea de la planta capaces de controlar el crecimiento de hongos fitopatógenos del suelo tales como, *R. solani* y *S. rolfsii* (Jímenez, 2004; Robaina, 2004; Puente, 2007).

González (1988) refirió que la influencia de estos compuestos químicos va a estar determinada por las características de los microclimas existentes en cada región. El estrés producido por diferentes factores en cada zona geográfica, puede provocar la activación de rutas metabólicas secundarias que están encaminadas a dar respuesta ante estas situaciones ambientales, causa por la cual pueden producirse o no ciertas sustancias en la planta. Además, bajo estas condiciones los metabolitos producidos pueden ser o no tóxicos a diferentes microorganismos (Sampietro, 2003).

Hasta el momento se desconoce el efecto alelopático del extracto acuoso de anamú obtenido a partir de plantas que han desarrollado a diferentes altitudes y sometidas a diferentes tipos de secado y extracción sobre *R. solani* y *S. rolfsii*.

Hipótesis

La influencia de la zona geográfica de crecimiento, tipo de secado y forma de obtención del extracto acuoso de *Petiveria alliaceae*, puede provocar variaciones en el contenido de los metabolitos secundarios presentes en sus hojas, tallos e inflorescencias, y por tanto en el efecto alelopático sobre *R. solani* y *S. rolfsii*

Objetivo general

Determinar el efecto alelopático del extracto acuoso de *Petiveria alliaceae* obtenido a partir de plantas desarrolladas a diferentes altitudes y sometidas a diferentes procesos de secado y extracción sobre el crecimiento micelial de *R. solani* y *S. rolfsii*

Objetivos específicos:

1. Determinar la influencia de la altitud de crecimiento de las plantas, tipo de secado y forma de extracción en función del TDS.
2. Evaluar, en condiciones *in vitro*, el efecto alelopático de los extractos de mayor contenido de TDS en función de su zona geográfica de crecimiento y tipo de secado sobre *R. solani* y *S. rolfsii*.
3. Determinar los grupos químicos de los metabolitos presentes en el extracto acuoso y cuantificar los mayoritarios.
4. Evaluar en condiciones semicontroladas el efecto alelopático del extracto acuoso de *P. alliaceae* sobre el desarrollo de la enfermedad producida por *R. solani* y *S. rolfsii*.

2. Revisión bibliográfica

2.1. Alelopatía

Desde el punto de vista etimológico el término Alelopatía, significa perjuicio mutuo, término compuesto por dos palabras, “*allelon*” (“de uno a otro”) y “*pathos*” (“sufrir”) fue utilizado por primera vez en 1937 por Hans Molish. La definición más tradicional del fenómeno de alelopatía se describe como “cualquier efecto directo o indirecto causado por una planta (incluyendo microorganismos) sobre otras a través de la producción de compuestos químicos que escapan al medio ambiente”.

Con el espíritu de englobar muchas otras interacciones, una definición más amplia, es la desarrollada por la Sociedad Internacional de Alelopatía en 1996 definiéndola como: “cualquier proceso que involucre metabolitos secundarios producidos por plantas, algas, bacterias y hongos, que influyan en el crecimiento y desarrollo de sistemas biológicos y agrícolas”. De este modo, el término de alelopatía se refiere al conjunto de interacciones entre especies de plantas que, en un balance general, se traduce en un efecto perjudicial a una de ellas para aumentar la prevalencia de la especie donadora de estos metabolitos (Oliveros *et al.*, 2009).

El potencial de productos naturales que pueden ser usados por sus propiedades biológicas particulares como herbicidas, plaguicidas, antibióticos, inhibidores o estimulantes de crecimiento, etc., es prácticamente inagotable, estos tiene múltiples efectos como se señaló en la definición, efectos que van desde la inhibición o estimulación de los procesos de crecimiento de las plantas vecinas, hasta la inhibición de la germinación de semillas, o bien evitan la acción de insectos y animales comedores de hojas, así como los efectos dañinos de bacterias, hongos y virus, los cuales conforman una parte muy importante de los sistemas de defensa de las plantas con la ventaja de ser biodegradables (Nelson, 2004).

2.2. Efectos y Sistemas alelopáticos en la Agricultura

Los aleloquímicos en los ecosistemas y agroecosistemas alteran el crecimiento normal de las plantas, acelerándolos o inhibiéndolos, incluyendo la germinación y el crecimiento de las plántulas.

Los residuos de plantas incorporados al suelo, ya sean dejados en la superficie o enterrados con la preparación mecánica del suelo, tienen más influencia que los efectos alelopáticos de las plantas vivas, sobre plantas cultivadas. No solamente las plantas arvenses sino también numerosas especies de plantas cultivadas tienen efectos alelopáticos (Arévalo, 2011).

Los cultivos de coberturas que se utilizan en agricultura sostenible para manejar malezas están basados, principalmente, en la alelopatía.

Para que se produzca un efecto alelopático, tanto de carácter positivo como negativo, de acción directa o indirecta, de una especie sobre otra a través de la producción de compuestos químicos que se escapan al medio ambiente, se requiere que la concentración de estas sustancias sean las suficientes para ejercer su acción. Además, la ocurrencia de todo efecto alelopático debe cumplir tres condiciones fundamentales:

1. Que exista suficiente cantidad del compuesto alelopático.
2. El aleloquímico debe estar en contacto directo e interactuar de alguna forma con una especie susceptible a éste.
3. La sustancia activa debe permanecer en contacto con el microorganismo susceptible por el tiempo necesario para ejercer su acción.

El conjunto de sustancias liberadas por la planta donadora es generalmente una mezcla de compuestos osmóticamente activos como azúcares, sales, aminoácidos, proteínas, polímeros, taninos y ligninas, los cuales son almacenados en estructuras vacuolares dentro del citoplasma (Narwal, 1996).

2.3. Naturaleza química de los agentes alelopáticos

Las células vegetales son capaces de producir millones de moléculas diferentes, divididas en grupos según su función (Stryer, 2004; Lehninger, 2005; Voet, 2005).

1. Metabolitos Primarios: Son todas aquellas moléculas implicadas en la estructura y función de la célula, entre ellas están los glúcidos, lípidos, aminoácidos y ácidos nucleicos.
2. Metabolitos Secundarios: Son compuestos derivados de rutas secundarias más complejas del metabolismo celular. Se sintetizan a partir de moléculas intermediarias o “bisagras” como el acetato y mevalonato.

Gracias al avance científico- técnico en las ciencias químicas y farmacéuticas se han podido descubrir y dilucidar compuestos que, según ensayos biológicos, poseen efectos de interés.

Los compuestos alelopáticos alteran una gran cantidad de procesos fisiológicos, como: división y diferenciación celular, traslado de iones y agua, metabolismo de fitohormonas, respiración, fotosíntesis, funciones de enzimas, traducción de expresión de genes. Ellos pueden ser liberados al ambiente a través de la volatilización, lixiviación, exudación radicular y descomposición de residuos de plantas incorporados al suelo.

Entre los grupos químicos de mayor relevancia por sus propiedades alelopáticas, se encuentran: fenoles y derivados del ácido benzoico, flavonoides y taninos, alcaloides, terpenoides y esteroides, glucósidos cianogenéticos, aminoácidos no proteicos, lactonas no saturadas, ácidos orgánicos, alcoholes alifáticos, aldehídos y cetonas, ácidos grasos y el complejos de quinonas (Arévalo, 2011).

Mandal *et al.* (2010), refiere que los fenoles, así como los flavonoides, antocianinas y taninos, cumplen importantes funciones en las plantas, entre las que se encuentran formar parte de los mecanismos de defensa contra organismos patógenos, mediante la síntesis de fitoalexinas, además, Nelson, (2010) señala que los alcaloides proveen en forma directa fuentes de carbono y nitrógeno rápidamente asequibles para el

crecimiento de los hongos del suelo, y que luego de mineralizados, sirven como nutrientes para aprovechamiento de los mismos vegetales.

Se llama metabolitos secundarios de las plantas a los compuestos químicos sintetizados por las plantas que cumplen funciones no esenciales en ellas, de forma que su ausencia no es fatal para la planta, ya que no intervienen en el metabolismo primario de las plantas. Los metabolitos secundarios de las plantas intervienen en las interacciones ecológicas entre la planta y su ambiente. También se diferencian de los metabolitos primarios en que cada uno de ellos tiene una distribución restringida en el Reino de las plantas, a veces a sólo una especie o un grupo de ellas, por lo que muchos de ellos son útiles en Botánica Sistemática.

En estudios biológicos más recientes se determinó que la mayoría de los metabolitos secundarios cumplen funciones de defensa contra predadores y patógenos, actúan como agentes alelopáticos (que son liberados para ejercer efectos sobre otras plantas), o para atraer a los polinizadores o a los dispersores de las semillas. El reconocimiento de propiedades biológicas de muchos metabolitos secundarios ha alentado el desarrollo de este campo, por ejemplo en la búsqueda de nuevas drogas, antibióticos, insecticidas y herbicidas. Además, la creciente apreciación de los altamente diversos efectos biológicos de los metabolitos secundarios ha llevado a reevaluar los diferentes roles que poseen en las plantas, especialmente en el contexto de las interacciones ecológicas.

Los metabolitos secundarios de las plantas pueden ser divididos en 3 grandes grupos, en base a sus orígenes biosintéticos:

1. Terpenoides. Todos los terpenoides, tanto los que participan del metabolismo primario como los más de 25.000 metabolitos secundarios, son derivados del compuesto IPP (Isopentenildifosfato o "5-carbono isopentenildifosfato") que se forman en la vía del ácido mevalónico. Es un grupo grande de metabolitos con actividad biológica importante. Están distribuidos ampliamente en las plantas y muchos de ellos tienen funciones fisiológicas primarias. Unos pocos, como los que forman los aceites esenciales, están restringidos a solo algunas plantas.

2. Compuestos fenólicos y sus derivados. Los más de 8.000 compuestos fenólicos que se conocen están formados o por la vía del ácido shikímico o por la vía del malonato/acetato.

3. Compuestos nitrogenados o alcaloides. Los alrededor de 12.000 alcaloides que se conocen, que contienen uno o más átomos de nitrógeno, son biosintetizados principalmente a partir de aminoácidos. Los alcaloides poseen una gran diversidad de estructuras químicas.

Los metabolitos secundarios de las plantas también se pueden dividir en más categorías menos abarcativas, clasificados según su vía biosintética y estructura química, además de los terpenoides y los alcaloides encontramos: Betalainas, Glucosinolatos, Glucósidos cianogenéticos, Poliacetilenos, Antocianinas y otros Flavonoides.

2.4. Mecanismo de acción de los agentes alelopáticos

Los aleloquímicos, tienen dos formas fundamentales de acción (Blum y Kogan, 1992):

Acción indirecta: Alteraciones de las propiedades del suelo y su efecto nutricional para las poblaciones de plantas adyacentes y sobre la actividad de microorganismos beneficiosos o patógenos.

Acción directa: Efecto del aleloquímico en el crecimiento y el metabolismo del organismo diana. Por ejemplo, en la estructura celular, balance de reguladores del crecimiento, permeabilidad de la membrana, germinación, fotosíntesis, actividad enzimática y otros.

- Efecto sobre la actividad enzimática

La mayoría de los compuestos alelopáticos presentan la capacidad de modificar la síntesis o actividad de enzimas tanto *in vitro* como *in vivo*. Por ejemplo, plántulas de maíz tratadas con ácido felúrico mostraron un incremento en los niveles de enzimas oxidativas (peroxidasas, catalasas y ácido indolacético oxidasa) junto con una

elevación de enzimas de la ruta del ácido shikímico tales como fenilalanina-amonioliasa y cinamilalcohol-deshidrogenasa involucradas en la síntesis de compuestos fenilpropanoides. También al ácido felúrico se le atribuye la inhibición de enzimas hidrolíticas tales como la amilasa, maltasa, invertasa, proteasa y fosfatasa ácida presente en la movilización del material alimenticio (Sampietro, 2003).

- Efecto sobre la permeabilidad de la membrana

Los compuestos fenólicos aumentan la permeabilidad de las membranas a los iones, particularmente a los de potasio. Los ácidos fenólicos provocan pérdidas considerables de este mineral en los tejidos de las raíces de las plantas (Sampietro, 2003).

Efecto sobre la respiración

Algunos compuestos químicos reducen la respiración radicular, flavonoides tales como la quercetina, naringenina y umbeliferona inhiben la producción de ATP en la mitocondria (Madhu *et al.*, 2011).

Los compuestos fenólicos, en especial los tánicos, pueden combinarse con componentes de la cadena respiratoria. Estos reaccionan con las ferro-proteínas por sitios donde ocurre el bombeo de los H⁺ al espacio intermembranal, además influyen fuertemente en la eficiencia de la actividad de la ATPasa; esta enzima es la encargada durante el proceso respiratorio de sintetizar el ATP a partir del ADP y P_i, bajo la acción de ciertos taninos este proceso respiratorio se ve interrumpido, las mitocondrias dejan de funcionar correctamente y por tanto la célula muere (Stryer 2004; Lehninger 2005).

2.5. Factores que influyen en los efectos alelopáticos

El efecto alelopático se puede ver afectado por varios factores, entre estos, las condiciones de recolección de plantas son de gran importancia para el desarrollo de las investigaciones. Por tal razón es necesario tener en cuenta el momento y lugar donde se realiza la toma de muestras, pues, en función de esto la composición química de las plantas, en algunos casos, puede variar. El estrés producido por

diferentes factores en cada zona geográfica, puede provocar la activación de rutas metabólicas secundarias que están encaminadas a dar respuesta ante estas situaciones ambientales, causa por la cual pueden producirse o no ciertas sustancias en la planta. Además, bajo estas condiciones los metabolitos producidos pueden ser tóxicos o no, a diferentes microorganismos (Narwal, 1996; Sampietro, 2003; Finar y Jergo, 2006).

El secado de las plantas es otro aspecto a tener en cuenta en los estudios alelopáticos. La temperatura a la cual se someten las plantas para extraerle el agua y lograr su deshidratación es capaz de provocar pérdidas totales o parciales de metabolitos. Muchos de estos compuestos comienzan a experimentar pérdida de radicales, cadenas laterales y componentes de su estructura cuando se incrementa la temperatura por encima de 30 °C (Stryer, 2004; Lehninger, 2005).

2.6. Alelopatía sobre hongos fitopatógenos del suelo

En el reino *Plantae* son conocidas alrededor de 10.000 sustancias alelopáticas capaces de incidir sobre los hongos del suelo (Pupo, 2010).

