



UNIVERSIDAD CENTRAL "MARTA ABREU" DE LAS VILLAS  
VERITATE SOLA NOBIS IMPONETUR VIRILISTOGA. 1948

Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas  
Facultad de Ciencias Agropecuarias  
Departamento de Biología

## *Tesis de Diploma*

**Actividad antifúngica *in vivo* de extractos de *Citrus reticulata* Blanco y *Citrus aurantiifolia* (Christm.) Swingle frente a *Passarola fulva* (Cooke) U. Braun & Crous**

Autor: Yasenia Ramírez Pérez

Tutores: MSc. Katia Ojito Ramos

Lic. Dianella Iglesias Rodríguez

Santa Clara

2013



*...él que comenzó en vosotros la buena obra  
la perfeccionará hasta el día de Jesucristo.*

*Fil. 1:6*



*A Dios por su inmenso amor y misericordia para  
conmigo y a mi familia por su apoyo incondicional*



## ***Agradecimientos***

*Le agradezco a Dios la oportunidad de estudiar esta carrera donde he podido descubrir todas las cosas perfectas que ha hecho, no solo a nosotros los hombres sino a todo lo hermoso que nos rodea, además le agradezco nunca haberme abandonado y amarme de una manera incondicional.*

*Quiero agradecerle a mi familia por todo su apoyo y todos los sacrificios que tuvieron que hacer para que pudiera tener una excelente educación y el hecho de haberme graduado se lo debo todo a ellos.*

*A mi abuelo Guayo porque aunque él no está aquí ahora yo sé hoy estaría más que orgulloso de mí.*

*A Mima por ser la mejor abuela de todas y por nunca dejarme sola en esta carrera que es la vida y además por su toda su dedicación a lo largo de mis 23 años.*

*A mi papá porque sin él nunca hubiera podido realizar este sueño, además por apoyar todas mis decisiones y estar siempre allí para mí.*

*A mi mamá por confiar en mí y darme todo su apoyo.*

*A Julín por brindarme tanto cariño y comprensión durante estos años, por estar a mi lado en tiempos difíciles y por hacerme sonreír cuando más lo necesitaba.*

*A mis hermanos por ser tan especiales, ayudarme y apoyarme tanto.*

*A mi tía Odalys por escucharme tantas veces cuando he estado desanimada y ver la parte positiva de todas las cosas que vienen a nuestra vida.*

*A mis primas Irina y Aniris por trasmitirme alegría, animarme y por su cariño.*

*A mis tutoras Katia y Dianella por toda su ayuda y paciencia para conmigo, por aguantar todas mis quejas y haberme dado la oportunidad de trabajar con ustedes,*



*realmente lo he disfrutado muchísimo no solo por el trabajo sino porque considero que son bien especiales y un ejemplo para mí, de esfuerzo y superación.*

*Le agradezco a Dios por poner a mi lado a personas tan especiales como Elizabeth, Yohana, Alejandro, Juan Miguel, El Chino y David porque han sido los mejores amigos que se pueden tener, me han apoyado cuando las cosas se han puesto feas, me han escuchado reír y llorar, me han apoyado y han sido sinceros conmigo cuando me he equivocado, gracias por confiar en mí y por estar a mi lado no importa la situación.*

*A toda la familia de Julín por toda su ayuda en especial a su papá Julio por ayudarnos con las plantas de tomate, el transporte y la estancia en Sancti Spiritus durante el tiempo que duró el experimento .*

*A todos mis compañeros porque de una forma u otra hemos compartido por cinco años y eso nunca se olvida, en especial quiero agradecerle a Dayko, Maire, Dayana, Yoana y Frank por ser los mejores compañeros de estudio y porque se han ganado un lugar importante en mi vida con su cariño y comprensión para conmigo y a Damylsa mi eterna compañera de viajes.*

*Le agradezco a todos los profesores de la carrera que me han ayudado a superar estos cinco años y en la realización de esta tesis, en especial a Orelvis Portal, René Cupull y Venancio*

*A Luis el chofer de la Reina de la Noche por su amabilidad y por traerme sin falta todos los lunes y miércoles la tan esperada comida.*

*A TODOS, MI MÁS SINCERO AGRADECIMIENTO*



## Resumen

*Lycopersicon esculentum* Mill. (1768) [syn. *Solanum lycopersicum* L. (1753)] es un cultivo hortícola priorizado debido a su importancia en la dieta de la población mundial. El moho de las hojas producido por *Passalora fulva* es una de las principales enfermedades fungosas de la producción del cultivo protegido de tomate en Cuba, afectando la superficie foliar de la planta. El control de esta enfermedad se lleva a cabo con fungicidas sintéticos que causan graves daños al ambiente y la salud humana. Por lo tanto, resulta necesario la búsqueda de estrategias de control ecológicas y con un máximo de efectividad, entre las que se encuentran el uso de extractos vegetales. Las plantas del género *Citrus* son ricas en compuestos bioactivos entre los que se destacan, por su actividad antifúngica, los compuestos fenólicos. Estudios realizados con extractos de hojas de *C. aurantiifolia* en etanol 70% y *C. reticulata* en metanol 70% frente a *P. fulva*, han demostrado la actividad antifúngica *in vitro*, la cual se debe fundamentalmente a la presencia de compuestos fenólicos. El objetivo de nuestro trabajo fue determinar la actividad antifúngica *in vivo* de extractos hidroalcohólicos de *C. aurantiifolia* y *C. reticulata* frente a *P. fulva*. Los extractos se obtuvieron por extracción asistida por ultrasonido y se cuantificó el contenido de fenoles totales. Se estandarizó la forma de inóculo infectivo; se determinó la efectividad de los extractos en condiciones no controladas y su efecto sobre la microbiota del suelo. En los extractos se cuantificaron concentraciones de fenoles totales superiores a los 195 mg equivalentes de ácido gálico/mL de extracto. El extracto de *C. reticulata* en metanol 70% inhibió el desarrollo de *P. fulva* cuando se aplicó a las 48 h y a las 24 y 48 h de inoculación con el patógeno. El extracto de *C. aurantiifolia* en etanol 70% inhibió el desarrollo del hongo a las 24 h antes de la inoculación con el patógeno, y a las 24 y 48 h post-inoculación. Los dos extractos evaluados no presentaron efectos negativos sobre la microbiota del suelo. El estudio realizado demostró que el uso de extractos de *C. reticulata* y *C. aurantifolia* constituye una alternativa efectiva para el control de *P. fulva* en plantas de tomate.

**Palabras claves:** actividad antifúngica, *C. reticulata*, *C. aurantifolia*, *Passalora fulva*, tomate



## Abstract

*Lycopersicon esculentum* Mill. (1768) [syn. *Solanum lycopersicum* L. (1753)] is a prioritized horticultural crop because of its importance in the diet of the world's population. The leaf mould produced by *Passalora fulva* is a major fungal disease of greenhouse tomato production in Cuba, affecting the leaf surface of the plant. The control of this disease is conducted with synthetic fungicides which cause serious damages to the environment and human health. Therefore, it is necessary to look for friendly environmental control strategies with maximum of effectiveness, among which are the use of plant extracts. *Citrus* plants are rich in bioactive compounds among which stand out, for their antifungal activity, the phenolic compounds. Studies with leaf extracts of *C. aurantiifolia* in 70% ethanol and *C. reticulata* in 70% methanol against *P. fulva*, have demonstrated *in vitro* antifungal activity, which is mainly due to the presence of phenolic compounds. The aim of our study was to determine the *in vivo* antifungal activity of hydroalcoholic extracts of *C. aurantiifolia* and *C. reticulata* against *P. fulva*. The extracts were obtained by ultrasonic assisted extraction and quantified the total phenolic content. It was standardized the form of infective inoculum; it was determined the effectiveness of the extracts under uncontrolled conditions and its effect on soil microbiota. In the extracts were quantified total phenols concentration greater than 195 mg gallic acid equivalents / mL of extract. The *C. reticulata* extracts in 70% methanol inhibited the *P. fulva* growth when applied at 48 h and at 24 and 48 h after inoculation with the pathogen. The *C. aurantiifolia* extracts in 70% ethanol inhibited the fungal growth at 24 h before pathogen inoculation, and 24 and 48 h post-inoculation. Both plant extracts evaluated showed no negative effects on soil microbiota. The study showed that the use of *C. reticulata* and *C. aurantifolia* extracts constitutes an effective alternative for the control of *P. fulva* in tomato plants.

**Keywords:** antifungal activity, *C. reticulata*, *C. aurantifolia*, *Passalora fulva*, tomato



## Índice

1. Introducción.....	1
2. Revisión Bibliográfica.....	3
2.1 <i>Lycopersicum esculentum</i> Miller.....	3
2.1.1 Ubicación taxonómica, origen y distribución.....	3
2.1.2 Descripción morfológica.....	3
2.1.3 Generalidades sobre el cultivo de tomate.....	4
Generalidades de la siembra de tomate.....	4
Sistemas de siembra.....	5
Exigencias ecológicas.....	6
2.1.4 Características de los híbridos empleados en Cuba para el cultivo de tomate.....	6
2.1.5 Importancia económica.....	7
2.1.6 Enfermedades de origen fúngico que afectan el cultivo del tomate.....	8
2.1.6.1 <i>Passarola fulva</i> (Cooke) U. Braun & Crous 2003.....	8
Descripción morfológica.....	8
Mecanismos de patogenicidad y sintomatología.....	9
Estrategias de control.....	10
2.2 Antecedentes del uso de extractos vegetales como estrategia de control ante enfermedades fúngicas.....	12
2.2.1 Uso de extractos vegetales obtenidos de <i>Citrus</i> spp como fuente de compuestos con actividad antifúngica.....	19
2.3 Métodos de determinación de la actividad antifúngica <i>in vivo</i> .....	20
2.3.1 Material vegetal.....	20
2.3.1.1 Material de partida.....	21
2.3.1.2 Sustratos empleados.....	21
2.3.2 Preparación del inóculo infectivo.....	21
2.3.2.1 Métodos de inoculación.....	21
2.3.3 Evaluación de los resultados.....	22
3. Materiales y Métodos.....	23
3.1 Obtención de extractos hidroalcohólicos de <i>C. reticulata</i> y <i>C. aurantiifolia</i> .....	23
3.2 Cuantificación del contenido de fenoles totales.....	23
3.3 Determinación de la actividad antifúngica <i>in vivo</i> de extractos hidroalcohólicos de hojas <i>C. reticulata</i> y <i>C. aurantiifolia</i> .....	23
3.3.1 Estandarización del uso del inóculo infectivo de <i>P. fulva</i> para la determinación de la actividad antifúngica <i>in vivo</i> de extractos hidroalcohólicos de <i>C. reticulata</i> y <i>C. aurantiifolia</i> en plantas de tomate.....	24
Obtención de la suspensión de conidios.....	24
Preparación de la suspensión de propágulos.....	25
Realización del bioensayo.....	25
3.3.2 Determinación de la efectividad de los extractos hidroalcohólicos de <i>C. reticulata</i> y <i>C. aurantiifolia</i> frente a <i>P. fulva</i> en plantas de tomate en condiciones no controladas.....	25
3.4 Determinación del efecto de los extractos hidroalcohólicos de <i>C. reticulata</i> y <i>C. aurantiifolia</i> en la microbiota del suelo.....	26



3.5 Procesamiento estadístico.....	27
4. Resultados.....	29
4.1 Obtención de extractos hidroalcohólicos de hojas de <i>Citrus reticulata</i> y <i>Citrus aurantiifolia</i> .....	29
4.2 Contenido de fenoles totales.....	29
4.3 Actividad antifúngica <i>in vivo</i> de extractos de hojas de <i>C. reticulata</i> y <i>C. aurantiifolia</i> .....	29
4.3.1 Estandarización del uso del inóculo infectivo para la determinación de la actividad antifúngica <i>in vivo</i> de extractos hidroalcohólicos de <i>C. reticulata</i> y <i>C. aurantiifolia</i> en plantas de tomate.....	29
4.3.2 Efectividad de los extractos hidroalcohólicos de <i>Citrus reticulata</i> y <i>Citrus aurantiifolia</i> frente a <i>P. fulva</i> en plantas de tomate en condiciones no controladas.....	30
4.4 Efecto de los extractos hidroalcohólicos de <i>Citrus reticulata</i> y <i>Citrus aurantiifolia</i> en la microbiota del suelo.....	33
5. Discusión.....	39
5.1 Obtención de extractos hidroalcohólicos de hojas de <i>C. reticulata</i> y <i>C. aurantiifolia</i> .....	39
5.2 Cuantificación del contenido de fenoles totales.....	39
5.3 Determinación de la actividad antifúngica <i>in vivo</i> de extractos hidroalcohólicos de hojas de <i>Citrus reticulata</i> y <i>Citrus aurantiifolia</i> .....	41
5.3.1 Estandarización del uso del inóculo infectivo para la determinación de la actividad antifúngica <i>in vivo</i> de extractos hidroalcohólicos de <i>C. reticulata</i> y <i>C. aurantiifolia</i> en plantas de tomate.....	41
5.3.2 Determinación del efecto de los extractos hidroalcohólicos de <i>Citrus reticulata</i> y <i>Citrus aurantiifolia</i> en plantas de tomate <i>in vivo</i> en condiciones no controladas.....	42
5.4 Determinación del efecto de los extractos hidroalcohólicos de <i>Citrus reticulata</i> y <i>Citrus aurantiifolia</i> en la microbiota del suelo.....	44
6. Conclusiones.....	46
7. Recomendaciones.....	47
Bibliografía	
Anexos	



## 1. Introducción

El tomate es uno de los cultivos hortícolas más importantes del mundo (Toledo *et al.*, 2012) debido a su papel en los hábitos alimenticios de una amplia parte de la población mundial (Florido *et al.*, 2008). Actualmente existe una demanda social por parte de países desarrollados y en vías de desarrollo de alimentos con un mayor contenido en elementos nutritivos, lo que ha favorecido un aumento considerable en la producción de tomate (Escobar *et al.*, 2012)

La producción de esta hortaliza se localiza en zonas donde el verano se extiende por un largo período del año y en donde el invierno se caracteriza por abundantes precipitaciones (Costa *et al.*, 2005); no obstante, en los países tropicales el rendimiento es bajo, debido fundamentalmente a las altas temperaturas, lluvias y humedad relativa elevada, así como la incidencia de plagas y enfermedades (Moya *et al.*, 2010).

En Cuba, el tomate se encuentra entre las plantas hortícolas más cultivadas (Martínez *et al.*, 2007), ocupando aproximadamente el 36% del área destinada a la siembra de hortalizas (Toledo *et al.*, 2012). El modo de cultivo protegido empleado para la producción de este vegetal, constituye una tecnología promisoría para extender los calendarios de cosecha y asegurar el suministro fresco y de calidad para el mercado del tomate (Bernal *et al.*, 2010). Sin embargo, las condiciones climáticas y agronómicas que se presentan en estas instalaciones favorecen el ataque de hongos fitopatógenos como *Passarola fulva* (Cooke) U. Braun & Crous (Bernal *et al.*, 2003) que causa graves perjuicios a esta planta (Casanova *et al.*, 2007).

El control de este hongo patógeno se realiza a partir del empleo de variedades resistentes entre las que se destacan las líneas que portan genes de resistencia Cf-Ecp (Bernal *et al.*, 2009) y además con el uso de fungicidas químicos como benomilo, maneb y mancozeb (Escalona *et al.*, 2009), sustancias que poseen un elevado costo económico y representan un peligro no solo para el ambiente sino para las personas que están en contacto con ellos (Naika *et al.*, 2005). Por esta razón, surge la necesidad de nueva alternativa para el control de estos patógenos como son el empleo de extractos vegetales con un pequeño impacto sobre el medio ambiente y sobre los consumidores, en contraste con los pesticidas sintéticos (Yanar *et al.*, 2011). En estos biopreparados se emplean productos derivados del metabolismo secundario tales como: aceites esenciales, terpenos, lignanos, alcaloides, azúcares esteroides y compuestos fenólicos (Flores *et al.*, 2009) con actividad antifúngica demostrada (Yanar *et al.*, 2011).



El género *Citrus* es una fuente importante de compuestos bioactivos entre los que se incluyen antioxidantes como el ácido ascórbico y pectinas, compuestos importantes para la nutrición, además de fenoles (Ghasemi *et al.*, 2009) con actividad antimicrobial y antifúngica (Mathur *et al.*, 2010). En estudios realizados anteriormente en el Departamento de Biología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, se ha demostrado que extractos obtenidos de hojas de limón (*Citrus aurantiifolia* (Christm.) Swingle) y mandarina (*Citrus reticulata* Blanco) presentan actividad antifúngica *in vitro* frente a *P. fulva* (Iglesias, 2012); sin embargo, probar *in vivo* la eficacia de estos extractos tiene gran relevancia para su uso como fungicida ya que no siempre los resultados *in vitro* son extrapolables a las condiciones *in vivo*, debido a la complejidad de interacciones que se establecen en los patosistemas planta- patógenos. Por lo antes expuesto en este trabajo se plantearon los siguientes objetivos:

### **Objetivo General**

Determinar la actividad antifúngica *in vivo* de extractos de hojas de *Citrus reticulata* y *Citrus aurantiifolia* frente a *Passarola fulva*.

### **Objetivos Específicos**

1. Estandarizar la metodología del uso del inóculo infectivo de *P. fulva* para la determinación de la actividad antifúngica *in vivo* de extractos de hojas de *C. reticulata* y *C. aurantiifolia* en plantas de tomate.
2. Determinar la efectividad de los extractos de hojas de *C. aurantiifolia* y *C. reticulata* frente a *P. fulva* en plantas de tomate bajo condiciones no controladas.
3. Determinar el efecto de los extractos de hojas de *C. aurantiifolia* y *C. reticulata* sobre la microbiota del suelo.



## 2. Revisión Bibliográfica

### 2.1 *Lycopersicon esculentum* Miller

#### 2.1.1 Ubicación taxonómica, origen y distribución

El tomate, *Lycopersicon esculentum* Miller (1768) [syn. *Solanum lycopersicum* L. (1753)] (<http://www.ipni.org>), pertenece al reino *Plantae*, división *Tracheophyta*, clase *Angiosperma*, subclase *Dicotyledonea*, orden *Tubifloral*, familia *Solanaceae* (Gómez y Casanova, 2000).

El nombre propuesto para la especie ha sido objeto de discusión desde que en 1753 Linneo designó el nombre *Solanum lycopersicum* para el tomate, 15 años después Philip Miller reemplazó este nombre por *Lycopersicon esculentum* (Costa et al., 2005). Esta denominación es ratificada en 1987 en el Congreso Internacional de Botánica celebrado en Berlín, aunque esta polémica con respecto al nombre continúa ya que existen diferencias entre estos dos géneros en cuanto a la dehiscencia del polen en la antera de la flor (Carravedo, 2006).

Su origen se localiza en la zona oeste de América del Sur, específicamente en Perú y México y su domesticación se sitúa en México a partir del tomate cereza (*Lycopersicon esculentum* var. *cerasiforme*) (Ochoa y Carravedo, 1990) aunque posteriormente fue llevado por los distintos pobladores de un extremo a otro, extendiéndose por todo el continente (Rodríguez et al., 1996). Fue llevado a España a principios del siglo XVI y más tarde se expandió por toda Europa (Ochoa y Carravedo, 1990). Actualmente el tomate posee una gran importancia en todo el mundo, China, India, Estados Unidos de América, Turquía y Egipto se encuentran entre los mayores productores de esta hortaliza y al mismo tiempo un ejemplo de su amplia distribución (<http://www.faostat.fao.org>).

#### 2.1.2 Descripción morfológica

El tomate es una planta herbácea de hasta 3m de longitud, las partes jóvenes de este vegetal son pelosas y glandular-pubescentes (Alain, 1957). Se caracteriza distintivamente por el tipo y la densidad de sus tricomas (Peralta y Spooner, 2006). Su sistema radicular alcanza una profundidad de hasta 2m, con una raíz pivotante y muchas raíces secundarias que se extienden en un radio de hasta 1,5m (Gómez y Casanova, 2000). Los tallos son ligeramente angulosos, semileñosos, de aproximadamente 4cm de grosor en la base, y con tricomas (pilosidades) simples y glandulares (Carravedo, 2006). Las hojas son alternas,



imparipinnadas o bipinnadas, opuestas o sub-opuestas, pecioladas o sésiles (Peralta y Spooner, 2006).