En este sentido, los productos naturales derivados de las plantas representan una fuente atractiva de productos potenciales químico-biológicos, no sólo por su diversidad en estructuras químicas sino por su acción biológica específica y su carácter inocuo para el ambiente. Dentro de este contexto, en los últimos años se ha incrementado el interés por la extracción y purificación de metabolitos secundarios de origen vegetal con la intención de conocer su potencial de aplicación en la agricultura. En el caso de microorganismos fitopatógenos, existe información sobre cerca de 400 especies de plantas con propiedad fungicida, y se estima que esta propiedad es una característica que se presenta frecuentemente en algunos metabolitos secundarios (Grainge y Ahmed, 1988).

En la búsqueda de estrategias para el control de hongos patógenos, las plantas representan una opción por contener sustancias tóxicas en sus raíces y hojas, conocidos como metabolitos secundarios, que inhiben el crecimiento de estos.

Como una forma de explorar nuestros recursos vegetales y animales en la búsqueda de compuestos bioactivos, que representen una alternativa en el control de organismos fitopatógenos se ha profundizado en el estudio de las plantas aromáticas y muchos constituyentes de aceites esenciales, debido a su actividad biológica, entre las que se destacan propiedades antimicrobianas, antioxidantes y antimutagénicas.

Resultados positivos encontraron Vaillant *et al.* (2008) con aceites esenciales de *Laurusnobilis*, *Menthapiperitay Ruta graveolaens* contra *R. solani* y *Sclerotinia sclerotiorum* y al evaluar el efecto inhibitorio de cinco monoterpenos sobre un aislado de *R. solani* en papa: timol, alcanfor, citronelal (*Cymbo pogonnardus* L.) y 1,8 cineol encontrados en aceites esenciales. Zamora-Natera *et al.* (2005) en estudios realizados en México, encontraron actividad antifúngica *in vitro* del extracto crudo de semilla de *Lupinusex altatus* contra *S. Rolfsii* y *Alternaria. solani* (Ellis & G. Martin) L.R. Jones & Grout, *R. solani* y *F. oxysporum*.

Resultados similares fueron obtenidos por Puente, (2007) encontrando efecto antifúngico *in vitro* de extractos acuosos de *Bixa Orellana* L., *Euphorbia lactea* Haw., *Petiveria alliaceae* L., *Phylas trigulosa* Mart y Gal. y *Wedelia trilobata* Hitchc. frente a *R. solani* y *S. rolfsii*. En condiciones de campo, Robaina *et al.* (2008) encontraron, con el empleo del extracto de *Wedelia trilobata* (L.) Hitchc aplicado a la semilla, efecto fúngico sobre *S. rolfsii*.

Existe gran cantidad de extractos acuosos de plantas con actividad antifúngica, por ejemplo, el extracto de ajo (*Allium sativum*) ha tenido efecto inhibitorio sobre *Penicillium italicum*, *Aspergillus flavus*, *Fusarium spp*, *Rhizoctonia solani* y *Pythium spp*. Dentro de ese mismo género, la cebolla (*Allium cepa*) y el puerro (*Allium porrum* L.) logran inhibir el crecimiento del micelio de *Fusarium spp*, *Rhizoctonia solani* y *Sclerotium rolfsii* (Argüello *et al.*, 2009).

Se destacó el extracto acuoso de *Terminalia.catappa* L. por inducir mayor inhibición en el crecimiento micelial sobre *S. rolfsii* con respecto a los extractos etéreos y etanólicos. Este efecto puede estar asociado, de forma general, a la presencia de metabolitos secundarios como taninos y flavonoides (Espinosa *et al.*, 2012).

Existen numerosas especies forestales capaces de inhibir el crecimiento de diferentes hongos, la teca (*Tectona grandis*) por ejemplo, es una planta oriunda del Asia, está distribuida ampliamente por todo el país, su uso fundamental es para la obtención de madera. También se ha reportado el uso de sus hojas para controlar hongos del suelo. El extracto acuoso de esta planta posee un importante valor alelopático negativo contra hongos fitopatógenos del suelo como *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani* y *Sclerotium rolfsii* (Jimenez 2004; Robaina 2004; Espinosa 2007),

2.7. Descripción botánica del anamú (*Petiveria alliaceae* L.)

Petiveria alliaceae L. (anamú) fue descrita por Carlos Linneo, en el año 1753, es una planta medicinal, introducida en Cuba en 1848 y que procede de América Tropical. Esta especie tiene una distribución geográfica muy amplia: la Florida, América Central, desde Colombia hasta la Argentina y en África.

En países como Argentina, Cuba, Brasil, Guatemala, Haití, México, Puerto Rico y Venezuela, se le atribuyen a esta planta propiedades antifúngicas.

Un rasgo distintivo en la identificación de esta especie es su intenso olor aliáceo atribuido a compuestos sulfurados únicos de la planta entre los que se encuentran: el ácido fenilmetanosulfínico, el S-(2-hidroxietyl) fenilmetanotiosulfinato, el S-bencil-2-(hidroxietano) tiosulfinato, el S-(2-hidroxietyl) -2-hidroxietylano tiosulfinato y el S- bencil-fenilmetanotiosulfinato, 2.3 (Sariego, 2015).

Petiveria es un género monotípico de plantas fanerógamas perteneciente a la familia de las Phytolacaceae. Su única especie: *Petiveria alliaceae*, es originaria de Norteamérica.

Tiene los tallos erectos, pubescentes a glabros. Las hojas: con estípulas de 2 mm; pecíolo 0.4-2 cm, las hojas elípticas a oblongas u obovadas, de 20 x 7 cm, base aguda a cuneada, ápice acuminado o agudo a obtuso o redondeado. Las inflorescencias a menudo caídas, de 0.8-4 dm; pedúnculo 1-4 cm, pedicelo 0.5-2 mm. Flores de color blanco o verde a rosado, linear-lanceoladas a linear-oblongas,

de 3.5-6 mm; tomentoso ovario. Los frutos son aquenios estriados. Las hojas de *Petiveria* tienen un olor aliáceo cuando se aplastan.

2.8. Generalidades del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.)

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es un cultivo de gran importancia económica que se encuentra distribuido a nivel mundial. Tiene alto valor nutritivo para el consumo humano y amplia aceptación, a la vez se considera un componente indispensable de la dieta en Centroamérica y Suramérica (Ulloa *et al.*, 2011). Entre los países mayores productores se destacan en orden de importancia, expresados en porcentaje de producción mundial: India 19 %, Brasil 17 %, Myanmar 12 %, Estados Unidos 6 % y México 6 %. Estos países contribuyen con el 66 % del total producido (FAO, 2010).

En Cuba la producción de frijol no satisface la demanda de la población por lo que se hace necesario la importación de este alimento, obligando a importar más de 30.000 toneladas del grano (FAO, 2012), lo cual convierte al país en el mayor importador de frijol seco de toda América Latina.

En muchos lugares donde se cultiva el frijol las enfermedades son el factor más importante en la reducción de los rendimientos (García, 2014). Entre los organismos causantes de enfermedades se encuentran los hongos del suelo. En nuestro país, de clima subtropical, existen condiciones favorables para el desarrollo y proliferación de una vasta y heterogénea microbiota del suelo. Se destacan entre las especies más importantes *Rhizoctonia solani* y *Sclerotium rolfsii*, los que ocasionan pérdidas en el rendimiento del cultivo entre 25 y 50 % en Cuba (Díaz, 2011).

2.9. Características generales de *Sclerotium rolfsii* Sacc.

El hongo se clasifica dentro de la Clase *Deuteromycetes* u hongos imperfectos, Orden *Mycelia Sterilia*. En su fase telomórfica es un basidiomiceto denominado primeramente *Corticium rolfsii* Curzi, después *Pellicularia rolfsii* (Curzi) West y actualmente conocida como *Athelia rolfsii* (Curzi) C.C. Tu y Kimbrough, Familia *Atheliaceae*, Orden *Atheliales*, Subclase *Agaricomycetidae*, Clase *Agaricomycetes*,

División *Basidiomycota*, Reino *Fungi* (Index Fungorum, 2016). En cuanto a los hospedantes, el hongo afecta más de 200 géneros de plantas, entre ellos se destacan las familias Solanaceae y Fabaceae (Herrera, 2004; Mardec, 2007; Díaz, 2011).

El hongo ataca las posturas en los semilleros durante la germinación o posteriormente, causando lesiones en la base de los hipocotilos de las plántulas, caracterizada por hundimiento, ablandamiento y decoloración de la corteza, justamente en la línea del suelo, donde aparece una mancha oscura en la base del tallo, que aumenta hasta que se forma un anillo a su alrededor. Cuando llega a esta fase, la planta queda debilitada en la base del tallo que termina por caer. Los síntomas de la parte aérea son: clorosis, lenta defoliación y marchitez permanente.

Los síntomas y signos del patógeno facilitan bastante la identificación de la enfermedad en el campo. Mediante la observación de las plántulas una vez cosechadas se determina la afectación producida por este hongo. En frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) este patógeno ocasiona amarillamiento, marchitez, caída de las hojas y finalmente la muerte de la planta. En el cuello de la raíz se observa una lesión necrótica y, sobre los tejidos afectados, un crecimiento micelial blanco conteniendo los esclerocios del hongo, inicialmente blancos que se tornan color marrón oscuro posteriormente (Hernández *et al.*, 2012).

Este hongo puede vivir como micelio en tejidos infectados o en desechos de plantas, se disemina por suelos infectados o herramientas contaminadas, plántulas infectadas, agua de irrigación, vientos y semillas. Ataca las plantas en la base del tallo o cuerno de la raíz. El patógeno penetra el tejido y produce una masa considerable de micelio en la superficie de la planta, este proceso dura de 2 a 10 días (SENASA, 2012).

Arnold, (1986) reporta entre las principales especies hospedantes del patógeno las siguientes: *Ipomoea batatas* (L.) Lam., *Solanum tuberosum* L., *Phaseolus vulgaris* L. y *Helianthus annuus* L.

Los factores ambientales importantes en el desarrollo y patogenicidad de *S. rolfsii* lo constituyen la humedad del suelo, las precipitaciones y la sequía. Según Herrera, (2004) el micelio en condiciones de alta humedad desaparece rápidamente. En suelo seco la supervivencia del micelio fue de 100 % hasta los 35 días, disminuyendo a un 80 % a los 49 días. En condiciones naturales del suelo no hubo cambios hasta los 35 días, sólo a los 49 días se notó una caída de la supervivencia debido a las fuertes precipitaciones. Las condiciones de sequía agravadas por los cambios climatológicos, inducen el agrietamiento y recogimiento de la corteza de las plantas facilitando la penetración del hongo, favoreciendo las afectaciones por esta especie (Díaz *et al.*, 2005).

Las pérdidas debidas a enfermedades causadas por hongos del suelo han sido estimadas entre 14. 000 000 y 18. 000 000 de dólares por año, siendo el marchitamiento causado por *Sclerotium rolfsii* Sacc, una de las enfermedades más importantes en Argentina, (March y Marinelli., 1995).

2.10. Características generales de *Rhizoctonia solani* Kühn.

Los patógenos fungosos transmitidos a través de las semillas son una de los principales problemas a los que se enfrentan los productores, tanto privados como estatales.

El hongo se clasifica dentro de la Clase *Deuteromycetes* u hongos imperfectos, orden *Myceliasterilia*. En su etapa perfecta se corresponde con *Thanatephorus cucumeris* (A. B. Frank) Donk, Familia *Ceratobasidiaceae*, Orden *Cantharellales*, Subclase *Incertaesedis*, Clase *Agaricomycetes*, División *Basidiomycota*, Reino *Fungi* (Index Fungorum, 2016).

Según Díaz, (2011) el agente patógeno presenta amplia distribución mundial, siendo reportado en numerosos países entre los que podemos citar: México; Colombia; Cuba, (Mayea *et al.*, 1983); Costa Rica; Trinidad y Tobago; India; España y Egipto.

Entre los principales hospedantes del agente patógeno se destacan: *Allium cepa* L., *Brassica oleraceae* L., *Capsicum annum* L., *Coffea arabica* L., *Daucus carota* L.,

Lactuca sativa L., *Lycopersicum esculentum* (Mill.), *Nicotiana tabacum* L., *Saccharum officinarum* L., *Solanum tuberosum* L., *Phaseolus vulgaris* L. y *Glicine max* (L.) Merril. (Seidel, 1976).

El hongo afecta mucho más las plántulas jóvenes que el tejido de las plantas adultas, causando la enfermedad conocida como Damping-off o marchitez de las posturas. Con frecuencia se presenta clorosis del follaje, las plantas pueden marchitarse e incluso morir. Por lo general la enfermedad se encuentra localizada y en sus últimas fases pueden observarse fácilmente dentro de las parcelas pequeños parches en los que han muerto las plantas. Los síntomas aéreos no sirven para diferenciar la enfermedad en el campo (González - Ávila, 1988).

Mayea *et al.* (1983) señalan que en plantas pequeñas aparecen en el tallo e hipocotilo, úlceras de color pardo-rojizo, de varios tamaños, delimitados usualmente por un borde oscuro, las que luego se vuelven ásperas, se secan y destruyen la médula.

Ataca además las raíces causando pudriciones en la base de la planta (González Ávila, 1988). Aunque se ha informado sobre la aparición de los esclerocios en las lesiones, éstos no son siempre fáciles de ver, contrario a lo que ocurre con *S. rolfsii*, el cual es fácil de diagnosticar, por la presencia de abundantes esclerocios de color crema a pardo oscuro.

En cuanto a las pérdidas ocasionadas por este agente patógeno Goulart (1986) reporta en Minas Gerais, Brasil, pérdidas del 36 % de los campos por pudrición radical. En Cuba, González Ávila, (1988) destaca pérdidas en el rendimiento entre 25 y 50 % y Meléndez *et al.* (2002) reportan pérdidas del 80 % en campos de cebolla en la zona de Banao, provincia Sancti Spíritus.

El CIAT (1988) señala pérdidas en América Latina de hasta un 90 %. Barnes *et al.* (1990) estiman en 44. 000 000 de dólares, alrededor de un 85 %, las pérdidas por pudrición del vástago en maní (*Arachis hipogaea* L.), en Georgia, USA. Macnish y Neate (1996) señalan pérdidas del 8 al 35 % en campos individuales.

El hongo, según Pupo y Heredia (1998), se transmite por las semillas infectadas.

Herrera *et al.* (1988) señalan que la actividad saprofítica de *R. solani* permanece inalterable durante los primeros 6 meses de establecerse en el suelo, mientras que a partir de este período la supervivencia decrece a 25 cm de profundidad hasta un 60 % y a 15 cm a 90 %, manteniéndose el 100 % en la superficie del suelo, lo que evidencia que la actividad saprofítica del patógeno disminuye a medida que aumenta la profundidad. El efecto de la temperatura ha sido estudiado por numerosos investigadores. Herrera *et al.* (1988) encontraron rangos de temperatura óptimos entre 24 y 32 °C para el crecimiento micelial y 24 °C para la germinación de esclerocios.

La humedad del suelo constituye un factor determinante para la actividad biológica de *R. solani*. En este sentido Beute *et al.* (1981) señalan que el hongo es capaz de sobrevivir durante muchos años tanto en períodos de humedad como de sequía y González, (2012), plantea que se debe evitar la siembra en época lluviosa, donde es mayor la incidencia del patógeno.

3. Materiales y Métodos

El presente trabajo se desarrolló en el laboratorio del Grupo de Investigaciones Alelopáticas (GIA) de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, de conjunto con el laboratorio de Fitoquímica de la Facultad de Química Farmacia y el Instituto de Biotecnología de las plantas (IBP); todas pertenecientes a la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas en el periodo comprendido de octubre de 2014 - junio 2016.

3.1. Influencia de la altitud de crecimiento de las plantas, tipo de secado y forma de extracción en función del TDS

- **Colecta del Material Vegetal**

El material vegetal utilizado fue colectado en tres localidades de la provincia Villa Clara (zona central del país; 22°24'19"N 79°57'15"O) (Tabla 1).

Tabla 1. Localidades de colecta de las plantas

Localidad	Municipio	Ubicación geográfica	Altitud (msnm)
Carahatas	Quemado de Güines	Zona de costa norte	5
Esperanza	Ranchuelo	Zona de llanura	100
Jibacoa	Manicaragua	Zona de montaña	450

Se realizó la prospección en línea recta del anamú a partir del punto de origen completando una distancia de 25 m. Cada 5 m se colectaron las partes aéreas (hojas, tallos e inflorescencias); de cinco plantas expuestas al sol, en horario entre las 12:00 pm y 4:00 pm, previendo que tuvieran el menor contenido de agua posible, en los meses de noviembre y diciembre de 2013. Todas estas se unificaron para formar el material vegetal en estudio obtenido de las muestras de las zonas de colecta (Anexo 2).

Se utilizaron 2 tipos de secado al Sol a temperatura ambiente por 72 h y a la Sombra en condiciones controladas a 25 °C, escasa iluminación, humedad relativa del 40 %,

en un periodo de 6 días. Luego se molinaron en un molino de cuchillas (Nossen-8255, RDA) con un tamaño de tamiz de 0,5 mm. Su almacenamiento hasta el momento de uso fue en frascos plásticos herméticos con tapas, bajo condiciones de oscuridad y baja humedad.

- **Obtención de extractos por diferentes métodos de extracción**

Se empleó extracción por Maceración en Reposo (MR) durante 24, 48 y 72 h con recambio del solvente y Maceración por Agitación (MA) durante 24 h en la Zaranda Orbital (Gerhardt, Alemania)

Para ello se tomó 1 g de cada material vegetal, se le añadió 40 ml de agua destilada y se sometió al proceso de extracción por maceración según el correspondiente tratamiento.

Cada 24 h se realizó un filtrado a vacío para obtener el extracto. En los tratamientos de 48 y 72 h se preservaron los residuos vegetales y se les adicionaron, nuevamente, 40 ml del solvente para mantenerlos en maceración hasta completar su tiempo de extracción. La extracción se realizó por triplicado.

Los tratamientos se relacionan en la (Tabla 2).

Tabla 2. Tratamientos para la determinación del TDS

Altitud	Tipo de Secado		Tipo de extracción	Tiempo de extracción
5 msnm	Sol	Sombra	MR	24, 48 y 72 h
100 msnm	Sol	Sombra		
450 msnm	Sol	Sombra		
5 msnm	Sol	Sombra	MA	24 h
100 msnm	Sol	Sombra		
450 msnm	Sol	Sombra		

Determinación del TDS

Se tomaron 5 muestras de diferentes réplicas del proceso de extracción determinándose el peso (mg) del TDS empleando un Electrodo (InoLab) acoplado a un pHmetro (Hanna) utilizando 3 mediciones.

Los mejores resultados de este análisis se utilizaron para el ensayo biológico.

Los resultados fueron analizados mediante el paquete estadístico SPSS, versión 16.0 para Windows, a través de la prueba de Kruskal – Wallis para comparaciones de medias y Mann-Whitney para detectar diferencias entre pares.

3.2. Efecto alelopático de *P. alliaceae* sobre *R. solani* y *S. rolfsii* bajo condiciones controladas

El ensayo se realizó con los extractos obtenidos mediante el método de extracción de mejores resultados según el TDS. A partir de 15 g del material vegetal se obtuvieron los extractos en función del método de secado y altura de desarrollo de la planta. Posteriormente se llevaron a sequedad en rotoevaporador (Heidolph, Alemania) a presión reducida, 30 rpm y 40 °C, luego cada uno se resuspendió en 15 ml de agua destilada para obtener un extracto inicial con una concentración de 1 g ml⁻¹. Su conservación hasta el momento de uso fue en congelación a -4 °C.

- **Selección de las concentraciones de trabajo**

Se tomaron las concentraciones de 0 % (testigo) 10 %, 25 %, 50 % y 95 % de esta forma se cubre un mayor rango de efecto del extracto pues, es primera vez que se trabaja con este sobre *R. solani* y *S. rolfsii*.

- **Preparación del medio de cultivo**

Se utilizó el medio líquido de Caldo Dextrosa Saboraud, preparado a 30 g/L de H₂O, luego se esterilizó en autoclave (Raypa) a 121 °C y 1,2 atm. de presión, durante 15 min. Una vez concluido este proceso se dejó enfriar hasta aproximadamente 60 °C.

- **Preparación del inóculo de *R. solani* y *S. rolfsii***

Se preparó un Caldo a base de miel proteica (30 g), levadura *Torula* (3 g), agua destilada a un pH (5.5 - 6.0), se esterilizó en autoclave (Raypa) a 121 °C, se inoculó el medio y se colocó en Zarando Orbital (Gerhardt) a una temperatura de 30 °C con un crecimiento por 48 h.

Se utilizaron en el estudio las especies fungosas *R. solani* y *S. rolfsii*, de la micoteca de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas. La titulación de los cultivos de las especies en estudio fueron de $5,5 \times 10^9$ unidades formadoras de colonia (UFC) y 6×10^9 UFC respectivamente, ya que a estos valores según estudios realizados se producen las mayores inhibiciones.

- **Microensayo de actividad biológica de *P. alliaceae* sobre *R. solani* y *S. rolfsii***

Para probar la actividad biológica de los extractos de la planta sobre los hongos, se filtraron por membranas miliporos de acetato de celulosa, de 0.2 μm de diámetro MINISART® (Sartorius), para la eliminación de bacterias y/o esporas de hongos causantes de contaminación. Se utilizó una placa estéril de poliestireno para microtitulación de 96 pocillos con fondo redondo, y volumen total de 200 μl (Fernández et al., 1998). En cada una de estas se adicionó con una micropipeta, el volumen del medio de cultivo, el inóculo y el extracto tomado de diferentes zonas geográficas, en función del tipo de secado y la forma de extracción con las diferentes concentraciones empleadas (Tabla 3)

Tabla 3. Composición de los pocillos en función de las concentraciones

Concentración (%)	V. Extracto (μl)	V. Medio (μl)	V. Inóculo (μl)
-------------------	-------------------------------	----------------------------	------------------------------

10	20	170	10
25	50	140	10
50	100	90	10
95	190	0	10
Testigo	0	190	10

Para cada microorganismo se realizaron 3 réplicas de cada tratamiento según las concentraciones (10 %, 25 %, 50 % y 95 %), además del testigo.

En cada caso se evaluó el crecimiento micelial a las 24 h y 48 h de las concentraciones en estudio. De forma visual se constató la aparición de turbidez debido al crecimiento del microorganismo en estudio.

Se llevó a las condiciones semicontroladas aquellos tratamientos de resultado inhibitorio: plantas colectadas a 5 y 100 msnm secadas al sol y a la sombra a las concentraciones de 10, 50 y 95 %. Esto permitió comprobar el efecto del extracto sobre *R. solani* y *S. rolfsii* en la interacción con la planta.

3.3. Tamizaje Fitoquímico y cuantificación de metabolitos mayoritarios

La composición química del extracto acuoso se determinó mediante el tamizaje fitoquímico según la Norma Ramal de Salud Pública 311/98 (MINSAP, 1998). Se tomaron 5 g del material vegetal seco y triturado y se dejó en maceración por 24 h en 50 ml de agua destilada (1:20 p/v) en oscuridad. Posteriormente se filtraron al vacío con papel de filtro Whatman # 1. Se tomaron alícuotas de 1 ml para la realización de las reacciones de identificación.

Reacciones de identificación:

- Ensayo de Espuma (Saponinas).
- Ensayo de Fehling (Carbohidratos reductores).
- Ensayo de Shinode (Aminoácidos Libres).
- Ensayo de Dragendorff y Mayer (Alcaloides).
- Ensayo de Cloruro férrico (Fenoles y/o Taninos).

Los resultados se valoraron de forma cualitativa estableciendo varias categorías de acuerdo a la evidencia en las reacciones: (–) ausencia del metabolito, (+) presencia del metabolito en bajas concentraciones, (++) presencia del metabolito en concentraciones moderadas, (+++) presencia del metabolito en altas concentraciones.

3.3.1. Cuantificación de compuestos fenólicos en el extracto acuoso de *P. alliaceae*

Para la cuantificación de los fenoles totales se empleó el método colorimétrico con el reactivo de Folin-Ciocalteu. Los resultados se expresaron a partir de una curva de calibración. Se prepararon diluciones 1:20 (extracto: agua).

A 1 ml de cada extracto vegetal se adicionó 80 μ L de Folin-Ciocalteu (1N), se dejó reposar durante 5 min y se adicionaron 800 μ L de carbonato de sodio (Na_2CO_3 , 20 % p/v), se llevó a un volumen final de 2 ml con agua destilada y se dejó reposar la mezcla por 90 minutos a una temperatura de 23 °C. También se preparó un blanco con todos los componentes excepto la disolución de ácido gálico.

Finalmente, se realizó la lectura a 750 nm en un espectrofotómetro UV-VIS (Rayleigh 1601, China). El contenido de fenoles totales de cada extracto se expresó en mg de ácido gálico/ml de extracto, mediante extrapolación en una curva de calibración empleando como patrón ácido gálico a diferentes concentraciones. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

Se determinó, además, la linealidad de la curva de calibración; este parámetro expresa la capacidad de un método de análisis de dar una respuesta o resultados instrumentales linealmente proporcionales a la cantidad del analito a analizar, dentro de un determinado intervalo (CECMED, 2007).

Para ello se halló la significación de la regresión expresada a través del coeficiente de correlación (r) y el de determinación (r^2) según la expresión matemática:

$$r = \frac{\sum (x - \bar{x})(y - \bar{y})}{\sqrt{\sum (x - \bar{x})^2 \sum (y - \bar{y})^2}} = \frac{\sum xy - \frac{\sum x \sum y}{n}}{\sqrt{(\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n})(\sum y^2 - \frac{(\sum y)^2}{n})}}$$

Criterio de medida: $r \geq 0,990$ y $r^2 \geq 0,98$

Para verificar la linealidad se determinó el coeficiente de variación de los factores de respuesta (CVf) así como la desviación estándar relativa de la pendiente ($Sbrel$)

$$CVf = \frac{Sf}{\bar{f}} \quad f = \frac{Abs}{C(X)} \quad Sbrel = \frac{Sb}{b} * 100$$

$CVf < 5\%$; $Sbrel < 2$

Donde:

Sb - Desviación estándar de la pendiente

Sf - Desviación estándar de los factores de respuesta (f)

Abs - Absorbancia

$C(X)$ - Concentración

Para determinar relación entre la altura de los sitios de colecta de las plantas y el contenido de compuestos fenólicos se determinó la altura de crecimiento del material vegetal. Para ello se empleó un cartográfico geo-referenciado de la provincia de Villa Clara Escala 1:10 000) y el programa MapInfo ver 8.5 para Windws.

3.4. Efecto alelopático del extracto acuoso de *P. alliaceae* sobre el desarrollo de la enfermedad producida por *R. solani* y *S. rolfsii* en condiciones semicontroladas

El experimento permitió conocer el efecto del extracto sobre los hongos en condiciones semicontroladas. Se utilizó el frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) variedad Güira 89, registrada en el listado oficial de variedades comerciales (MINAGRI, 2011) como planta indicadora de la severidad de la enfermedad. La utilización de esta variedad forma parte de una estrategia de trabajos colaterales en función de su susceptibilidad ante hongos fitopatógenos; según González, (1988) la resistencia del frijol al ataque de hongos del suelo está asociada a la presencia de antocianinas en los hipocotilos. De acuerdo con sus estudios las variedades de testa negra tienen mayor contenido de antocianinas que las de testa roja y blanca.

Para el desarrollo del experimento el suelo empleado es del tipo Pardo Mullido medianamente lavado (Hernández *et al.*, 1999), el sustrato procedió de la Estación Experimental “Álvaro Barba Machado” de la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas del Campo 3 que se encontraba en barbecho durante un año, este se esterilizó en autoclave por 1 h a 1,2 atm de presión. El proceso se realizó 2 veces con intervalo de 3 días.

En cada recipiente plástico se sembraron tres semillas, y en el suelo el inóculo de los hongos fitopatógenos al 2 %. El mantenimiento de las condiciones de humedad del suelo se realizó a través de riegos cada tres días. El volumen de agua destilada dependió del crecimiento del cultivo y las condiciones de evapotranspiración según las condiciones climáticas bajo las cuales se desarrolló el experimento. Para determinar el volumen de agua a agregar en cada réplica se pesaron 15 de estos potes con suelo llevado hasta capacidad de campo, posteriormente cada tres días se pesaron estos mismos. Por diferencia de pesada se determinó la cantidad de agua a regar que fue a partir de la adición de 30 ml de agua por vaso.

Con el objetivo de lograr un mayor número de raíces por plantas se humedeció el sustrato para extraer la raíz lo más completa posible, posteriormente se lavaron para eliminar todos los residuos del sustrato y fueron secadas al sol durante 72 h.

- **Preparación del inóculo de *R. solani* y *S. rolfsii***

Se procedió a esterilizar en autoclave dos erlenmeyers, cada uno con 200 g de arroz con cáscara. Se le adicionaron 5 discos del hongo proveniente de las márgenes de colonias de cuatro días de edad y se dejaron en incubación a 28 ± 1 °C en oscuridad por 10 días (Leicach, 2005).

3.4.1. Efecto del tratamiento a la semilla por inmersión en el extracto acuoso de *P. alliaceae* sobre *R. solani* y *S. rolfsii* en condiciones semicontroladas

Para determinar el efecto del extracto acuoso de *P. alliaceae* sobre el crecimiento micelial de *R. solani* y *S. rolfsii* bajo condiciones semicontroladas se trató la semilla por inmersión en las concentraciones de los tratamientos de mejores resultados del experimento de laboratorio (10 %, 50 %), además del testigo.