La flor está formada por un pedúnculo corto, el cáliz es gamosépalo, con los sépalos soldados entre sí, y la corola gamopétala. El androceo tiene cinco o más estambres adheridos a las anteras que forman un tubo (Rodríguez *et al.*, 1996) envolviendo totalmente al estilo y al estigma, lo que contribuye a la autopolinización ya que la polinización cruzada no es un fenómeno frecuente en el tomate (Sarita, 1993). La primera flor se forma en la yema apical y las demás se disponen lateralmente por debajo de la primera, alrededor del eje principal, las inflorescencias se desarrollan cada dos o tres hojas en las axilas (Escalona *et al.*, 2009).

El fruto es en forma de baya, formado a partir de un ovario sincárpico bi o plurilocular, con una placentación axial y con numerosos óvulos, posee un exocarpio complejo, con una cutícula muy cutinizada (epidermis) y de dos a cuatro capas de células colenquimatosas (hipodermis) (Carravedo, 2006). El fruto es de color amarillo, rosado o rojo debido a la presencia de licopeno y caroteno en distintas proporciones (Rodríguez *et al.*, 1996)

El crecimiento de la planta puede ser de dos formas, determinado e indeterminado siendo este último caso el más extendido, los tallos presentan segmentos uniformes con tres hojas y una inflorescencia terminando en un ápice vegetativo. Por el contrario la planta determinada tiene tallos que presentan menos hojas por inflorescencia y terminan en un ápice reproductivo, lo que da lugar a un crecimiento más compacto, erecto y ordenado (Carravedo, 2006).

### **2.1.3 Generalidades sobre el cultivo de tomate**

#### **Generalidades de la siembra de tomate**

La fecha óptima para realizar la siembra de tomate en Cuba es entre los meses de septiembre y octubre (Escalona *et al.*, 2009), aunque en condiciones protegidas de temperatura, iluminación y riego el calendario de siembra se extiende de septiembre a febrero y de marzo a agosto (Casanova *et al.*, 2007). Con respecto al riego, en el cultivo de tomate al aire libre, el método más utilizado es el de surcos, que garantiza la distribución homogénea de agua entre los mismos, también se emplea la acequia de cabecera nivelada, además de sifones y el sistema californiano móvil con aberturas regulables (Escalona *et al.*, 2009). En organopónicos y huertos intensivos se realiza utilizando el sistema de riego con aspersores; en los organopónicos se emplea además el sistema de riego localizado con el



uso de emisores, garantizando en todos los casos una mayor cantidad de agua en la etapa de floración y fructificación del cultivo (Rodríguez *et al.*, 2007). En condiciones protegidas, el riego se realiza utilizando el sistema de riego por goteo empleando emisores (Casanova *et al.*, 2007).

Con respecto a la fertilización, para asegurar un rendimiento de 50t/ha el suelo debe contener 275kg de N, 228kg de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> y 283kg de K<sub>2</sub>O por hectáreas (Guenkov, 1996).

En organopónicos y huertos protegidos, se aplican biofertilizantes para lograr un desarrollo agrícola ecológicamente sostenible, de esta manera se han incrementado los esfuerzos para la introducción de organismos y componentes biorreguladores del suelo y las plantas (Terry *et al.*, 2002). Algunos de estos biopreparados son el Azomeg, Dimabac, Acestim, Fosforina-Plus y Biobras-16 que favorecen la fijación del dinitrógeno, estimulan el crecimiento y solubilizan el fósforo del suelo (Rodríguez *et al.*, 2007).

En el cultivo de tomate en condiciones protegidas se utilizan soluciones nutritivas acuosas que contienen una determinada concentración de fertilizantes, estos deben ser líquidos o sólidos especiales de alta solubilidad y los nutrientes que se incluyen en estas soluciones nutritivas son N, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, K<sub>2</sub>O, CaO y MgO (Casanova *et al.*, 2007).

### **Sistemas de siembra**

La siembra se realiza de forma directa o por trasplante, la producción de plántulas para el trasplante se puede realizar tanto a campo abierto sobre el suelo mediante la construcción de canteros, o en bandejas colocadas en invernaderos (Sarita, 1993). Los tomates destinados a la exportación se cultivan utilizando tutores o guías (Guenkov, 1996); el tutorado de las plantas aumenta la productividad, el tamaño de los frutos y reduce la incidencia de enfermedades en los mismos, porque disminuye el contacto con el suelo (Naika *et al.*, 2005) y además favorece las labores propias del manejo fitosanitario (Casanova *et al.*, 2007). Otro sistema de siembra usado para el cultivo de tomate es el revolcado, en el cual las plantas no se atan a ningún sostén o se deshijan y crecen regadas en el suelo, pero ofrece menos ventajas que las que brinda el sistema de siembra con tutores (Guenkov, 1996).

En Cuba el cultivo de tomate fresco destinado al mercado y al turismo, se realiza en sistemas protegidos donde se utilizan híbridos de crecimiento indeterminado, alta productividad, calidad de fruto y resistencia a diversos patógenos (Casanova *et al.*, 2007).



En organopónicos, huertos intensivos y en organoponía semiprotegida se realiza el cultivo de tomate teniendo en cuenta la demanda de la población (Rodríguez *et al.*, 2007).

### **Exigencias ecológicas**

El cultivo de tomate requiere ciertas condiciones ecológicas para el mejor desarrollo y aprovechamiento de la cosecha, por ejemplo; la temperatura óptima para el crecimiento del tomate es la comprendida entre los 20 y 34°C, una temperatura menor de 15°C detiene la floración. De esta forma si este parámetro desciende a 10°C, cesa el crecimiento; por el contrario temperaturas superiores a los 35°C retardan la fotosíntesis (Guenkov, 1996). La humedad relativa óptima para su cultivo varía entre un 60% y 80%, ya que humedades relativas muy altas favorecen el desarrollo de enfermedades aéreas, el agrietamiento del fruto, y dificulta la fecundación porque el polen se compacta (Escalona *et al.*, 2009).

Para el cultivo de tomate se recomiendan suelos profundos de textura suelta o ligeramente arcillosa, areno-arcillosa o arcillo-arenosa y el pH debe estar cerca de la neutralidad (Sarita, 1993). La intensidad luminosa debe ser alta, debido a que cuando es baja se afecta la apertura de los estomas y disminuye el número de estos por mm<sup>2</sup> (Huerres y Caraballo, 1988).

#### **2.1.4 Características de los híbridos empleados en Cuba para el cultivo de tomate.**

En la mayoría de los países tropicales incluyendo a Cuba, los rendimientos promedio en las cosechas de tomate son bajos; esto se debe a los efectos negativos que ejercen los factores climáticos como son las altas temperaturas, lluvias y humedad relativa, así como la incidencia de plagas y enfermedades (Toledo *et al.*, 2012). El mejoramiento genético de este cultivo es la alternativa más recomendable desde el punto de vista económico, para aumentar la producción, productividad y adaptabilidad a las condiciones tropicales (Moya *et al.*, 2010).

En el cultivo protegido de tomate se utilizan variedades de tomate que se caracterizan por tener una alta productividad, resistencia a patógenos y elevada calidad del fruto, ya que para la comercialización del tomate se tiene en cuenta el diámetro del fruto (Casanova *et al.*, 2007). Algunas de estas variedades son de procedencia extranjera como FA 180, FA 572, FA 516, HA 3057, HA 3063, HA 3019 de la firma israelí HAZERA y los híbridos cubanos LTM-12, LTJ-13 (IIHLD-Cuba), resistentes a *Fusarium oxysporum*, *Verticillium dahliae*,



*Stemphylium* spp., TMV (virus del mosaico del tabaco), TYLCV (virus del encrespamiento amarillo de la hoja de tomate) (Casanova *et al.*, 2007).

En organopónicos y huertos intensivos se utilizan variedades cubanas procedentes del INCA, IIH Liliana Dimitrova como Cuba C-27-81, Tropical 5-60, Tropical FL-5, Lignon, Inifat-28, Tropical 1-18, Vyta y Mara, resistentes a enfermedades causadas por los hongos *Stemphylium* spp, *Alternaria* spp, y *Phytophthora* spp, los virus del encrespamiento amarillo del tomate y las bacterias *Xanthomonas* (Rodríguez *et al.*,2007). También se cultivan variedades para el consumo fresco y destinados a la industria como la HC 38-80, Inca-17 y Rilia, resistentes a la lluvia como la variedad Placero H y con un alto valor nutricional determinado por la alta concentración de vitamina C y sólidos solubles en los híbridos Cesar F1, Cima F1 y Gaviota F1 (Rodríguez *et al.*,2007).

Las variedades cubanas Amalia, Vyta, Mariela, Mara, Mamonal-4 y Hc-2580 se encuentran entre las de mayor preferencia entre los agricultores cubanos por poseer un mayor rendimiento por área, número de frutos, racimos y ofrecer resistencia contra *Alternaria solani* y TYLCV (Moya *et al.*, 2009).

### **2.1.5 Importancia económica**

El tomate posee una notable riqueza de vitaminas, minerales y fibra. Cuando el fruto se encuentra maduro está compuesto principalmente por agua, representando la materia seca del 5 al 7,5% aproximadamente (Escobar *et al.*, 2012). Los mayores constituyentes de la materia seca son los azúcares reductores, glucosa y fructosa, 22 y 25% respectivamente, seguidos de los ácidos cítrico y málico, 9 y 4 % respectivamente, proteínas (8%), lípidos (2%) y aminoácidos (2%) (Carravedo, 2006); además contiene grandes cantidades de vitamina B y C, hierro y fósforo (Naika *et al.*, 2005).

El tomate posee también compuestos bioactivos como el ácido ascórbico, flavonoides, compuestos fenólicos, carotenoides y vitamina E beneficiosos para la salud humana ya que algunos de estos poseen propiedades antioxidantes (Carravedo *et al.*, 2006). El licopeno es el carotenoide más prominente en el tomate y sus derivados, este posee gran relevancia porque inhibe el crecimiento de líneas celulares en varios tipos de cáncer en humanos (Rivero *et al.*, 2007).