El extracto de cada una de estas variantes se desarrolló a partir de 50 g del material vegetal macerados en 1000 ml de agua destilada durante 48 h en condiciones de oscuridad. Posteriormente se redujo el volumen hasta 50 ml para obtener un extracto inicial a la concentración de 1 g ml^{-1} . A partir de este se prepararon diluciones en concordancia con los resultados del ensayo de laboratorio teniendo en cuenta la zona geográfica y el tipo de secado. Se emplearon en total 180 semillas de frijol (previamente desinfectadas con hipoclorito de sodio al 1 %).

La inmersión de las semillas tuvo un tiempo de duración de una y dos horas, posteriormente se sembraron las semillas de frijol en recipientes plásticos con capacidad para 200 g de suelo.

3.4.2. Efecto del tratamiento por peletización de la semilla con el extracto acuoso de *P. alliaceae* sobre *R. solani* y *S. rolfsii* en condiciones semicontroladas

Se empleó una disolución de almidón de yuca al 8 % del volumen total de material peletizante (10 ml) (Cupull *et al.*, 2003). Se calentó el almidón con un volumen de agua destilada hasta que comenzó a aglutinarse, después se dejó enfriar por 3 minutos y se le agregó una cantidad de extracto en dependencia de la concentración final (Tabla 4). Se mezcló hasta que alcanzó una consistencia viscosa. Se adicionaron 100 semillas en la mezcla según la concentración y se depositaron en una placa Petri expuesta al aire para que se seque el producto sobre la semilla.

Tabla 4. Proporciones de los componentes de las mezclas para la Peletización

Concentración (g mL ⁻¹)	Almidón (g)	Agua destilada (ml)	Extracto (ml)
0.10	0,8	18	2
0.50	0,8	10	10
0.95	0,8	8	12

3.4.3. Efecto del tratamiento por peletización de la semilla con el material pulverulento de *P. alliaceae* sobre *R. solani* y *S. rolfsii* en condiciones semicontroladas

Para peletizar la semilla con polvo vegetal se prepararon 50 ml de la disolución de almidón de yuca al 8 % (Cupull *et al.*, 2003). Se realizó su cocción con 25 ml de agua y posteriormente se adicionó el resto. En la mezcla fría se depositaron 114 semillas en total y se agitaron con una varilla de vidrio para que todas se cubrieran con el almidón.

Seguidamente se depositaron sobre una malla fina expuestas al aire durante unos minutos para eliminar el exceso de almidón.

En una placa de Petri se adicionó el material pulverulento según la concentración (Tabla 5) y se colocaron 18 semillas, se cubrió con la tapa y se removieron vigorosamente para que el material vegetal se fijara a la semilla. Se dejaron expuestas al aire por 24 h para su secado.

Tabla 5. Proporciones de los componentes de las mezclas para la peletización.

Concentración (g mL ⁻¹)	Almidón (g)	Cantidad de material vegetal (g)
0.10	0.8	0.5
0.50	0.8	1.0
0.95	0.8	1.5

Evaluación de resultados

Para determinar las afectaciones producidas por los hongos en la raíz y el tallo a los quince días de iniciado el experimento se evaluaron las plantas de frijol a través de las escalas propuestas por Keijer *et al.* (1997) y Bradley *et al.* (2001) (Tabla 6).

Tabla 6. Escala para determinar los daños producidos por los hongos

Órgano afectado	Escala	Descripción del daño
Raíz Keijer <i>et al.</i> (1997)	0	Plántulas saludables, ausencia de síntomas
	1	Decoloración amarilla - marrón cerca del hipocotilo
	2	Decoloración amarillo - marrón cerca del hipocotilo, lesiones o puntos marrón en la zona
	3	Superficie completamente marrón o lesiones cubriendo más del 75% de la superficie radicular
	4	Damping off pre-emergente, plántulas muertas o en estado de marchitez

	0	Plántulas saludables, ausencia de síntomas en el hipocotilo
Tallo Bradley <i>et al.</i> (2001)	1	Lesiones superficiales en el hipocotilo (decoloración amarillo – marrón)
	2	Lesiones moderadas ($\geq 2,5$ mm)
	3	Lesiones profundas en el tejido
	4	Plántulas muertas o en estado de marchitez

Los resultados de las evaluaciones mediante la escala fueron procesados a través de la fórmula propuesta por Townsend, G. y Heuberger, J. (1943) y expresado como Índice de severidad de la enfermedad (ISE).

$$ISE = \frac{\sum [(n \cdot v)]}{(n \cdot k)}$$

Donde:

n- Número de plantas afectadas en cada nivel de la escala.

v- Valor numérico del nivel de la escala

N- Número total de plantas evaluadas por tratamiento

k- Último nivel de la escala

En cada experimento se determinó la eficiencia o eficacia del tratamiento (ET) (porcentaje de protección contra el ataque del hongo) (Mahdy *et al.*, 2006).

$$ET = \frac{(X_{test.} - X_{tratam.})}{(X_{test.})} * 100$$

Posteriormente los resultados obtenidos de ISE y ET se procesaron a través de las pruebas no paramétricas de Kruskal – Wallis y Mann-Whitney en el programa estadístico SPSS 16.0 para Windows.

El diseño experimental fue completamente aleatorio con 5 réplicas por tratamiento (Tabla 7).

Tabla 7. Tratamientos

Tratamientos	
Aplicación del extracto a la semilla	Inmersión de la semilla en el extracto durante 1 h y 2 h a la concentración (0,1 g/mL, 0,5 g/mL); a 5, 100 msnm con material secado a la sombra y al sol, suelo + inóculo (<i>R. solani</i> o <i>S. rolfsii</i>).
	Testigo: Inmersión de la semilla en agua destilada, suelo + inóculo (<i>R. solani</i> o <i>S. rolfsii</i>).
	Testigo: Inmersión de la semilla en agua destilada, suelo sin inocular.
	Testigo: Inmersión de la semilla en el extracto a diferentes concentraciones (0,1 g/mL; 0,5 g/mL y 0,95 g/mL), a (5, 100 msnm), secado a la sombra y al sol, suelo + inóculo (<i>R. solani</i> o <i>S. rolfsii</i>).
	Peletización de la semilla con polvo a diferentes concentraciones (0,5 g/mL; 1.0 g/mL); a 5, 100 msnm con material secado a la sombra y al sol, suelo + inóculo (<i>R. solani</i> o <i>S. rolfsii</i>).
	Peletización de la semilla con extracto a diferentes concentraciones (0,1 g/mL, 0,5 g/mL); a 5, 100 msnm con material secado a la sombra y al sol, suelo + inóculo
	Testigo: Semilla en agua destilada + suelo sin inocular.
	Testigos: Peletización de la semilla en agua destilada + almidón, suelo sin inocular.
	Testigo: Peletización de la semilla en el extracto a diferentes concentraciones (0,1 g/mL, 0,5 g/mL), suelo sin inocular.
	Testigo: Peletización de la semilla con polvo a (0,5 g/mL; 1.0 g/mL), suelo sin inocular.

4. Resultados y Discusión

4.1. Influencia de la altitud de crecimiento de las plantas, tipo de secado y forma de extracción en función del TDS

Tipo de secado: Las cantidades de sólidos disueltos fueron mayores en el método de secado a la sombra con respecto al secado al sol (Figura 1).

Método de extracción: no existieron diferencias significativas entre el método de maceración en reposo durante 48 y 72 h y maceración en agitación por 24 h en ninguna de las muestras estudiadas. Estos valores fueron diferentes estadísticamente a los obtenidos con el método de maceración en reposo durante 24 h (Figura 1). Este método de extracción constituye un paso de avance importante desde el punto de vista práctico, pues permite obtener altos niveles de concentración de sustancias, en tiempos muy cortos y a bajos costos, teniendo en cuenta que el anamú crece por lo general en cualquier lugar con facilidad y con una inversión de 45 CUP/ ha sembrada de frijol (*Phaseolus vulgaris*L.); además es factible para una producción local o específicamente para el productor agrícola, el cual no necesitaría comprar productos químicos (altos precios en el mercado mundial), si hay un producto natural con la misma efectividad.

El secado de las plantas es un aspecto a tener en cuenta en los estudios alelopáticos y fitoquímicos en general. La temperatura a la cual se someten las plantas para extraerle el agua y lograr su deshidratación nunca debe exceder los 60°C (Narwal, 1996) y puede provocar pérdidas totales o parciales de metabolitos. Muchos de estos compuestos comienzan a experimentar pérdida de radicales, cadenas laterales y componentes de su estructura cuando se incrementa la temperatura por encima de este valor (Stryer, 2004; Lehninger, 2005)

Por otro lado la iluminación durante el secado también puede ser otra causa de variación en la composición química final de los extractos obtenidos de las plantas. Las radiaciones solares pueden interferir en la estructura de las sustancias.

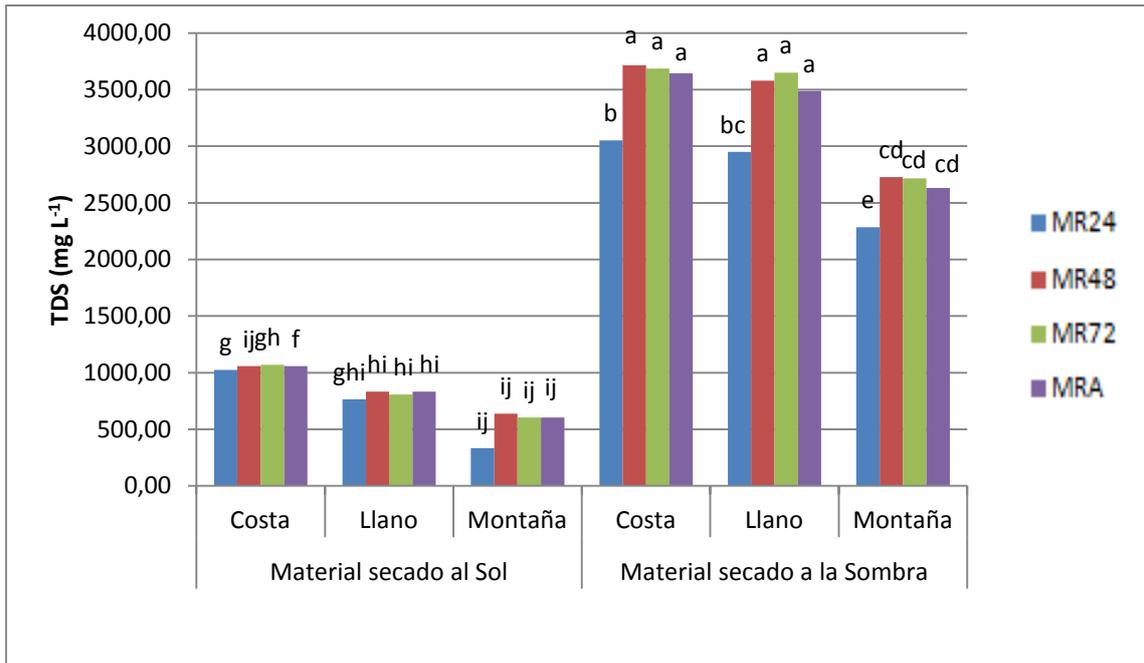


Figura 1. Cuantificación del Total de Sólidos Disueltos en los extractos acuosos del anamú según la altitud, tipo de secado y forma de extracción

Letras minúsculas desiguales representan diferencias estadísticas significativas entre los extractos.

En condiciones normales estos compuestos pueden ser reemplazados por otros que realicen la acción para la cual están destinados, pero después de cortadas las plantas se deteriora paulatinamente el sistema fotosintético, razón por la cual no pueden ser sustituidos los compuestos afectados por la iluminación.

También la radiación solar puede desencadenar reacciones que generen la aparición de metabolitos que inicialmente no se encontraban en la planta, puede provocar rupturas en las estructuras químicas, llevando la sustancia a sillares de construcción o a compuestos raros en la planta. Todo esto redundará finalmente en la pérdida o aparición de nuevas sustancias y por ende en la composición alterada de los extractos obtenidos de los tejidos de las plantas (Espinosa, 2007).

4.2. Efecto alelopático de *P. alliaceae* sobre *R. solani* y *S. rolfsii* bajo condiciones controladas

El análisis del efecto alelopático *in vitro* de los extractos acuosos del anamú sobre el crecimiento micelial de *R. solani* y *S. rolfsii*, mostró que el método de secado a la sombra para *ambas especies* se inhibió el crecimiento a todas las concentraciones estudiadas de los extractos obtenidos de plantas colectadas en la zona costera (5 msnm) y los extractos obtenidos de plantas colectadas en la zona llana (100 msnm) lograron inhibición de los hongos a las concentraciones de 50 y 95 %. Las menores inhibiciones se obtuvieron en los extractos obtenidos de la zona montañosa donde en todas las concentraciones existió el crecimiento micelial de los hongos; excepto en el 95 % para *R. solani*.

El extracto obtenido de plantas colectadas en zonas costeras (5 msnm) presentaron, independientemente de la concentración y forma de secado, un fuerte efecto inhibitorio sobre el crecimiento de ambos hongos (Figura 2), esto demuestra que en este extracto se encuentran metabolitos suficientemente tóxicos como para ejercer una acción inhibitoria, aun cuando se encuentre en bajas concentraciones.

Las plantas colectadas a esta misma altitud pero secadas al sol permitieron el crecimiento de ambas especies a las concentraciones más bajas (10 y 25 %). Todo lo contrario ocurrió a 450 msnm donde el extracto provocó crecimientos en todas sus concentraciones. De esta forma se puede afirmar que la mínima concentración inhibitoria se puede encontrar en el rango entre 50 y 95 %.

De manera general quedó demostrado que los metabolitos presentes en los extractos obtenidos de plantas de anamú que crecieron a la sombra mostraron una mayor inhibición del crecimiento ante las especies estudiadas respecto a los extractos obtenidos de plantas de anamú con crecimiento al sol, este método provoca pérdidas totales o parciales de metabolitos. Muchos de estos compuestos comienzan a experimentar pérdida de radicales, cadenas laterales y componentes de su estructura (Stryer, 2004; Lehninger, 2005).