El tomate es uno de los cultivos hortícolas de mayor importancia comercial a nivel mundial (Moya *et al.*, 2009), colocándose 16 tipos de esta hortaliza en el mercado internacional (Mohammad, 2011). En el 2011 la producción de tomate fue de 159 023 383t con un



rendimiento de 335 892Kg/ha, encontrándose China, India, Estados Unidos de América, Turquía y Egipto entre los mayores productores de esta hortaliza (<http://www.faostat.fao.org>).

En Cuba goza de gran aceptación en la población, ya sea para ser consumidos en fresco o como condimentos (Dueñas *et al.*, 2008) y ocupa aproximadamente el 36% del área destinada a la siembra de hortalizas, con una producción de 266.3 miles de toneladas; es cultivada en todas las provincias del país, con un rendimiento promedio de 7 t/ha (Toledo *et al.*, 2012). La mayor producción de tomate se concentra en las provincias La Habana, Pinar del Rio y Villa Clara (Pupo *et al.*, 2010).

### **2.1.6 Enfermedades de origen fúngico que afectan el cultivo del tomate**

El tomate es un cultivo de alto riesgo fitosanitario en países tropicales, especialmente por los daños causados por enfermedades y plagas que afectan desfavorablemente los resultados productivos y económicos del cultivo (Bernal *et al.*, 2003).

Las enfermedades causadas por hongos son las más destructivas y comunes en este cultivo, las principales afectaciones que se presentan en las hojas del tomate son la mancha gris de la hoja por *Stemphyllium solani* Weber., (Damicone y Brandenberger, 1993), el tizón temprano causado por *Alternaria solani* Sor., la mancha foliar por *Septoria lycopersici* Speg., (Timmerman, 2011), el tizón tardío por *Phytophthora infestans* Mont, marchitez de las hojas por *Fusarium oxysporum. sp. Lycopersici* Schlee. (Naika *et al.*, 2005), el moho de las hojas por *Passarola fulva*, y marchitez por *Sclerotium rolfsii* Sacc (Sarita, 1993), los frutos son dañadas por antracnosis causada por *Colletotrichum phomides* Sacc.y la fomopsis por *Phoma destructiva* Gruyter & Boerema (Sarita, 1993) y las raíces dañadas por *Rhizoctonia solani* Khün (Damicone y Brandenberger, 1993) y *Pyrenochaeta lycopersici* R. W. Schneider & Gerlach. (Escalona *et al.*, 2009).

El hongo *P. fulva* está señalado como el causante de una de las principales enfermedades que tienen lugar en casas de cultivo protegido (Bernal *et al.*, 2010), pues para su germinación y desarrollo óptimo necesita una humedad ambiental elevada y la ausencia total de corrientes de aire, condiciones que proporcionan estas instalaciones (Casanova *et al.*, 2007).

#### **2.1.6.1 *Passarola fulva* (Cooke) U. Braun & Crous**

##### **Descripción morfológica**



Es un hongo asexual biotrófico del tipo no obligado, causante del moho de las hojas en plantas de tomate y se encuentra agrupado en las siguientes categorías taxonómicas (Thomma *et al.*, 2005).

Reino: Fungi

Phylum: Ascomycota

Clase: Dothideomycetes

Orden: Capnodiales

Familia: *Mycosphaerellaceae*

Género: *Passarola*

Hace algunos años este hongo se ubicaba dentro del género *Cladosporium* y se conocía por el nombre de *Cladosporium fulvum*. Estudios moleculares han situado a *C. fulvum* dentro del género anamorfo *Passalora* con el nombre *P. fulva*; este cambio en la ubicación taxonómica se basa en la filogenia de su ADN y en las cicatrices distintivas de sus hifas coinidiales, típicas de *Passarola* (Thomma *et al.*, 2005).

Sus colonias se caracterizan por ser efusas o de forma borrosa, presentándose sobre las hojas como una mancha aterciopelada. El micelio primario interno es de color oliváceo a pardo con un margen pálido, el estroma es pardo claro. Los conidióforos se encuentran en folículos libres, ramificados o no ramificados, de color pardo oscuro y septados (<http://www.mycobank.org>). Los conidios son septados y conspicuos, de pardo claro a oscuro, de forma cilíndrica o elipsoidal, lisos o ligeramente curvados, se encuentran frecuentemente ramificados constituidos por una o tres células y de color pálido a carmelita oscuro o negro (Agrios, 2005). La superficie micelial es muy desarrollada, ramificada, con hifas septadas. Las células presentan paredes que consisten principalmente en polisacáridos de glucano y quitinas (Thomma *et al.*, 2005).

### **Mecanismos de patogenicidad y sintomatología**

*P. fulva* es un patógeno mayormente foliar aunque puede atacar ocasionalmente flores y frutos (Martínez *et al.*, 2007). Los primeros síntomas aparecen luego de una semana del comienzo de la infección, en la región superior de la hoja se presentan manchas difusas de color verde pálido a amarillento, agrandándose más tarde y tomando la coloración amarilla



distintiva (Figura 1). Esta apariencia se debe a la muerte celular en el parénquima empalizada (Thomma *et al.*, 2005).



**Figura 1.** Lesiones causadas por *Passarola fulva* en órganos aéreos de plantas de tomate.

Las esporas del hongo germinan en la superficie abaxial de la hoja y entran en el apoplasto a través de los estomas (Thomas, 1998), además, se secretan pequeñas cantidades de proteínas ricas en cisteína, con consecuencias severas para la planta (van Esse *et al.*, 2006).

Los conidios de *P. fulva* se propagan por el viento o por el agua, germinan a valores de humedad relativa superiores al 85% y forman hifas delgadas de penetración que crecen de forma unidireccional (Thomma *et al.*, 2005). Después de aproximadamente tres días, germina el tubo principal o ramificación lateral de la hifa y entra por la apertura estomática (Jones *et al.*, 1997).

Los conidióforos emergen por el estoma después de los diez o doce días post-infección produciendo cadenas de dos células de conidios por conidióforo (Thomas, 1998). En estados avanzados de la enfermedad, agregados de conidióforos bloquean los estomas impidiendo la respiración y facilitando la salida de conidios para la propagación de la enfermedad (Thomma *et al.*, 2005). El taponamiento de los estomas puede resultar en marchitez de las hojas, defoliación parcial y muerte del hospedante en casos de infección severa (Jones *et al.*, 1997).

En las hojas, inicialmente aparecen en el lado adaxial manchas cloróticas con márgenes indefinidos, que se corresponden en el lado abaxial con zonas donde en una etapa más avanzada se forma un moho aterciopelado de color verde olivo constituido por las esporas del hongo (Casanova *et al.*, 2007). Las hojas inferiores son normalmente las que primero se infectan (Escalona *et al.*, 2009). En los frutos, aparecen numerosas manchas circulares de color oliváceo a negro con apariencia aterciopelada (Agris, 2005).



El crecimiento del hongo aparece preferentemente hacia los tejidos vasculares (van den Ackerveken *et al.*, 1994) aunque no es evidente la presencia de estructuras alimenticias como los haustorios (Thomas *et al.*, 1998). Comúnmente, la actividad del hongo sustrae nutrientes del hospedante por contacto de las hifas con las células del mismo, de esta forma estructuras como el retículo endoplasmático, la membrana citoplasmática, los cuerpos citoplasmáticos y microcuerpos que contienen cristalina, cambian severamente en los sitios donde hacen contacto con el huésped (Thomma *et al.*, 2005).

### Estrategias de control

El control de *P. fulva* se lleva a cabo a través de la aplicación de fungicidas químicos de carácter preventivo y curativo como se muestra en la Tabla I, además del uso de variedades de tomates resistentes a *P. fulva* como las líneas Cf-Ecp, Cf-cp-4 y Cfcp-5 (Bernal *et al.*, 2009)

**Tabla I** Fungicidas empleados para el control del moho de las hojas en tomate.

<b>Fungicida</b>	<b>Principio activo</b>	<b>Fabricante</b>	<b>Formulación</b>	<b>Modo de acción</b>	<b>Toxicidad</b>
<b>Mancozeb</b>	Complejo polimérico de etilenbis (ditiocarbamato) manganeso con sal de zinc	UnitedPhosphorus LTD (India)	Polvo mojable	Preventivo	Producto que normalmente no ofrece peligro
<b>Maneb</b>	Etilenbis (ditiocarbamato) de manganeso	LiminChemical Co., Ltd	Polvo mojable suspensión concentrada.	Preventivo	Sustancia peligrosa
<b>Benomil</b>	metil 1 (butilcarbamoil) 2 bencimidazolcarbamoato	DuPont	Polvo o Suspensión	Sistémico	Sustancia peligrosa
<b>Merpan</b>	Captan	Proficol	Suspensión Concentrada	Protectante de acción multisitio	Altamente tóxico



El control biológico es otra estrategia para combatir el desarrollo de *P. fulva*, en este sentido se han usado hongos antagonistas como *Trichoderma harzianum* Rifai y *T. virens*, (J. H. Mill, Gildens & A. A. Foster) Arx, Biheftc demostrándose que bajo condiciones de invernadero *T. harzianum* es el hongo más eficiente al reducir la severidad de la enfermedad en un 19,35% (Torres *et al.*, 2008).

La actividad antifúngica de extractos vegetales frente a este hongo ha sido poco ensayada *in vitro*, lo cual puede deberse a que la incidencia de esta patología tiene lugar frecuentemente en casas de cultivo protegido (Arie *et al.*, 2007) y a que los estudios con relación a este hongo, se encuentran orientados a incrementar la resistencia del hospedante mediante mecanismos de transformación genética, que involucran relaciones de sinergismo entre enzimas como la quitinasa y la 1,3-glucanasa (Jongedijk *et al.*, 1995). No obstante, se ha probado *in vitro* frente *P. Fulva* la inhibición del crecimiento micelial con extractos de *Tagetes erecta* L., obteniéndose valores superiores al 65% (Pupo *et al.*, 2007) y de *C. aurantifolia* y *C. reticulata* alcanzándose valores de hasta un 70% (Iglesias, 2012); así como la inhibición de la esporulación con extractos obtenidos de *Rosmarinus officinalis* L. y la germinación de esporas con extractos de *Cymbopogon citratus* Stapf, lográndose valores de un 93,49%.y 96,30 de inhibición respectivamente (Itako *et al.*, 2009)

## **2.2 Antecedentes del uso de extractos vegetales como estrategia de control ante enfermedades fúngicas**

El uso excesivo e indiscriminado de fungicidas sintéticos ha originado graves problemas medioambientales y toxicológicos (Gurjar *et al.*, 2012). Esta situación ha llevado a investigadores de todo el mundo a buscar nuevas estrategias para la protección de los cultivos contra el ataque de microorganismos fitopatógenos, cuya actividad, selectividad y seguridad ambiental sea la adecuada (Bernal *et al.*, 2005). En este sentido ha surgido en los productos naturales derivados de plantas, una alternativa para el control de patógenos, con un pequeño impacto sobre el medio ambiente y sobre los consumidores (Yanar *et al.*, 2011). De esta forma se ha probado que extractos vegetales obtenidos a partir de diferentes órganos de la planta y fabricados en solventes tanto orgánicos como acuosos, además de aceites esenciales muestran actividad antifúngica al ser capaces de inhibir la esporulación y el crecimiento vegetativo de los hongos fitopatógenos (Khallil, 2001).

**Tabla II** Extractos vegetales con actividad antifúngica frente a hongos patógenos del tomate.



Especie de planta	Solvente	Patógeno	Referencias
Ramas de <i>Equisetum hyemale</i> L. y bulbos de <i>Allium salivum</i> L.	agua	<i>Phytophthora infestans</i>	Ke-Qiang y Bruggen, 2001
<i>Olea europea</i> L.	hexano, metanol y butanol	<i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Stemphylium solani</i> ,	AL-Mughrabi et al., 2001
Semilla de <i>Azadirachta indica</i> A. Juss	metanol	<i>Rhizoctonia solani</i> y <i>Sclerotium rolfsii</i>	Sharma et al., 2003
Corteza del tronco de <i>Maesa lanceolata</i> Forssk	metanol cloroformo y hexano	<i>Rhizoctonia solani</i> y <i>Sclerotium rolfsii</i>	Okemo et al., 2003
Hojas de <i>Paeonia suffruticosa</i> Andrews.	etanol	<i>Phytophthora infestans</i>	Röhner et al., 2004
Hojas de <i>Larrea tridentata</i> J. M. Coult <i>Flourensia cernua</i> D.C., <i>Syzygium aromaticum</i> L., <i>Cinnamomum zeylanicum</i> Blume y <i>Manguifera indica</i> L. bulbos de <i>Allium sativum</i> L.	agua	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> , <i>Rhizoctonia solani</i>	Benítez et al., 2005
Hojas y corteza de tronco de <i>Magnolia grandiflora</i> L.	diclorometano, metanol.	<i>Alternaria alternata</i> , Grogan, Kimble & Misaghi y <i>Rhizocotonia solani</i>	Ahmed y Abdelgaleil, 2005
Hojas y ramas de <i>Salvia indica</i> L.	etanol	<i>Phytophthora infestans</i> , <i>Rhizocotonia solani</i> , <i>Stemphylium solani</i>	Khalil et al., 2005
Hojas de <i>Alotropis procera</i> (Wild.) R.Br., <i>Cannabis sativa</i> (L.) y <i>Datura alba</i> Nees.	agua	<i>Sclerotium rolfsii</i> Sacc.	Khanzada et al., 2006
Hojas de <i>Tagetes erecta</i> L.	etanol	<i>Alternaria solani</i> y <i>Passarola fulva</i>	Pupo et al., 2007



Espece de planta	Solvente	Patógeno	Referencias
Semillas de <i>Amaranthus hypochondriacus</i> L.	agua	<i>Alternaria alternata</i> , <i>Fusarium solani</i> ,	Acevedo y Garcia, 2007
Hojas de <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni.	petroleum éter, ciclo hexano, cloroformo, agua, acetona y etanol	<i>Alternaria solani</i> ,	Ghosh <i>et al.</i> , 2008
Hojas, ramas, raíces <i>Trigonella foenum-graecum</i> L.	Agua, petroleum éter, y metanol	<i>Botrytis cinerea</i> , <i>Pythium aphanidermatum</i> , (Edson) Fitzp. y <i>Rhizoctonia solani</i> .	Haouala <i>et al.</i> , 2008
Corteza y hojas de <i>Cinnamomum zeylanicum</i> Blume	petroleum éter, benceno, cloroformo, acetona, etanol y agua	<i>Alternaria solani</i>	Mishra <i>et al.</i> , 2009
Hojas de <i>Achillea millefolium</i> Ledeb., <i>Artemisia camphorata</i> Vill., <i>Cymbopogon citratus</i> Stapf. y <i>Rosmarinus officinalis</i> L..	agua	<i>Passarola fulva</i>	Itako <i>et al.</i> , 2009
Ramas de <i>Cinnamomum verum</i> J. Presl, rizomas de <i>Zingiber officinale</i> Roscoe, polvo de <i>Armoracia rusticana</i> P.G. Gaertn., B. Mey. & Scherby semillas de <i>Myristica fragrans</i> Houtt.	agua	<i>Rhizopus stolonifer</i> (Ehrenb) Stalpers & Schipper. <i>Aspergillus niger</i> Varga, Frisvad & Samson, <i>Fusarium sambucinum</i> Wollenw. y <i>Pythium sulcatum</i> R. G. Pratt & J. E. Mitchel	Mvuemba <i>et al.</i> , 2009
Hojas de <i>Cinnamomum zeylanicum</i> Blume, hojas y ramas <i>Cymbopogon proximus</i> Stapf., hojas de <i>Laurus nobilis</i> Cav., <i>Persea americana</i> Mill. y rizoma de <i>Zingiber officinale</i> Roscoe.	agua	<i>Alternaria alternata</i> f. sp. <i>lycopersici</i> (Fr) y <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	Fawzi <i>et al.</i> , 2009



Especie de planta	Solvente	Patógeno	Referencias
Hojas de <i>Azadirachta indica</i> A. Juss. <i>Cassia fistula</i> Schimp. Ex Oliv. y <i>Cannabis sativa</i> L.	agua	<i>Sclerotium rolfsii</i>	Farooq <i>et al.</i> , 2010
Hojas de <i>Cynodon dactylon</i> L. y <i>Datura alba</i> Nees	agua	<i>Rhizoctonia solani</i> .	Dawar <i>et al.</i> , 2010
Partes aéreas de <i>Rumex hastatus</i> L. <i>Polygonum persicaria</i> L., <i>Rumex dentatus</i> L., raíces <i>Rumex nepalensis</i> Spreng. y rizomas de <i>Rheum australe</i> L.	metanol	<i>Fusarium solani</i> y <i>Alternaria solani</i>	Hussain <i>et al.</i> , 2010.
Partes aéreas y raíces <i>Acorus calamus</i> L., <i>Tinospora cordifolia</i> Miers.	metanol	<i>Alternaria solani</i>	Sing <i>et al.</i> , 2010
Hojas <i>Bucida buceras</i> L., <i>Breonadia salicina</i> (Vahl) Hepper & J.R.I. Wood, <i>Harpephyllum caffrum</i> Bernhardt ex Krauss, <i>Olinia ventosa</i> Thunb., <i>Vangueria infausta</i> Burch. y <i>Xylothea kraussiana</i> Hochst.	acetona, metanol, hexano y diclorometano	<i>Colletotricum gloeosporioides</i> (Penz) Penz y Sacc.	Mahlo <i>et al.</i> , 2010
Aceite esencial de semillas de <i>Trachyspermum ammi</i> L.	agua	<i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i>	Siripornvisal, 2010
<i>Brassica nigra</i> L. W. D.J. Koch, <i>Cinnamomum camphora</i> <a href="#">L.T. Nees &amp; C. H. Eberm.</a> , <i>Eupatorium adenophorum</i> Spreng., <i>Lantana camara</i> L. y <i>Melia azedarach</i> L.	etanol	<i>Phytophthora infestans</i>	Maharjan <i>et al.</i> , 2010
Hojas de <i>Adhatoda zeylanica</i> Mill., <i>Azadirachta indica</i> , <i>Capparis decidua</i> Pax, <i>Dodonaea</i>	etanol	<i>Alternaria solani</i> , <i>Rhizoctonia solani</i> y <i>Macrophomina phaseolina</i> (Tassi) Goid.	Aslam <i>et al.</i> , 2010



Especie de planta	Solvente	Patógeno	Referencias
<i>viscosa</i> Jacq y <i>Salvadora oleoides</i> L.			
Semillas de <i>Voacanga africana</i>	etanol	<i>Alternaria solani</i>	Duru <i>et al.</i> , 2010 <a href="#">Stapf ex Scott-Elliot.</a>
Raíces, hojas y ramas y flores de <i>Artemisia ludoviciana</i> Nutt.	etanol, acetato	<i>Phytophthora capsici</i> Leonian. y <i>P. infestans</i>	Badillo <i>et al.</i> , 2010
<i>Lantana camara</i> L. y <i>Mimosa pudica</i> L.	metanol	<i>Alternaria alternata</i> , <i>Macrophomina phaseolina</i> y <i>Rhizoctonia solani</i>	Vadlapudi y Naidu , 2010
Hojas, ramas y frutas de <i>Camptotheca acuminata</i> Decne.	agua	<i>Rhizoctonia solani</i>	Ding <i>et al.</i> , 2010
Frutos de <i>Terminalia alata</i> Roth, <i>T. arjuna</i> Roxb. ex DC, <i>T. catappa</i> L. y <i>T. chebula</i> Retz.	agua.	<i>Aletraria alternata</i>	Shinde <i>et al.</i> , 2011
Hojas de <i>Ocimum basilicum</i> L., <i>Azadirachta indica</i> A. Juss, <i>Datura stramonium</i> L., <i>Nerium oleander</i> L. y <i>Allium sativum</i> L.	agua	<i>Alternaria solani</i>	Sallam, 2011
Hojas y frutas de <i>Xanthium strumarium</i> L., <i>Laurus nobilis</i> L., <i>Salvia officinalis</i> L. y <i>Styrax officinalis</i> Walter.	agua acetona y metanol	<i>Phytophthora infestans</i>	Yanar <i>et al.</i> , 2011
Hojas de <i>Cannabis sativa</i> L., <i>Parthenium hysterophorus</i> L., y <i>Adiantum venustum</i> D. Don.	agua	<i>Alternaria solani</i> , <i>Rhizoctonia solani</i>	Tapwal <i>et al.</i> , 2011
Hojas de <i>Lawsonia alba</i> Lam. y ramas de <i>Acacia catecú</i> (L. f.) Willd	agua	<i>Fusarium solani</i>	Bhardwaj,2012