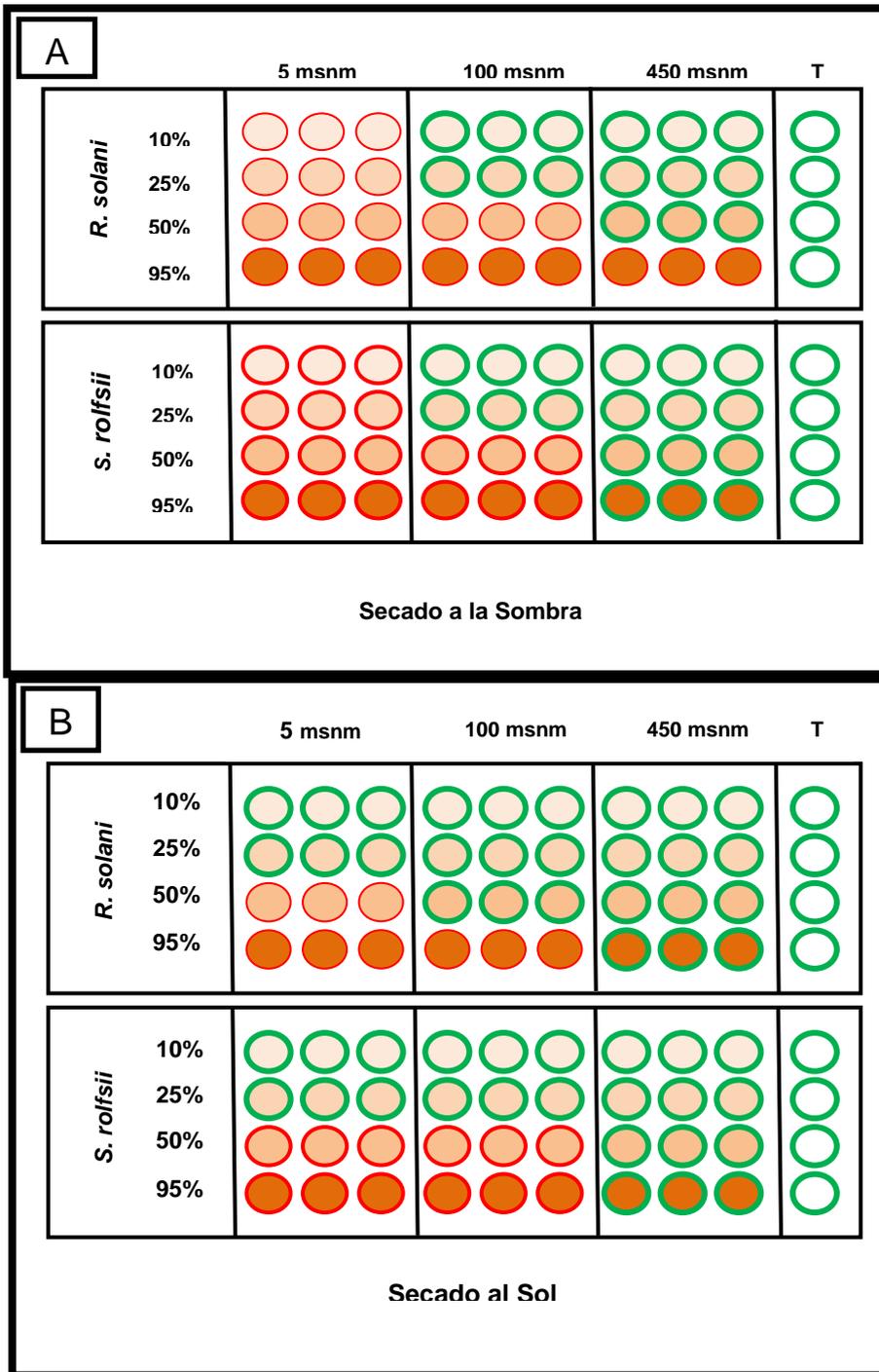


Figura 2. Efecto alelopático del material secado al sol y a la sombra sobre el crecimiento micelial de *R. solani* y *S. rolfsii* (A- Material secado a la sombra, B - Material secado al sol)

Leyenda:

Círculos con bordes verdes representan la presencia del crecimiento micelial.

Círculos con bordes rojos representan la ausencia del crecimiento micelial.

Puente, (2007) encontró efecto antifúngico *in vitro* de extractos acuosos de *Bixa Orellana* L., *Euphorbia lactea* Haw., *Petiveria alliacea* L., *Phyllanthus niruri* L. y *Wedelia trilobata* Hitchc. sobre *R. solani* y *S. rolfsii*.

En condiciones de campo, Robaina *et al.* (2008) encontraron, con el empleo del extracto de *Wedelia trilobata* (L.) Hitchc aplicado a la semilla, efecto fúngico sobre *S. rolfsii*.

An (2005), demuestra a través de hipótesis basadas en modelos matemáticos desarrollados a partir de curvas de dosis-respuesta, que el fenómeno alelopático depende del aleloquímico en específico, de las características genéticas del organismo donador y la fase de desarrollo en que se encuentre, de las condiciones ambientales en que los aleloquímicos son producidos y liberados, así como de la sensibilidad dado el genotipo de la especie receptora que se trate. El mismo autor enfatiza la importancia de la concentración de los aleloquímicos en el efecto alelopático. Observándose en general una estimulación de los mismos a bajas concentraciones, mientras a altas concentraciones el efecto se mueve hacia la inhibición (Hernández *et al.*, 2010).

Pupo *et al.* (2007) con el extracto acuoso de *Tagetes* a diferentes dosis, demostraron efectividad en el control del crecimiento micelial de *A. porri*, *A. solani*, *C. fulvum* y, *C. beticola* en condiciones “*in vitro*”. En relación con el efecto producido por el extracto de *Tagetes* frente a *R. solani* a la concentración 0,50 g/mL, produjo una mayor inhibición en el crecimiento del hongo en relación con el resto de las concentraciones empleadas en las que se aprecia una diferencia significativa, se logró una mayor inhibición sobre *R. solani* con la concentración de 0,50 g/mL del extracto tanto de *Tagetes erecta* L. como de *Terminalia catappa* L.

4.3. Tamizaje Fitoquímico y cuantificación de metabolitos mayoritarios

Los resultados del Tamizaje Fitoquímico, mostraron la presencia del extracto acuoso, de alcaloides, saponinas, carbohidratos reductores y fenoles, este último en mucha abundancia (Anexo 2). No se detectó la presencia de aminoácidos libres (Tabla 8).

Tabla 8. Resultados del tamizaje fitoquímico

Metabolitos Secundarios	Extracto acuoso de <i>P. alliaceae</i>
Taninos o Fenoles	+++
Alcaloides	++
Carbohidratos Reductores	+
Saponinas	+
Aminoácidos Libres	-

Leyenda: - ausencia + presencia ++ abundancia +++ mucha abundancia

Entre los grupos químicos de mayor relevancia por sus propiedades alelopáticas, se encuentran: fenoles y derivados del ácido benzoico, flavonoides y taninos, alcaloides, terpenoides, glucósidos cianogénéticos, aminoácidos no proteicos, lactonas no saturadas, ácidos orgánicos, alcoholes alifáticos, aldehídos y cetonas, ácidos grasos y el complejos de quinonas (Arévalo, 2011).

Al igual que los resultados obtenidos en el tamizaje fitoquímico, numerosos estudios confirman la abundancia de fenoles, taninos, carbohidratos reductores, alcaloides y saponinas en la especie de *P. alliaceae* (Muñoz, 2011).

La importancia de los fenoles radica en que producen soporte mecánico a la planta, contribuyen en la coloración de las flores y frutos, protegen contra patógenos y herbívoros y tienen una gran efectividad protegiendo los tejidos frente a la radiación UV (Valares, 2011).

Mandal *et al.* (2010), refiere que los fenoles, así como los flavonoides, antocianinas y taninos, cumplen importantes funciones en las plantas, entre las que se encuentran formar parte de los mecanismos de defensa contra organismos patógenos, mediante la síntesis de fitoalexinas, además, Nelson, (2010) señala que los alcaloides proveen en forma directa fuentes de carbono y nitrógeno rápidamente asequibles para el crecimiento de los hongos del suelo, y que luego de mineralizados, sirven como nutrientes para aprovechamiento de los mismos vegetales.

Gran cantidad de compuestos alelopáticos de origen fenólico se comportan como fitoalexinas (Valares, 2011), su función, esencialmente, es la de defensa

de la planta. Durante el ataque de microorganismos patógenos se activan rutas metabólicas específicas que rinde n este tipo de compuesto.

4.3.1. Cuantificación de compuestos fenólicos en el extracto acuoso de *P. alliaceae*.

La curva de calibración desarrollada con el patrón (ácido gálico) mostró un coeficiente de correlación por encima de 0,99, lo que demuestra que existe una buena relación entre las absorbancias obtenidas y la concentración del patrón en el intervalo de 5 – 25 mg L⁻¹ (Figura 3).

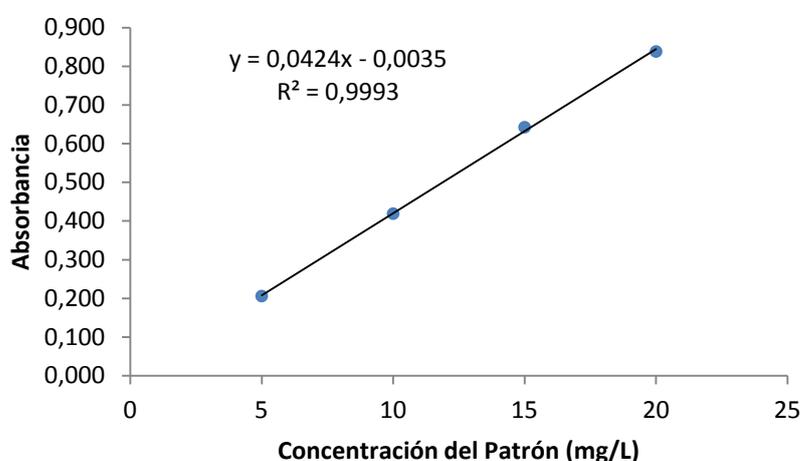


Figura 3. Curva de calibración para la cuantificación de fenoles totales

Para verificar la linealidad se determinó el coeficiente de variación de los factores de respuesta (*CVf*) (Anexo 3), la desviación estándar relativa de la pendiente (*Sbrel* (%)) y el intervalo de confianza del intercepto (*i*). Según las normas establecidas para este tipo de estudio, el primero de estos parámetros debe ser inferior al 5 %, el segundo no debe sobrepasar el 2 % y dentro del intervalo de *i* debe encontrarse el cero (ICH, 1996; CECMED, 2007). En este caso se obtuvieron los siguientes valores: *CVf*= 2.89 %; *Sbrel*= 1,56 %; *i*= - 0,004 ± 0,0199. Se demuestra que la curva es lineal y cumple de modo apropiado con la Ley de Bouguer-Lambert-Beer, lo cual indica que se puede usar la absorbancia como magnitud adecuada para determinar a partir de ella la concentración de metabolito presente en las muestras.

En el estudio, la concentración de fenoles en la planta disminuye a medida que se gana en altitud, en la zona costera (5 msnm) las plantas de anamú son más tóxicas, siendo esta la altitud de mayor contenido de fenoles (Figura 4).

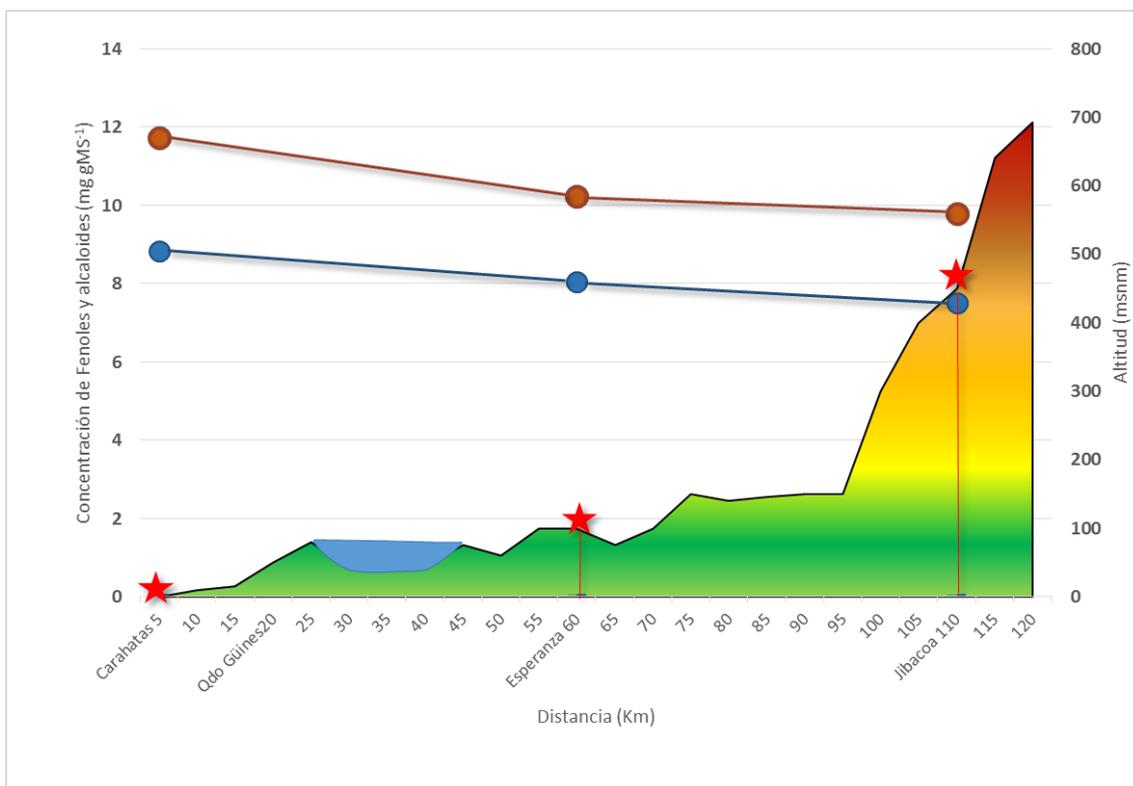


Figura 4. Influencia de la altitud de las plantas en la producción de metabolitos secundarios

Leyenda

Línea azul: fenoles al sol Línea naranja: fenoles a la sombra

Esto se debe a la respuesta de adaptación en cada una de las zonas geográficas, pues las plantas se adaptan al hábitat particular en el cual crecen (Valares, 2011) y produce cantidades diferentes de metabolitos secundarios: fenoles, según el estrés producido por diferentes factores en cada zona, estos provocan la activación de rutas metabólicas secundarias que están encaminadas a dar respuesta ante estas situaciones ambientales, causa por la cual pueden producirse o no ciertas sustancias en la planta. Además, bajo estas condiciones los metabolitos producidos pueden ser o no tóxicos a diferentes microorganismos (Sampietro, 2003).

Los tratamientos de salinidad aumentan significativamente el contenido de fenoles. El tratamiento con elevada salinidad aumentó significativamente el contenido de fenoles y la capacidad antioxidante de *Ganeria*, pero no afectó a *Faradia* (Niñirola *et al.*, 2015). Similares resultados se han obtenido en cultivos sometidos a tratamientos salinos, como alcachofa y cardo (Colla *et al.*, 2012; Borgonone *et al.*, 2013), y verdolaga (Teixeira y Carvalho, 2008). Se ha demostrado que el contenido de estos compuestos fitoquímicos puede incrementarse por factores que induzcan estrés en la planta (Pandino *et al.*, 2010), como el aumento de la salinidad en la solución nutritiva.