Espece de planta	Solvente	Patógeno	Referencias
<i>Botón de flor de Eugenia caryophyllata</i> Thunb. y <i>Moringa oleífera</i> Lam., <i>frutas de y ramas de Zingiber officinale</i> Roscoe.		<i>Fusarium solani</i>	Dwivedi y Dwivedi, 2012
<i>Hojas de Azadirachta indica</i> A. Juss., <i>Allamanda cathartica</i> L., <i>Lawsonia alba</i> L., <i>Aegle marmelos</i> <a href="#">L. Corrêa</a> , <i>clavo de Allium sativum</i> L., <i>bulbo de Allium cepa</i> L., <i>rizoma de Curcuma longa</i> L. y <i>Zingiber officinale</i> Roscoe. y <i>semilla de Nigella sativa</i> L.	agua	<i>Sclerotium rolfsii</i> y <i>Rhizoctonia solani</i>	Islam y Faruq, 2012
<i>Bulbos de Allium cepa</i> L. , <i>Allium sativum</i> L. y <i>hojas de Calotropis procera</i> W.T. Aiton.	agua	<i>Fusarium solani</i>	Ahmed et al.,2012
<i>Plagiochasma rupestre</i> (Frost.) Steph	metanol	<i>Alternaria alternata</i> , <i>Phytophthora infestans</i>	Alam, 2012
<i>Aceite esencial de partes aéreas de Zataria multiflora</i> Boiss, <i>Thymus vulgaris</i> L. y <i>Thymus kotschyanus</i> Boiss. & Hohen. ex Boiss.	agua	<i>Pythium aphanidermatum</i> , <i>Rhizoctonia solani</i> y <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> (Speg.) Alippi.	Amini et al., 2012
<i>Hojas de Euphorbia serrata</i> L., <i>Thapsia garganica</i> L., <i>Hammada scoparia</i> (Pomel) Iljin. y <i>Hyoscyamus albus</i> L.	metanol	<i>Rizochtonia solani</i>	Alghazeer et al.,2012
<i>Hojas, raíces y flores de Trachystemon orientalis</i> L. G. Don	agua	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>radicis-lycopersici</i> , <i>Verticillium dahliae</i> (Kleb.) y <i>Rhizoctonia solani</i>	Onaran y Yılar, 2012



Especie de planta	Solvente	Patógeno	Referencias
<i>Ramas de Ficus tikoua</i> Bur.		<i>Phytophthora infestans</i>	Wei et al., 2012
<i>Hojas y frutos de Azadirachta indica</i> A. Juss.	n-hexano, cloroformo y n-butano	<i>Alternaria solani</i> .	Jabeen, 2012
<i>Vitex agnus-castus</i> L.	metanol	<i>Pythium ultimum</i>	Svecová et al., 2013

Entre las especies vegetales más usadas para la fabricación de extractos se encuentra *Azadirachta indica* (Sharma et al., 2003, Farooq et al., 2010, Aslam et al., 2010, Sallam, 2011, Islam y Faruq, 2012 y Jabeen, 2012) con actividad antifúngica frente a los hongos *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii* (Sharma et al., 2003) y *Alternaria solani* (Sallam, 2011), además de *Allium sativum* empleada por 4 autores (Ke-Qiang y Bruggen, 2001, Benítez et al., 2005, Islam y Faruq, 2012, Ahmed et al., 2012) contra los hongos *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*, *Rhizoctonia solani* y *Verticilium dahliae* (Benítez et al., 2005). Los hongos sobre los cuales se han probado la mayor cantidad de extracto son *Rizochtonia solani* (Benítez et al., 2005, Alghazeer et al., 2012; Amini et al., 2012) utilizado por 16 autores y *Alternaria solani* (Duru et al., 2010, Tapwal et al., 2011, Jabeen, 2012) usado por 11 autores.

En el caso de *Rizochtonia solani* se logró el 100% de inhibición del crecimiento micelial con extractos de *Syzygium aromaticum*, resultado estadísticamente igual a los obtenidos con el uso del fungicida tiabendazol (Benítez et al., 2005) y con el uso de aceites esenciales de *Zataria multiflora*, *Thymus vulgaris* y *Thymus kotschyanus*, cuya actividad antifúngica se atribuye a la presencia de fenoles como el timol y el carvacrol (Amini et al., 2012). Contra *A. solani* se logró el 100% de inhibición del crecimiento micelial con extractos de *Cinnamomum zeylanicum*, eficacia que está dada por la presencia de fenoles, polifenoles, flavonoides, terpenoides, taninos, alcaloides y saponinas (Mishra et al., 2009).

El agua ha sido el solvente más empleado en la elaboración de extractos vegetales (Qiang y Bruggen, 2001, Benítez et al., 2005, Khanzada et al., 2006, Acevedo y García, 2007 Farooq et al., 2010 y Amini et al., 2012), en segundo lugar está el metanol (Sharma et al., 2003, Hussain et al., 2010, Alam, 2012 y Svecová et al., 2013) y luego el etanol (Röhner et al., 2004, Maharjan et al., 2010 y Duru et al., 2010). Aunque la presencia de extractos



acuosos es mayor, se plantea que son menos eficaces que los confeccionados con solventes orgánicos (Shinde *et al.*, 2011 y Mishra *et al.*, 2009). Esto puede deberse a que metabolitos secundarios tales como los fenoles, flavonoides, terpenoides, taninos y saponinas son más solubles en solventes orgánicos que en agua (Mishra *et al.*, 2009)

La parte de la planta más usada para la preparación de extractos fueron las hojas (Khalil *et al.*, 2005, Pupo *et al.* 2007, Ghosh *et al.*, 2008, Farooq *et al.*, 2010, Sallam, 2011 y Jabeen, 2012), lo que se atribuye a la presencia de metabolitos secundarios con actividad antifúngica como los fenoles, flavonoides y alcaloides (Alghazeer *et al.*, 2012).

### 2.2.1 Uso de extractos vegetales obtenidos de *Citrus* spp. como fuente de compuestos con actividad antifúngica.

El género *Citrus* pertenece a la familia *Rutaceae* (Ghafar *et al.*, 2010), este tiene su origen en Asia tropical y actualmente se encuentra distribuido por países tropicales y subtropicales (Suryawanshi, 2011).

Los jugos, hojas y frutos de cítricos son una fuente importante de compuestos bioactivos como el ácido ascórbico, flavonoides, compuestos fenólicos, antocianinas pectinas (Ghasemi *et al.*, 2009; Salas *et al.*, 2011) alcaloides, glicosilasas, saponinas esteroides y taninos (Nduagu *et al.*, 2008).

Los flavonoides y los fenoles son un grupo de compuestos utilizados por la planta como mecanismo de defensa contra hongos patógenos por sus propiedades antimicrobiales (Gurjar *et al.*, 2012), estos presentan estructura aromática y un grupo hidroxilo (Mishra *et al.*, 2009) que alteran la actividad de enzimas de la membrana citoplasmática tales como la quitinasa, quitina sintasa  $\alpha$ -&  $\beta$ -glucanasa (Amini *et al.*, 2012).

**Tabla III** Extractos obtenidos a partir de *Citrus* spp. con actividad antifúngica frente a hongos patógenos de plantas.

Fuente para la confección de extracto vegetal	Actividad Antifúngica contra:	Solvente	Referencias
Hojas, corteza de tronco y de raíz <i>Citrus limón</i> (L. Burm. F.)	<i>Colletotrichum capsici</i> .	Agua	Nduagu <i>et al.</i> , 2008



Fuente para la confección de extracto vegetal	Actividad Antifúngica contra:	Solvente	Referencias
Corteza de fruto de <i>Citrus reticulata</i> Blanco	<i>Alternaria alternata</i> , <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Curvularia lunata</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> <i>Helminthosporium oryzae</i> .	Agua	Chutia <i>et al.</i> , 2009.
Hojas de <i>Citrus aurantium</i> L. var. <i>Sinensis</i> L., <i>Citrus aurantium</i> L., <i>Citrus aurantiifolia</i> (Christm ) Swingle, <i>Citrus latifolia</i> (Tanaka ex Yu. Tanaka) Tanaka y <i>Citrus reticulata</i> Blanco.	<i>Alternaria solani</i> y <i>Passalora fulva</i>	Metanol y etanol	Iglesias, 2012
Corteza de fruto de <i>Citrus sinensis</i> , <i>C. limón</i> y <i>C. reticulata</i>	<i>Penicillium digitatum</i> , <i>Curvularia spp.</i> y <i>Colletotrichum spp.</i>	Hexano	Johann <i>et al.</i> , 2007
Tejidos de <i>Citrus limón</i> y <i>Citrus sinensis</i>	<i>Sclerospora gramicola</i>	Agua	(Deepak <i>et al.</i> , 2007)

La actividad antifúngica de estos extractos se debe a la presencia de metabolitos secundarios como las saponinas, fenoles, taninos, aminoácidos, aminas, quinonas, alcaloides y flavonoides. La presencia de estos compuestos permite que sean efectivos para el control de hongos fitopatógenos como *A. alternata*, *R. solani* (Chutia *et al.*, 2009), *A. solani* y *P. fulva* (Iglesias, 2012).

Aunque el solvente más usado haya sido el agua (Deepak *et al.*, 2007, Nduagu *et al.*, 2008 y Chutia *et al.*, 2009) y la parte de la planta más empleada la corteza tanto de frutos como



de tallos (Johann *et al.*, 2007, Nduagu *et al.*, 2008 y Chutia *et al.*, 2009), con el uso de hojas y solventes orgánicos como el metanol y el etanol también se han obtenido resultados satisfactorios en la inhibición del crecimiento micelial y de la germinación de esporas en *A. solani* y *P. fulva* (Iglesias, 2012).

### **2.3 Métodos de determinación de la actividad antifúngica *in vivo***

El término *in vivo* se emplea para referirse a los procesos biológicos que tienen lugar en organismos o células vivos bajo condiciones naturales (Zaid *et al.*, 2004). Determinar la actividad antifúngica en condiciones naturales tiene gran relevancia, ya este tipo de ensayos es muy empleado por los investigadores que primero realizan ensayos *in vitro*, con la finalidad de comprobar la eficacia de su producto en interacción con los factores ambientales. En algunos casos los resultados de experimentos *in vivo* pueden diferir de los obtenidos en condiciones *in vitro* (Bahraminejad, 2012).