En presencia de altas concentraciones de cloruro de sodio (NaCl), incrementa la actividad de enzimas antioxidantes y sintetiza fenoles, para contrarrestar los efectos negativos del estrés oxidativo (Meloni *et al.*, 2008).

Los valores más elevados de concentración se han localizado en las zonas costeras en el área próxima a las descargas de ríos y decrecen hacia mar abierto; esta distribución se ha observado tanto en la columna de agua como en los sedimentos. La síntesis de los ácidos fenilcarboxílicos se produce en los cloroplastos, por lo que se puede afirmar que la biosíntesis de los fenoles está estrechamente vinculada con el proceso de la fotosíntesis y por ende con el grado de exposición a la luz solar de las plantas (Camacho, 2010).

Cuando se analizan los fenoles totales de las hojas de los ejemplares de *Smilax Campestris* Griseb, que crecen expuestos a una alta radiación solar presentan niveles que prácticamente duplican los hallados para las hojas de aquellos que se desarrollan en ambientes muy poco iluminados ($27,00 \pm 4,72$ mg ácido tánico/ g material seco y $15,09 \pm 3,27$ mg ácidotánico / g material seco, respectivamente) (Rugna, 2011).

La producción y liberación de los aleloquímicos por la planta está grandemente afectada por el medio ambiente (Kong *et al.*, 2002). Bajo condiciones aparentemente normales los aleloquímicos en las plantas pueden estar inactivos y las concentraciones pueden ser más o menos estables. Cuando las condiciones ambientales se convierten en estresantes para el desarrollo de la planta (déficit hídrico, radiaciones no óptimas UV, deficiencias minerales, salinidad excesiva, temperaturas extremas, etc.), se modifican los niveles de aleloquímicos, no solo aumentando estos, sino también, el grado de

fitotoxicidad (potencialidad) de los mismos. Además de esto, el estrés aumenta la susceptibilidad de las especies más sensibles a los aleloquímicos (Reigosa *et al.*, 1999; Zobel *et al.*, 2002; An, 2005; Leicach, 2005).

4.4. Efecto alelopático del extracto acuoso de *P. alliaceae* sobre el desarrollo de la enfermedad producida por *R. solani* y *S. rolfsii* en condiciones semicontroladas

4.4.1. Efecto del tratamiento a la semilla por inmersión en el extracto acuoso de *P. alliaceae* sobre *R. solani* y *S. rolfsii* en condiciones semicontroladas

El análisis del efecto del tratamiento a la semilla por inmersión (Figura 5) mostró para ambos hongos un crecimiento del microorganismo, con una Intensidad de Severidad de la Enfermedad (ISE) del 80 %, en el secado a la sombra.

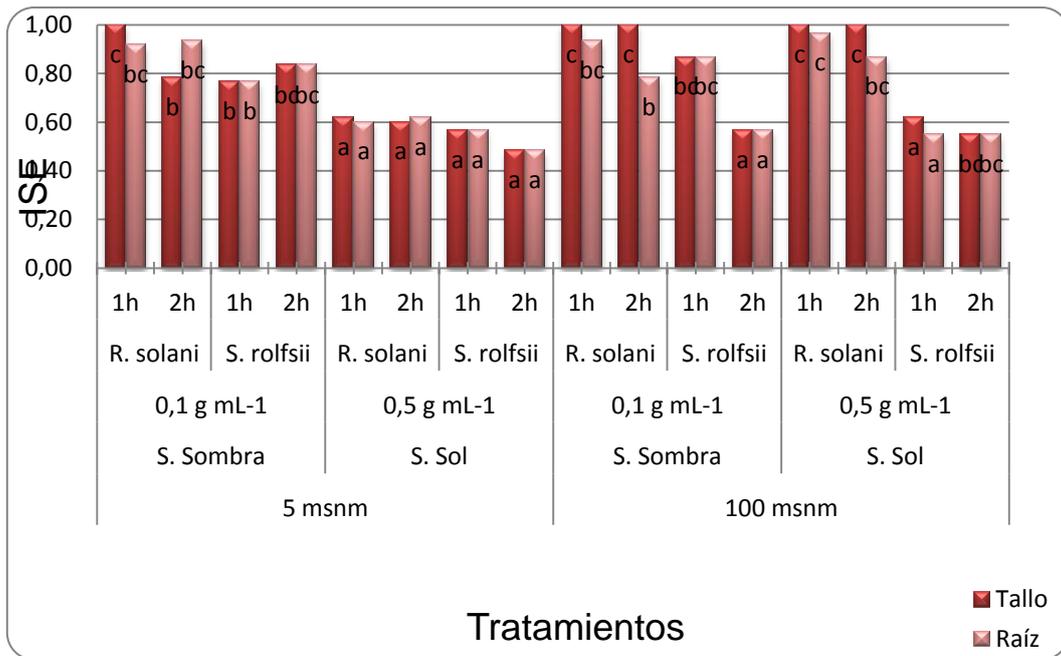
Para ambos hongos el material colectado a 5 msnm fue el de mejor resultados sin diferencias significativas entre los tiempos de extracción 1 h y 2 h.

Con *S. rolfsii* se obtuvieron resultados similares con el material colectado a 100 msnm a igual concentración, forma de secado y a 1 h de extracción.

De manera general *R. solani* presentó mayor sobrevivencia llegando a provocar damping-off pre-emergente en los tratamientos donde se aplicó la inmersión de la semilla con el material colectado a 100 msnm; no siendo así para el material colectado a 5 msnm donde la diferencia en cuanto a la severidad de la enfermedad fue significativa disminuyendo de 1 hasta 0,78 en el tallo.

Figura 5. Índice de severidad de la enfermedad en función de las afectaciones a la raíz y al tallo en el tratamiento de la semilla por inmersión

Entre las afectaciones de la raíz y el tallo no existieron diferencias significativas.



La eficiencia de los tratamientos se encontró en un rango entre 34 y 44 %, (Anexo 4), este se considera un valor medio.

Este resultado evidencia las diferencias que se pueden encontrar en la composición de los extractos según el lugar de crecimiento de las plantas. Bajo condiciones de alta salinidad y radiación solar se pueden generar una serie de metabolitos activos con el objetivo de preservar la integridad de las plantas ante dicho estrés, cuestión que no ocurre así en las plantas que se desarrollaron a mayor altura sobre el nivel del mar, las cuales estimularon el crecimiento de ambos hongos y por tanto las afectaciones al tallo y a la raíz fueron significativas.

El extracto de plantas colectadas a 100 msnm y secado a la sombra provocó afectaciones al tallo y a la raíz aunque en menor cuantía respecto de aquellas secadas al sol. Cabrera *et al.*, (2011) plantean que el secado a la sombra tiene una tendencia más conservativa respecto de la composición química original solo induce mecanismos de destrucción de sustancia mucho más violentos que conllevan a la formación de otras sustancias que originalmente no se encontraban en la planta.

Los aleloquímicos ingresan al suelo por diferentes vías, de modo que su toxicidad puede ser modulada por las características de este (textura, composición, cantidad de materia orgánica, fertilidad, pH, aireación y la microflora). Así, por ejemplo la aireación del suelo determina el nivel de

oxígeno en estos, lo cual influye en la cantidad y naturaleza de las toxinas producidas. En este caso, es posible que el tratamiento a la semilla por inmersión haya provocado modificaciones importantes en la estructura de las sustancias que se encuentran en el extracto, razón por la cual los resultados no fueron muy satisfactorios, principalmente para aquellos tratamientos de plantas secadas a la sombra.

4.4.2. Efecto del tratamiento por peletización de la semilla con el extracto acuoso de *P. alliaceae* sobre *R. solani* y *S. rolfsii* en condiciones semicontroladas

El análisis del efecto del tratamiento a la semilla por peletización con el extracto (Figura 6) reveló resultados significativos a la concentración de $0,5 \text{ g mL}^{-1}$ a partir del material secado al sol y colectados a 5 msnm.

La severidad de la enfermedad no presentó diferencias significativas entre los hongos y se encontró en un rango entre 0,5 – 0,55. La eficiencia del tratamiento varió entre 42 al 44 % (Anexo 4).

Al comparar estos resultados con el tratamiento de inmersión se evidencia que la peletización de la semilla con el extracto presenta mejores resultados con una eficiencia mayor y un menor ISE.

De forma similar a la inmersión *R. solani* obtuvo los mayores resultados en cuanto a la severidad de la enfermedad con el material secado a la sombra principalmente, o sea sobrevivió más, provocando mayores afectaciones al tallo y la raíz. En el caso de *S. rolfsii* la severidad de la enfermedad no sobrepasó del valor 0,8, por tanto lo eficiencia del tratamiento sobre este hongo fue mayor que sobre *R. solani* con valores entre 22 y 40 % (Anexo 4) .

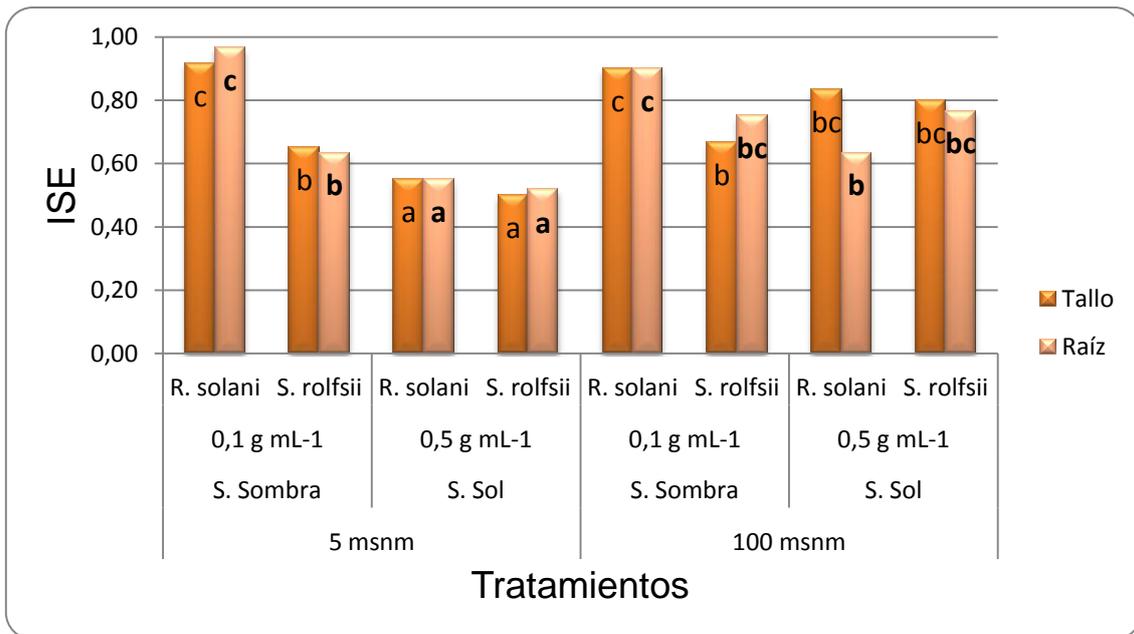


Figura 6. Índice de severidad de la enfermedad en función de las afectaciones a la raíz y al tallo en el tratamiento de la semilla por peletización con extracto

Según lo expuesto en el experimento anterior, se evidencia que la forma de entrada del aleloquímico al sistema es de vital importancia. En este caso la peletización surtió mejores efecto sobre los hongos, los ISE, en algunos casos no excedían de 0,6.

En relación a esto existen autores que señalan que la concentración y disponibilidad de aleloquímicos depende del equilibrio entre las velocidades con que estos son adsorbidos y liberados de las partículas de suelo u otros materiales. Este proceso, que ocurre en la superficie de esas partículas, depende del tamaño de ellas, de la acidez, de la cantidad de agua y del contenido de materia orgánica, entre otros (Leicach, 2005).

4.4.3. Efecto del tratamiento por peletización de la semilla con el material pulverulento de *P. alliaceae* sobre *R. solani* y *S. rolfsii* en condiciones semicontroladas

El análisis del efecto del tratamiento a la semilla por peletización con polvo (Figura 7) mostró resultados de similitud respecto a la peletización con el extracto

De forma general, al peletizar la semilla con el material secado a la sombra se produce un ISE alto con una eficiencia baja para ambos hongos, con independencia de la zona de colecta. Sin embargo el material secado al sol, provocó diferencias significativas con los ISE más bajos del estudio, (cercano a 0,4) y altas eficiencias.

Entre ambos hongos *R. solani* tuvo mayor resistencia al provocar de forma más severa la enfermedad respecto a *S. rolfsii*, aunque en algunos casos no existieron diferencias significativas entre ellos.

Con el material secado a la sombra las afectaciones a la raíz fueron estadísticamente similares, no hubo diferencias significativas entre las dosis de material vegetal en estudio (0,5 g y 1,0 g).

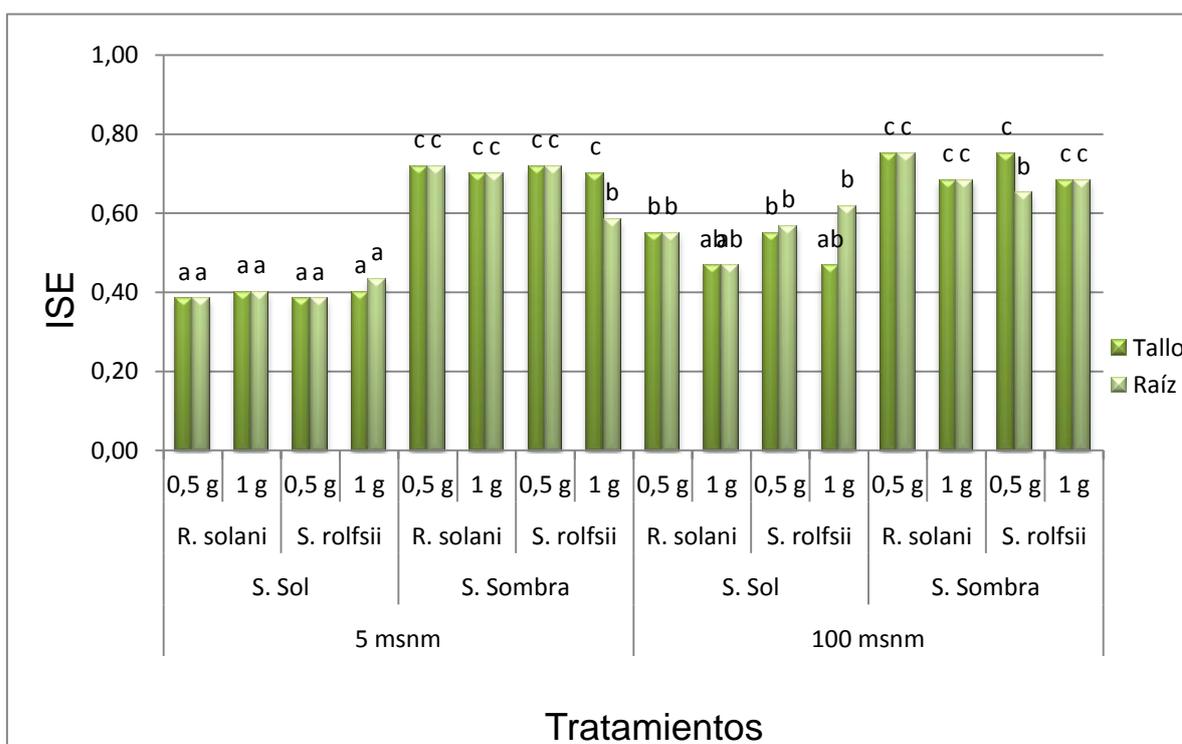


Figura 7. Índice de severidad de la enfermedad en función de las afectaciones a la raíz y al tallo en el tratamiento de la semilla por peletización con material pulverulento

La peletización de las semillas de frijol, una práctica ampliamente extendida en la provincia de Villa Clara, refuerza la acción e inhibe el desarrollo de hongos

patógenos del suelo, disminuye la mortalidad y estimula la germinación y el crecimiento de la planta (Hernández *et al.*, 2006).