#### **2.3.1 Material vegetal**

En los experimentos *in vivo* el material vegetal más utilizado han sido las semillas (Hwang *et al.*, 2001, Islam *et al.*, 2001, Bernal *et al.*, 2009, Sallam, 2011, Saleem *et al.*, 2011, Akhtar *et al.*, 2012 y Bahraminejad, 2012) lo cual pudo ocurrir porque algunos investigadores necesitan una completa observación del ciclo vegetativo de ciertas especies vegetales, para saber cuál es el tiempo adecuado para su trasplante. Un ejemplo lo constituye el pimiento, el cual se trasplanta cuando han brotado las primeras cuatro hojas, en experimentos donde se prueban extractos con actividad antifúngica frente a hongos del suelo (Hwang *et al.*, 2001); con este fin también se han empleado posturas (Carrión *et al.*, 2011).

##### **2.3.1.1 Material de partida**

Como material de partida utilizado para probar actividad antifúngica contra hongos del suelo como *Phytophthora capsici* se han usado plántulas con 1cm sobre la superficie del suelo (Lee *et al.*, 2003). En el caso de la evaluación de la actividad antifúngica contra hongos foliares como *A. solani*, *P. fulva* y *P. infestans* se han empleado plantas de cinco semanas (Bernal *et al.*, 2009), de seis semanas (Saleem *et al.*, 2011 y Akhtar *et al.*, 2012) y de siete semanas (Sallam, 2011) obteniéndose resultados satisfactorios (Bernal *et al.*, 2009, Saleem *et al.*, 2011 y Akhtar *et al.*, 2012).

##### **2.3.1.2 Sustratos empleados**



En experimentos *in vivo* se han usado mezclas de suelos (turba y musgo), arena y suelo de marga (Hwahg *et al.*, 2001), compost más suelo ferralítico (Bernal *et al.*, 2009), arena (Sallam, 2011), suelo pardo moderadamente lixiviado u humus de lombriz (Carrión *et al.*, 2011) y zeolita (Bernal *et al.*, 2006). El uso de estos sustratos permite a las plantas un adecuado desarrollo y además satisface sus necesidades nutricionales, permitiéndoles expresar su potencial productivo (Rodríguez *et al.*, 2007).

### **2.3.2 Preparación del inóculo infectivo**

El inóculo no es más que las formas vegetativas y/o reproductivas del patógeno capaces de dar inicio a la enfermedad. En los experimentos *in vivo* el inóculo infectivo se ha preparado mayormente a partir de conidios (Hwang *et al.*, 2001, Nutsugh y Wilson, 2007, Bernal *et al.*, 2009, Saleem *et al.*, 2011 y Akhtar *et al.*, 2012) aunque también se ha utilizado fragmentos de micelio con los que se han logrado los mismos resultados que con esporas (Nutsugh y Wilson, 2007).

#### **2.3.2.1 Métodos de inoculación**

El método de inoculación más empleado, cuando se infecta toda la planta, es a través de un atomizador manual (Hwang *et al.*, 2001, Bernal *et al.*, 2006, Nutsugh y Wilson, 2007, Bernal *et al.*, 2009, Saleem *et al.*, 2011, Sallam, 2011 y Carrión *et al.*, 2011). En los casos en los cuales solamente se infecta la hoja se utilizan micropipetas para la inoculación (Saleem *et al.*, 2011 y Akhtar *et al.*, 2012) o este proceso se puede llevar a cabo con un pincel, lográndose también con este método un buen desarrollo de los síntomas (Leiva *et al.*, 2010; Martín *et al.*, 2010).

### **2.3.3 Evaluación de los resultados**

La mayoría de los investigadores realizan la evaluación de los resultados a partir de escalas que determinan la severidad del ataque del patógeno como son la de Vakalovnakis (1983) (Islam *et al.*, 2001) y la de Hwang en 2001 (Hwang *et al.*, 2001), la intensidad del ataque como la de Letha *et al.*, 2009 (Sallam, 2011) y la de Rivas (1981) (Bernal *et al.*, 2006 y Carrión *et al.*, 2011), el área foliar afectada como la de Irzhansky & Cohen (2008) (Akhtar *et al.*, 2012) y la de Irzhansky & Cohen (2006) (Saleem *et al.*, 2011) y además, basadas en la descripción de los estados de desarrollo de los síntomas (Bernal y Infante, 2009). Aunque el empleo de escalas es lo más común en la evaluación de los resultados en experimentos *in vivo*, también se utilizan fórmulas como la de Townsend y Heuberger (1943) para calcular



la intensidad del ataque del patógeno (Bernal *et al*, 2006) y la de Vázquez (2008) para el cálculo del grado de ataque de la enfermedad (Carrión *et al.*, 2011).

Determinar la actividad antifúngica *in vivo* de extractos vegetales nos permite conocer la eficacia de los mismos, de modo, que la elección del método a utilizar, es vital para la obtención de los resultados más exactos. Entre los materiales vegetales antes mencionados, el uso de semillas es mejor porque nos permite observar todo el ciclo vegetativo de la planta y precisar el momento oportuno para el trasplante (Bahraminejad, 2012), como material de partida es más recomendable usar plantas con más de 6 semanas de edad cuando el desarrollo foliar es mayor (Akhtar *et al.*, 2012), con respecto al inóculo el uso de fragmentos de micelio ofrece excelentes resultados y es de rápida obtención. El método de inoculación con pincel es más preciso porque se inocula hoja por hoja asegurando la infección y el correcto desarrollo de los síntomas (Martín *et al.*, 2010). La evaluación de los resultados según la escala de Rivas (1981) y la fórmula de Townsend y Heuberger (1943) permiten mayor exactitud en el cálculo de la intensidad del ataque del patógeno.



### 3. Materiales y Métodos

#### 3.1 Obtención de extractos hidroalcohólicos de hojas de *C. reticulata* y *C. aurantiifolia*

La colecta de hojas de *C. reticulata* (mandarina), *C. aurantiifolia* (limón criollo) se realizó en áreas del Jardín Botánico de la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas, ubicado al norte de la ciudad de Santa Clara, Villa Clara, Cuba. La identificación de las hojas colectadas se llevó a cabo por especialistas de este centro (O. Méndez No.9884, 9885 (ULV).

El material vegetal colectado se lavó con abundante agua destilada, se secó en una estufa a 60 °C durante 24 horas y se trituró en un molino de 5 pulgadas (Chrisly & Norris, Norris, Chelmsford, Reino Unido). A 2g del material de cada especie vegetal se le agregaron 20mL de metanol (Uni-Chem, Chemical Reagents, China) o etanol (Uni-Chem, Chemical Reagents, China) al 70%, las muestras se sometieron a baño ultrasonico (Branson Ultrasonic Corporation, Estados Unidos) durante 20 minutos y fueron filtrados en una bomba al vacío (Water Circulating Multi Propose Vacuum Pump SHB-III, Liuyi, China).

#### 3.2 Cuantificación del contenido de fenoles totales

En la cuantificación del contenido de fenoles totales se empleó el método descrito por Tuberoso *et al.* (2009), con modificaciones. A 1mL de extracto se le adicionaron 80µL del reactivo Folin-Ciocalteau 1N (Merck, Alemania) y se dejó reposar durante 5 minutos. Después se le adicionó 800 µL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 7%, se completó hasta 2 mL con agua destilada, se agitó y se dejó reposar durante 90 min. Se midió la absorbancia en un espectrofotómetro UV-VIS (Rayleigh 1601, China) a una longitud de onda de 750nm. El contenido de fenoles totales se determinó mediante extrapolación en una curva de calibración empleando ácido gálico como patrón y se expresó en mg equivalentes de ácido gálico/mL de extracto. Las determinaciones se realizaron por triplicado.

#### 3.3 Determinación de la actividad antifúngica *in vivo* de extractos hidroalcohólicos de hojas de *C. reticulata* y *C. aurantiifolia*

El experimento se realizó bajo condiciones no controladas en áreas de la Empresa de Semillas Varias de Sancti Spíritus ubicada al sur de la ciudad de Sancti Spíritus (Figura 2). Se emplearon los extractos de hojas de *C. reticulata* en metanol 70% y *C. aurantiifolia* en etanol 70% a una concentración de 50mg equivalentes de ácido gálico/ml de extractos de fenoles totales, cercana pero superior a la concentración mínima inhibitoria determinada en experimentos *in vitro* (Iglesias, 2012). La dilución se realizó en agua destilada. La aplicación



de los extractos se realizó con un atomizador manual procurando abarcar toda el área foliar de la planta.



**Figura 2.** Área de la Empresa de Semillas Varias de Sancti Spíritus donde se realizaron los experimentos bajo condiciones no controladas.

En la realización del experimento se utilizaron semillas de tomate de la variedad Amalia que fueron sembradas en bandejas de poliestireno expandido con capacidad para 100 plantas, sobre un sustrato compuesto por una mezcla de biocompost más suelo pardo (75:25). Cuando las plantas alcanzaron los 25 días de edad, se trasplantaron a bolsas de nailon 1kg de capacidad con igual composición de sustrato, para lograr un adecuado desarrollo folicular y foliar. El riego de agua se realizó diario y manualmente dirigido hacia el sustrato, protegiendo a la planta del déficit hídrico o exceso de humedad. El experimento se realizó cuando las plantas alcanzaron los 55 días de edad.

En cada tratamiento se emplearon 10 plantas y el experimento se repitió una vez, para un total de 20 réplicas por tratamiento.

### **3.3.1 Estandarización del uso del inóculo infectivo de *P. fulva* para la determinación de la actividad antifúngica *in vivo* de extractos hidroalcohólicos de *C. reticulata* y *C. aurantiifolia* en plantas de tomate**

Se probaron dos formas de inóculo infectivo: suspensiones de conidios y suspensiones de propágulos.

#### Obtención de la suspensión de conidios.

La suspensión de conidios de *P. fulva* se obtuvo a partir de la agitación de discos de micelio de 0,6 cm de diámetro cultivado en Agar Papa Dextrosa (PDA) durante 21 días a una temperatura de 27 °C, en agua destilada estéril, y se ajustó a una concentración de  $5 \times 10^5$  conidios/mL en cámara de Neubauer.