Para que se produzca un efecto alelopático, tanto de carácter positivo como negativo, de acción directa o indirecta, de una especie sobre otra a través de la producción de compuestos químicos que se escapen al medio ambiente, se requiere que exista suficiente cantidad del compuesto alelopático (Espinosa, 2012). En tal caso la peletización con el material pulverulento permite una mayor persistencia de sustancias en el suelo, en concordancia, el aleloquímicos se encuentra en contacto directo y puede interactuar de alguna forma con la especie susceptible además por el tiempo necesario para ejercer su acción

Por otro lado, se reducen las modificaciones estructurales que puedan ocurrir al obtener los extractos de esta planta para el tratamiento de la semilla, en el caso de la Inmersión y peletización con el extracto. En este sentido es de importancia que las sustancias biológicamente activa queden de la forma más conservada respecto a su momento de síntesis en la planta, pues de tener efectos de interés se hace necesaria su identificación, mecanismos de acción y rutas de síntesis.

5. Conclusiones

1. Los niveles de TDS obtenidos mediante el método de secado a la sombra fueron superiores a los obtenidos en el secado al sol. Los mejores métodos de extracción fueron maceración en reposo 48 h, 72 h y con agitación a las 24 h.
2. El extracto acuoso de anamú inhibió *in vitro* el crecimiento micelial de *R. solani* y *S. rolfsii*, las mayores inhibiciones se obtuvieron con los extractos obtenidos de plantas secadas a la sombra a 5 msnm a las concentraciones a 50 % y 95 %.
3. El contenido de fenoles fue mayor en el material secado a la sombra. De igual forma las plantas colectadas a 450 msnm presentaron menor cantidad de este metabolito en comparación con las colectadas a 5 msnm.
4. El tratamiento de peletización con polvo presentó los resultados más favorables, con menores valores del ISE.

6. Recomendaciones

1. Para posteriores estudios no usar el secado al Sol debido a la disminución significativa de los metabolitos secundarios.
2. Utilizar la maceración en reposo durante 48 ó 72 h, pues en las condiciones de un productor agrícola estos métodos son más factibles.
3. Utilizar la concentración de 50 %, donde existieron las mayores inhibiciones de las especies en estudio.
4. Utilizar el tratamiento de la semilla con material pulverulento de *P. alliaceae*.

7. Referencias Bibliográficas

1. Alemán, M. (2013). Enfermedades fúngicas en variedades de maní en la localidad de Santa Clara, en época poco lluviosa. Tesis para aspirar al título de Ingeniero Agrónomo. UCLV. Santa Clara. Villa Clara.
2. Arévalo, R. A.; Bertoncini, E. I.; Aranda, E. M.; González, T. A. 2011. Alelopatía en *Saccharum* spp. (caña de azúcar). Avances en Investigación Agropecuaria, Universidad de Colima Colima, México vol. 15, núm. 1, pp. 51-60. Dirección electrónica: <http://www.redalyc.org/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=83717122004>
3. Argüello, E. V.; Yossen, E.; Conles, M. (2009). Efecto del extracto de puerro (*Allium porrum* L.) sobre la supervivencia de esclerocios de *Sclerotium cepivorum*. Agriscientia. vol. XXVI(1).
4. Arnold, R.W.G. 1986. Lista de hongos fitopatógenos de Cuba. Revisada y ampliada. Edit. Científica. Técnica. Ciudad de La Habana. Cuba. 206p.
5. Benacchio, S.; Mazzani, B. y Canache S. (2012). Estudio de algunas relaciones fenológico-ambientales en el cultivo del maní (*Arachis hypogaea*L.) sembrado en diferentes épocas, en Venezuela. Disponible en: http://www.redpav-fpolar.info.ve/agrotrop/v28_5/v285a006.html.
6. Bradley, C. A.; Hartman, G. L.; Nelson, R. L.; Müller, D. S.; Pedersen, W. L. (2001). Response of ancestral soybean lines and comercial cultivars to *Rhizoctonia solani* root and hypocotyls rot. Plant Disease. vol. 85: 1091-1095.
7. Beute, M. K. and Rodríguez-Kabana, R. 1981. Effects of soil moisture, temperature and field enviroment on survival of *S. rolfsii* in Alabama and North Carolina. Phytopathology 71:1293-1296.
8. Blum, L.; Kogan, M. (1992). Alelopathy in Plants. Allelopathy Journal. vol. 2(2): 162 - 163.

9. Borrás, O.; Pérez, M.; Nogueira, J. (1997). Empleo de *Trichoderma* sp en el control de la pudrición de la piña causada por *Phytophthora nicotianae* var *parasitica* en segmentos de tallos. Cuadernos de fitopatología. vol. 54: 148 - 149.
10. Borgognone, D.; Cardarelli, M.; Rea, E.; Lucini, L.; Colla, G. 2013. Salinity source induced changes in yield, mineral composition, phenolic acids and flavonoids of leaves in artichoke and cardoon grown in floating system. J. Sci. Food Agric. (en prensa).
11. Camacho, C. (2010). Compuestos fenólicos y el Medio Ambiente. Facultad de Agronomía. Centro de Tecnología Enzimática (CETENZ). Universidad de Matanzas "Camilo Cienfuegos". Vía Blanca Km.3, Matanzas, Cuba.
12. Colla, G.; Roupael, Y.; Cardarelli, M.; Svecova, E.; Rea, E.; Lucini, L. 2012. Effects of saline stress on mineral composition, phenolic acids and flavonoids in leaves of artichoke and cardoon genotypes grown in floating system. J. Sci. Food Agric. 93, 1119-1127.
13. Castillo, F.; Hernández F.D.; Gallegos G.; Flores A. (2015). Efectividad *in vitro* de *Bacillus* y polifenoles de plantas nativas de México sobre *Rhizoctonia solani*. *In vitro* effectiveness of *Bacillus* and polyphenols of native plants from Mexico on *Rhizoctonia-Solani*. *Campo Experimental Saltillo-INIFAP. Carretera Saltillo-Zacatecas, km 342+119, Núm. 9515, Buenavista, Saltillo, Coahuila.* (reyes.francisco@inifap.gob.mx). *Universidad Autónoma de Coahuila-Departamento de Investigación en alimentos, Facultad de Ciencias Químicas, 25000. Saltillo, Coahuila, México.*
14. CIAT. 1988. Pudriciones radicales del frijol y su control. Unidad Auditorial. Guía de estudio. 52 p. Resúmenes Analíticos sobre Frijol, Vol. XIII (1): 50.
15. Cupull, R.; Delgado, Y.; Cupull, M. d. C.; Andréu, C. M. (2003). Efecto de dos biopreparados y micorriza en la estimulación de la germinación, el

- control de *Rhizoctonia solani* y el desarrollo de posturas de *Coffea arabica* L. Centro Agrícola. vol. 2(1): 7.
16. Díaz, M. (2011). Incidencia de *Rhizoctonia spp.*, *Sclerotium rolfsii* y *Macrophomina phaseolina* en frijol común en Villa Clara. Bases para el manejo integrado. Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. Departamento de agronomía. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Santa clara.Villa Clara.
17. Drouhet, E.; B. Dupont; L. Improvisi; M. Viviani; A. Tortorano (1986). Disc agar diffusion and microplate automatized techniques for in vitro evaluation of antifungal agents on yeasts and sporulated pathogenic fung. En Iwata, K.;Vanden, H., In vitro and in vivo evaluation of antifungal agents. Elsevier Science Publishers. Amsterdam, 31-49 p.
18. Díaz, M.; Quintero, E.; Bernal, A.; Reinaldo, Y. (2005) Las enfermedades causadas por hongos del suelo en el cultivo del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) Centro Agrícola, año 32, no. 3. pp.43-45.
19. Espinosa, R. (2007). Efecto alelopático negativo de los metabolitos secundarios presentes en *Terminalia catappa* L., *Tagetes erecta* L. y *Tectona grandis* L. sobre los hongos *Rhizoctonia solani* Kühn y *Sclerotium rolfsii* Sacc. Tesis en opción al título de Máster en Agricultura Sostenible. Departamento de Agronomía. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Santa Clara. Villa Clara.
20. Espinosa, R. (2012). Efecto alelopático de *Terminalia catappa* L. sobre los hongos fitopatógenos del suelo *Rhizoctonia solani* Kühn. y *Sclerotium rolfsii* Sacc. Tesis en opción al título de Doctor en Ciencias Agrícolas. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Departamento de Agronomía. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Santa Clara. Villa Clara.
21. Espinosa ¹, R.; Bravo, L.; Herrera, L.; Ramos, Y. (2012). Efecto alelopático del almendro de la India (*Terminalia catappa* L.) sobre *Sclerotium rolfsii* Sacc. Revista Protección Vegetal. vol.27 no.3.¹ Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Carretera a Camajuaní

- km 5½. Santa Clara, Villa Clara, Cuba. Correo electrónico: rayer@uclv.edu.cu.
22. FAO, (2010). El cultivo del frijol, historia e importancia. Importancia de los cultivos representados por FENALCE, pp. 30-31.
23. FAO, (2012) Aumenta la producción agrícola en Cuba pero desciende la producción ganadera. AGRONoticias América Latina y el Caribe: Radio Nederland. Correo electrónico: <http://www.rnw.nl/espanol/bulletin/produccion-agricola-cubana-crecio-10-pero-la-ganadera-cay-casi-12>
- Fernández, C. M.; M. González; M. T. Illnait; G. Martínez (1998). Determinación de la concentración mínima inhibitoria de anfotericina B en levaduras de interés médico. Rev Cubana Med Trop. vol. 50(1).
24. Finar, H.; T. Jergo (2006). Constitución química de diferentes plantas perteneciente al género *Solanaceae* en zonas características de México. Interciencia. vol. 30(2).
25. Fernández, C.L. (2010). Efecto del genotipo y la fertilización en las afectaciones causadas por hongos del suelo en el cultivo del frijol común. Tesis de Diploma. Departamento de Agronomía. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Santa Clara. Villa Clara.
26. García, N.B. (2014). Selección de cepas de actinomicetos para el control de *Rhizoctonia solani* Kühn, *Sclerotium rolfsii* Sacc., *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. y *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, en frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). Tesis de Diploma. Departamento de Biología. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Santa Clara. Villa Clara.
27. González, A. Mirta. 1988. Enfermedades fungosas de frijol en Cuba. Edit. Cient. Técn. La Habana. 152 p.
28. González, N. 2012. Enfermedades fúngicas del maní (*Arachis hypogaea* L.) en época lluviosa, en la localidad Vueltas. Tesis para aspirar al título de Ingeniero Agropecuario. UCLV. Santa Clara. Villa Clara. 25 p.

29. Goulart, A.C. P. 1986. Doenças do feijoeiro na região norte do Minas Gerais. *Fitopatologia Brasileira* 13(3): 230-232. Resúmenes Analíticos sobre Frijol XV (2): 97.
30. Hernández, M.; Torres, S.; Hernández, R. (2010). Alelopatía de *Wedelia trilobata* (L.) Hitchc. e *Ipomoea batatas* (L.) Lam. sobre malezas y cultivos hortícolas. UNIVERSIDAD CENTRAL "MARTA ABREU" DE LAS VILLAS. DEPARTAMENTO DE AGRONOMÍA
31. Herrera, L. (2004). Los hongos fitopatógenos de los suelos tropicales y subtropicales. Tesis Doctoral. Departamento de Agronomía. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Santa Clara. Villa Clara.
32. Jiménez, Y. (2004). Respuesta de los hongos fitopatógenos del suelo *Phytophthora nicotianae* var *parasitica* Water y *Rhizoctonia solani* Kühn ante la aplicación de diferentes extractos naturales de origen vegetal. Tesis de Diploma. Departamento de Agronomía. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Santa Clara. Villa Clara.
33. Lehninger, A. (2016). Principios de Bioquímica. 6^{ta} Edición edición. 1013p.
34. Leicach, S. (2005). Alelopatía, estrategias defensivas de las plantas. vol. 15(89). Ciencia Hoy. Revisado: Dirección electrónica: <http://www.cienciahoy.org.ar/ln/hoy89/alelopatia.htm>.
35. Li., S.; Zhizhen, Z.; Cain, A.; Wang, B.; Lon, M.; Taylor, J. 2005. Antifungal activity of camptothecin, trifolin and hyperoside isolate from *Campotheca acuminata*. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 53(1), 32-37.
36. Keijer, J.; Korman, M. G.; Dulleman, A. M.; Houterman, P. M.; de Bree, J.; Van Silfhout, C. H. (1997). In vitro analysis of host plant specificity in *Rhizoctonia solani*. *Plant Pathology*. vol. 46: 655-669.
37. Lorenzo, P.; González, L. (2010). Alelopatía: una característica ecofisiológica que favorece la capacidad invasora de las especies vegetales. *Ecosistemas*. vol. 19(1): 79 - 91.

38. Martín, T. E. (2001). Estrategia de lucha para el control de *Sclerotium rolfsii* Sacc. en una agricultura sostenible. Tesis para optar por el título de Máster en Agricultura Sostenible. Departamento de Agronomía. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Santa Clara. Villa Clara.
39. Macnish, G.C. and Neate, S.M. 1996. *Rhizoctonia* bare patch of cereals. An Australian Perspective. Plant Disease 80(9):965-971.
40. March, G. J. y Marinelli, A. 1995. Enfermedades del maní y sistema productivo. Maní: Avances en Investigación, 2: 5-18.
41. Mandal, S, Chakraborty D y Dey S 2010. Phenolic acids act as signaling molecules in plant-microbe symbioses. Department of Biotechnology; Indian Institute of Technology.
42. Madhu, D.; Rekha, H. S.; Shylaja, M. D.; Prakash, H. S.; Shekar Shetty, H. (2011). Biochemical events involved in downy mildew disease resistance in pearl millet in relation to H⁺-ATPase. Archives of Phytopathology and Plant Protection. vol. 44 (1): 17-27.
43. Mayea, S.; Padrón, J. (1983). Bacterias y hongos fitopatógenos. Edit. Pueblo y Educación. edición. Ciudad de la Habana. Cuba.
44. Meloni, D. A.; Gulotta, M. R.; Oliva Cano, M. A. (2008). El estrés salino incrementa la actividad de enzimas antioxidantes y la concentración de fenoles en Vinal (*Prosopis ruscifolia* G.). Revista de Ciencias Forestales – Quebracho N° 15
45. Mishra J., Sing. R.D., Jadon V., Gausain M. 2010. Assessment of phenolic components and antioxidative activities of *Phaseolus vulgaris*. L. International Journey of Integrative Biology. IJIB. 2010. Vol. 9. No. 1:26-30.
46. Muñoz, I. (2011). Evaluación de los contenidos metabólicos en cultivos de células de *Petiveria aliacea* L. (anamú). Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de Magíster en Ciencias. Universidad Nacional de Colombia Facultad de Ciencias Medellín, Colombia.

- Revisado el 4 de febrero de 2016. Disponible en:
<http://www.bdigital.unal.edu.co/6039/1/75098061.2011>.
47. Narwal, S. S. (1996). Suggested methodology for allelopathy laboratory bioassay. En Narwal, S.; Qasem, J., *Allelopathy: Field Observation and Methodology*. Scientific Publisher. Joudpur. India, 255-265 p.
48. National Committee for Clinical Laboratory Standards. (1992). Document M27-P. Reference methods for broth dilution antifungal susceptibility testing for yeast: proposed standard. . Villanova.
49. Nerey, O. Y. (2009). Characterization, pathogenicity and control of *Rhizoctonia spp.* associated with bean in Cuba soils. Tesis en opción al título en Doctor en Ciencias Biológicas Aplicadas. Departamento de Protección de Plantas. Universidad de Gent. Gent. Bélgica.
50. Nelson, E. (2004). "Biology, Ecology and Allelopathy." *Ecology Journal*. Revisado: 30 de mayo, de 2004. Dirección electrónica: http://www.bioworks.net.biocontro/control_325.htm.
51. Niñirola, D.; Conesa, C.; Fernández, J.A. (2015). *Influencia de la salinidad de la solución nutritiva en la calidad y producción de dos cultivares de lechuga babyleaf*. Producción Vegetal, UPCT, email: juan.fernandez@upct.es
52. Oliveros, A.; Macías, F.; Carrera, C.; Marín, D. 2009. Exudados de la raíz y su relevancia actual en las interacciones alelopáticas. Departamento de Química-Grupo de Química Ecológica, Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes, Mérida 5101-A, Venezuela. *Quim. Nova*, Vol. 32, No. 1, 198-213.
53. Pandino, G.; Courts, F.L.; Lombardo, S.; Mauromicale, G.; Williamson, G. 2010. Caffeoylquinic acids and flavonoids in the immature inflorescence of globe artichoke, wild cardoon, and cultivated cardoon. *J. Agric. Food Chem.* 58, 1026-1031.
54. Pandey, M.; Pandey R.; Singh, V.; Pandey V.; Singh, U. 2002. Antifungal activity of 4'-dymethoxyisoplavone against some fungi. *Microbiology* 30(1), 55-56.

55. Pino, O.; Sánchez, Y.; Rojas, M.M. 2013. Plant secondary metabolites as alternatives in pest management. II: An overview of their potential in Cuba. Grupo de Plagas Agrícolas, Dirección de Sanidad Vegetal, Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA) Mayabeque, Cuba. Rev. Protección Veg. Vol. 28 No. 2. pp. 95-108. Correo electrónico: oriela@censa.edu.cu
56. Puente, M. (2007). Efecto de diversos extractos de plantas sobre los hongos fitopatógenos del suelo *Rhizoctonia solani* Kühn y *Sclerotium rolfsii* Sacc. Tesis en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. Departamento de Agronomía. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Santa Clara. Villa Clara.
57. Pupo Y. 2010. Selección de extractos vegetales para el control de la alternariosis en *Solanum lycopersicum* L. y *Allium cepa* L. Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. Universidad de Granma. Cuba. 92 p.
58. Prasad K and Weigle J. L. 1975. Relation of phenil alanine ammonia lyase activity and phaseolin content with resistance to *Rhizoctonia solani* in *Phaseolus vulgaris* L. Proceedings, American Phytopathology Society, 2:49.
59. Robaina, M. (2004). Respuesta de los hongos fitopatógenos del suelo *Sclerotium rolfsii* Sacc. y *Fusarium oxysporum* Slecht. ante la aplicación de diferentes extractos naturales de origen vegetal. Tesis de Diploma. Departamento de Agronomía. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Santa Clara. Villa Clara.
60. Rugna, A. (2011). Efectos de la Radiación Solar sobre la Producción de Polifenoles en Ejemplares Femeninos de *Smilax Campestris* Griseb. *Latin American Journal of Pharmacy* (formerly *Acta Farmacéutica Bonaerense*) *Lat. Am. J. Pharm.* 26 (3): 420-3
61. Sampietro, D. A. (2003). Definición de alelopatía. Futuro Verde. Revisado: 10 de noviembre, 2003. Dirección electrónica: http://www.pwp.007mundo.com/futuroverde/documentos_658.htm

62. Sariego, S.; Marin, J.E.; Ochoa, A.; Rivero, A. (2015). Determinación de metales, fenoles totales y flavonoides totales en extractos de las hojas de *Petiveria alliacea* L. (anamú). Departamento de Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias Agrícolas. Universidad de Granma, Km 17½ carretera a Manzanillo. Peralejo, Bayamo. Granma. Cuba. (jmarin74@yahoo.es)
63. SENASA (2012) *Sistema Nacional de Vigilancia y Monitoreo de Plagas*. Dirección electrónica: <http://www.sinavimo.gov.ar/plaga/sclerotium-rolfsii>
64. Seidel, D. 1976. Lista preliminar de hongos fitopatógenos de Cuba. I.C.L. 186 p.
65. Stefanova, M. (2007). Introducción y eficacia técnica del biocontrol de fitopatógenos con *Trichoderma spp.* en Cuba. Fitosanidad vol. 11, no. 3, Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. Ciudad de La Habana, mstefanova@inisav.cu
66. Stryer, L. (2004). Biochemistry. Ed. W. H. Freeman and Company. Tercera Edición edición. New York. 1089 pp.
67. Teixeira, M.; Carvalho, I.S. 2008. Effects of salt stress on purslane (*Portulaca oleracea*) nutrition. Ann. Appl. Biol. 154, 77-86.
68. Telek, L.; Freytag, G.F. 1985. Componentes fenólicos de las testas del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). In: Programa Cooperativo Centroamericano para el Mejoramiento de Cultivos Alimenticios PCCMCA. Reunión Anual (27, 1981, Santo Domingo, República Dominicana). Memorias.
69. Townsend, G.; Heuberger, J. (1943). Methods for estimating losses caused by disease in fungicide experiments. Plant Disease. vol. 24: 340-343.
70. Ulloa, JA, Rosas-Ulloa P, Ramírez JC y Ulloa BE 2011. El frijol (*Phaseolus vulgaris*): su importancia nutricional y como fuente de fitoquímicos. Revista Fuente. 3(8): 5-9.

71. Vaillant D., Romero C., Ramos E., González M., Ramírez R. y González J. 2008. Efecto Inhibitorio de cinco monoterpenos sobre un aislado de *Rhizoctonia solani* en papa (*Solanum tuberosum* L.). Fitosanidad Vol 12. No 3. Pags.197-200. INISAV. Cuba.
72. Valares, C. (2011). Variación del metabolismo secundario en plantas debida al genotipo y al ambiente. Universidad de Extremadura departamento de Biología Vegetal, Ecología y Ciencias de la Tierra. Tesis para optar por el Grado de Doctora en Ciencias por la Universidad de Extremadura. Revisado el 25 de mayo de 2016. Disponible en: <http://www.unex.es/publicaciones>
73. Vidal L. 2002. Aislamiento y cuantificación de catequinas involucradas con la compatibilidad en injertos de guanábano (*Annona muricata*). Tesis de Doctorado. Universidad de Colima, México
74. Zamora, 2005. Perfil de Alcaloides de Semillas de *Lupinus exaltatus* Zucc. (Fabaceae) y la Evaluación Antifúngica del Extracto. Alcaloideo y Lupanina contra Fitopatógenos Revista Mexicana de Fitopatología, vol. 23, núm. 2, julio - diciembre, 2005, pp. 124-129, Sociedad Mexicana de Fitopatología, A.C. México. Dirección electrónica: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61223203>
75. Zamora-Natera J. F., Bernal-Alcocer A., Ruiz-López M., Soto-Hernández M. Escalante-Estrada A. y H. Vibrans-Lindemann. 2005. Perfil de Alcaloides de Semillas de *Lupinus exaltatus* Zucc. (Fabaceae) y la Evaluación Antifúngica del Extracto Alcaloideo y Lupanina contra Fitopatógenos. Revista Mexicana de Fitopatología. 4(23):124-129.
76. Zamora, F.; García, P.; Ruiz, M. (2008). Composición de alcaloides en semillas de *Lupinus mexicanus* (Fabaceae) y evaluación antifúngica y alelopática del extracto alcaloideo. Agrociencia. vol.42 no.2 México feb. /mar. ISSN 1405-3195

8. Anexos

Anexo 1. Fotografía de *P. alliaceae* (anamú) en su colecta.



Anexo 2. Tamizaje Fitoquímico del extracto acuoso de *P. alliaceae*.

A. Ensayo de Dragendorff y Mayer (Alcaloides); B. Ensayo de Espuma (Saponinas), C. Ensayo de Fehling (Carbohidratos reductores) y D. Ensayo de Cloruro férrico (Fenoles y/o Taninos).



A

B

C

D

Anexo 3. Cuantificación de fenoles totales

Tabla 1. Curva de calibración

C(x) mg/L	Rep1	Rep2	Rep3	Rep4	Rep5	Media
5	0.206	0.201	0.199	0.209	0.215	0.206
10	0.419	0.425	0.413	0.450	0.446	0.419
15	0.654	0.632	0.641	0.657	0.620	0.642
20	0.839	0.856	0.819	0.861	0.875	0.838
Coeficiente de determinación (r) 0.9996						
Coeficiente de correlación (r2) 0.9993						

Tabla 2. Coeficiente de variación de los factores de respuesta

C(P)	f-Rep1	f-Rep2	f-Rep3	f-Rep4	f-Rep5
5	0.041	0.040	0.040	0.042	0.043
10	0.042	0.043	0.041	0.045	0.045
15	0.044	0.042	0.043	0.044	0.041
20	0.042	0.043	0.041	0.043	0.044
Media	0.042	0.042	0.041	0.043	0.043
desvEst	0.0010	0.0012	0.0012	0.0013	0.0014
CVf	2.414	2.794	2.934	3.091	3.216
media	2.890	< 5%	ok		

Tabla 3. Desviación estándar relativa de la pendiente

C(P)	Rep1	Rep2	Rep3	Rep4	Rep5	media
5	0.206	0.201	0.199	0.209	0.215	0.206
10	0.419	0.425	0.413	0.450	0.446	0.431
15	0.654	0.632	0.641	0.657	0.620	0.641
20	0.839	0.856	0.819	0.861	0.875	0.850
Pendiente	0.0427	0.0434	0.0418	0.0433	0.0431	0.0428
Desvstd b	0.0007					
Sbrel (%)	1.5596	<2%	ok			

Anexo 4 Eficiencia de los tratamientos

Eficiencia del tratamiento a la semilla por inmersión																					
Tallo										Raíz											
escala	5 msnm				100 msnm				Test	Test	escala	5 msnm				100 msnm				Test	Test
	S. Sombra		S. Sol		S. Sombra		S. Sol					S. Sombra		S. Sol		S. Sombra		S. Sol			
	0,1 g mL ⁻¹		0,5 g mL ⁻¹		0,1 g mL ⁻¹		0,5 g mL ⁻¹		Agua			0,1 g mL ⁻¹		0,5 g mL ⁻¹		0,1 g mL ⁻¹		0,5 g mL ⁻¹			
	1h	2h	1h	2h	1h	2h	1h	2h	1h	2h		1h	2h	1h	2h	1h	2h	1h	2h	Agua	Sc
R. s	0.00	21.67	38.33	40.00	0.00	0.00	0.00	0.00	100.00	0.00	R. s	6.78	5.08	38.98	37.29	5.08	20.34	1.69	11.86	100.00	0.00
S. r	11.54	3.85	34.62	44.23	0.00	34.62	28.85	36.54	100.00	0.00	S. r	4.17	-4.17	29.17	39.58	-8.33	29.17	31.25	31.25	100.00	0.00
Eficiencia del tratamiento a la semilla por peletización con el extracto																					
Tallo										Raíz											
escala	5 msnm				100 msnm				Test Agua	Tes	escala	5 msnm				100 msnm				Test Agua	Test
	S. Sombra		S. Sol		S. Sombra		S. Sol					S. Sombra		S. Sol		S. Sombra		S. Sol			
	0,1 g mL ⁻¹		0,5 g mL ⁻¹		0,1 g mL ⁻¹		0,5 g mL ⁻¹					0,1 g mL ⁻¹		0,5 g mL ⁻¹		0,1 g mL ⁻¹		0,5 g mL ⁻¹			
R. s	3.51	42.11	5.26	12.28	100.00	0.00	R. s	1.69	44.07	8.47	35.59	100.00	0.00								
S. r	22.00	40.00	20.00	4.00	100.00	0.00	S. r	16.95	28.81	5.08	3.39	81.36	0.00								
Eficiencia del tratamiento a la semilla con polvo																					
Tallo										Raíz											
escala	5 msnm				100 msnm				Test	Test	escala	5 msnm				100 msnm				Test	Test
	S. Sol		S. Sombra		S. Sol		S. Sombra					S. Sol		S. Sombra		S. Sol		S. Sombra			
	0,5 g	1 g				0,5 g	1 g														
R. s	56.60	54.72	18.87	20.75	37.74	47.17	15.09	22.64	100.00	0.00	R. s	56.60	54.72	18.87	20.75	37.74	47.17	15.09	22.64	100.00	0.00
S. r	60.34	58.62	25.86	27.59	43.10	51.72	22.41	29.31	100.00	0.00	S. r	60.34	55.17	25.86	39.66	41.38	36.21	32.76	29.31	100.00	0.00