#### Preparación de la suspensión de propágulos



Se transfirió fragmentos de micelio de 0,6 cm de diámetro, cultivado en PDA durante 21 días, a medio de cultivo Caldo Papa Dextrosa (PDB). El inóculo crecido en constante movimiento en una Zaranda (Gerhardt, Alemania) durante 72 h, a 120 r/min y 27 °C, fue macerado en un homogenizador Ultra-Turrax T 25, (Rose Scientific Ltd., Edmonton, AB, Canada) y se ajustó a una concentración de  $5 \times 10^5$  propágulos/mL en cámara de Neubauer.

#### Realización del bioensayo.

El bioensayo se realizó cuando las plantas alcanzaron los 55 días de edad. La inoculación se realizó con un pincel por ambos lados de la hoja abarcando toda el área foliar. Después de inoculadas, las plantas se cubrieron 24 horas con bolsas de nailon para lograr el máximo de apertura de los estomas. Las evaluaciones se realizaron a los 7 y 14 días post-inoculación. Durante los 14 días que duró el experimento el riego se realizó de forma manual, la iluminación fue natural y la temperatura se mantuvo entre 26,8 y 19.2 °C (Anexo 1).

La estimación del área foliar afectada se realizó a partir de la escala de 6 grados de Rivas (1981) y con estos datos se calculó la intensidad media del ataque a los 7 y 14 días post-inoculación, mediante la fórmula de Townsend y Heuberger (1943)  $I = \frac{\sum(n \cdot v)}{i \cdot N} \times 100$ , donde I% corresponde a la intensidad del ataque del hongo patógeno, n el número de hojas con un grado determinado, v el grado respectivo de la escala, N el total de plantas evaluadas e i el grado máximo de la escala (Bernal *et al.*, 2006).

#### **3.3.2 Determinación de la efectividad de los extractos hidroalcohólicos de *C. reticulata* y *C. aurantiifolia* frente a *P. fulva* en plantas de tomates en condiciones no controladas.**

Plantas de tomate de 55 días se dividieron en 6 grupos, se emplearon cuatro tratamientos y dos grupos control; uno positivo y otro negativo. Los grupos se formaron al azar con 10 plantas cada uno.

En todos los tratamientos, se asperjaron 10ml de extracto por planta, según correspondiese, con un atomizador manual tratando de abarcar toda la parte aérea de la planta. Los tratamientos ensayados se muestran en la Tabla 4.

Se utilizó un grupo como control positivo que solo se inoculó con el hongo y se asperjó con agua destilada y un grupo control negativo al que solo se le asperjaron los extractos.

**Tabla IV.** Tratamientos ensayados en la determinación de la actividad antifúngica *in vivo* de los extractos de limón y mandarina frente a *P. fulva* en plantas de tomate.



N° de tratamiento	Tratamiento
1	Aplicación del extracto 24 horas antes de la inoculación de hongo
2	Aplicación del extracto a las 24h post-inoculación.
3	Aplicación del extracto a las 48h post-inoculación
4	Aplicación del extracto a las 24 y 48h post-inoculación.

La inoculación se realizó con pincel por ambos lados de la hoja, luego las plantas fueron colocadas dentro de bolsas de nailon transparentes para facilitar la apertura de los estomas producto de la transpiración y lograr una mejor infección.

Los grupos de plantas fueron colocados dentro de casas de mayas hechas manualmente y se mantuvieron bajo condiciones no controladas durante los 14 días que duró el experimento, la temperatura se mantuvo entre 19,2 °C y 26,8 (Anexo 1), el riego se realizó manualmente y la iluminación fue natural.

Las evaluaciones se realizaron a los 7 y 14 días después de la inoculación como se describió en el acápite 3.3.1.

#### **3.4 Determinación del efecto de los extractos hidroalcohólicos de *C. reticulata* y *C. aurantiifolia* en la microbiota del suelo.**

Se realizó el análisis microbiológico del suelo según el método descrito por Mayea *et al.*, 1982. Como sustrato se empleó una mezcla de biocompost más suelo pardo (75:25). Se evaluaron bacterias y hongos totales, actinomicetos, azotobacter y hongos celulíticos. El experimento se realizó por triplicado y se repitió una vez.

El sustrato utilizado en el experimento se colocó en macetas de 0.5kg de capacidad, se emplearon 2 tratamientos y un control negativo. Los dos tratamientos fueron asperjados con 10ml de cada extracto a 50 mg equivalentes de ácido gálico/mL de extracto de fenoles totales, según correspondiese, al control negativo solo se le asperjó agua.

A 1g de suelo, se le añadieron 18ml de agua y a partir de esta muestra se realizaron disoluciones seriadas de  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$  a  $10^7$ . Para facilitar el conteo de hongos totales, actinomicetos, bacterias solubilizadoras del fósforo, azotobacter y hongos celulíticos se



utilizaron las diluciones de  $10^4$  y  $10^5$  mientras que para las bacterias totales las de  $10^6$  y  $10^7$ .

Se añadió 1ml de diluciones en tres palcas Petri que contenían el medio de cultivo para cada microorganismo en particular y se agitó cuidadosamente de forma rotatoria.

El medio de cultivo utilizado para el cultivo de bacterias fue agar glicerina peptona, para el cultivo de hongos se utilizó agar rosa bengala, los actinomicetos en agar almidón amoniacal o agar asparagina y para los hongos celulíticos se empleó agar Müller (Mayea *et al.*, 1991).

El medio de cultivo empleado para el crecimiento de azotobacter fue Ashbys Manitol Phosphate preparado a partir de 0.2 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{Mg}_4 \text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{SO}_4 (\text{NH}_4)_2$ ,  $\text{ClNa}$ , 10g de Manitol, 0.1g de  $\text{SO}_4\text{Ca} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 5g de  $\text{CO}_3\text{Ca}$  y 1L de  $\text{H}_2\text{O}$  (Hamdi, 1985).

En el caso de las bacterias solubilizadoras del fosforo el medio de cultivo se elaboró a partir de 10g de glucosa, 5g de  $\text{Ca}_3 (\text{PO}_4)_2$ , 0.2g de  $\text{ClK}$ , 0.1  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.5 de extracto de levadura, trazas de  $\text{MnSO}_4$  y 1L de  $\text{H}_2\text{O}$ .

Las placas fueron mantenidas en una incubadora a una temperatura de  $30^\circ\text{C}$  durante los días que duró el experimento.

El conteo de hongos y bacterias totales se realizó a las 24h, 48h y 96h, azotobacter a las 72h, 96h y a los 7 días, bacterias solubilizadoras del fosforo a las 72 y 96h, actinomicetos y hongos celulíticos a los 7-15 días respectivamente.

### 3.5 Procesamiento estadístico

Los datos obtenidos se analizaron en el programa PASW Statistics versión 18.0, verificándose en todos los casos el cumplimiento de los supuestos de normalidad (Shapiro-Wilk) y homogeneidad de varianza (Levene). El análisis de varianza para determinar las diferencias entre las concentraciones de fenoles totales se realizó mediante la prueba U de Mann Whitney  $p < 0.05$ . El análisis de varianza para determinar las diferencias entre los inóculos infectivos se realizó mediante la prueba T para muestras independientes  $p < 0.05$ . Los análisis de varianza para determinar las diferencias entre el porcentaje de área foliar afectada según los tratamientos empleados en cada extracto se realizaron mediante la prueba de Kruskal Wallis  $p < 0.05$  y U de Mann Whitney a posteriori,  $p < 0.01$ . Los análisis de varianza para determinar el efecto de los extractos en la microbiota del suelo se realizaron mediante la prueba de Wilcoxon  $p < 0.05$ , en el caso de azotobacter se empleó la prueba T para muestras relacionadas  $p < 0.05$ .



## 4. Resultados

### 4.1 Obtención de extractos hidroalcohólicos de hojas de *Citrus reticulata* y *Citrus aurantiifolia*.

Se obtuvieron 2 extractos hidroalcohólicos de hojas de cítricos, uno de *C. aurantiifolia* en etanol 70% y otro de *C. reticulata* en metanol 70%.

### 4.2 Contenido de fenoles totales.

El extracto de *C. aurantiifolia* en etanol 70% mostró mayor concentración de fenoles totales (243,93 mg equivalentes de ácido gálico/mL de extracto), con respecto al extracto de *C. reticulata* en metanol 70% que presentó concentraciones de fenoles totales de 195 mg equivalentes de ácido gálico/mL de extracto.

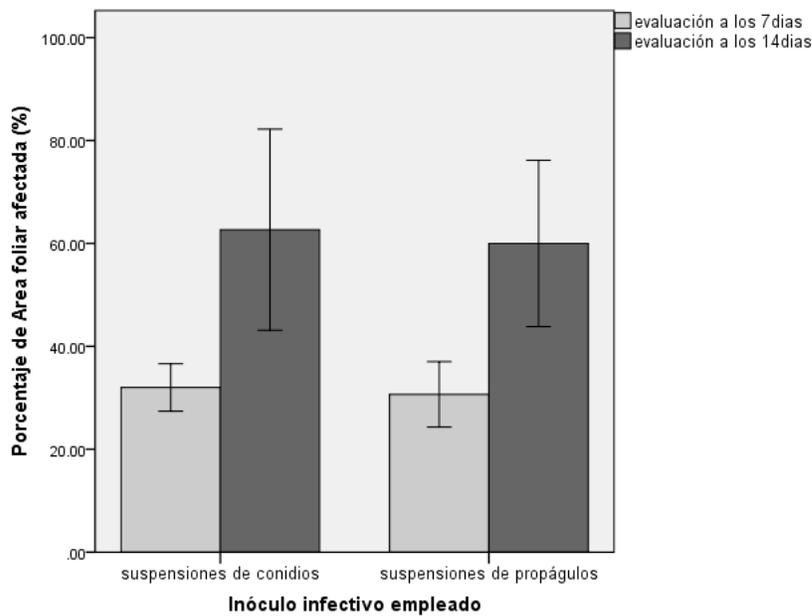
### 4.3 Actividad antifúngica *in vivo* de extractos hidroalcohólicos de hojas de *C. reticulata* y *C. aurantiifolia*.

#### 4.3.1 Estandarización del uso del inóculo infectivo para la determinación de la actividad antifúngica *in vivo* de extractos hidroalcohólicos de *C. reticulata* y *C. aurantiifolia* en plantas de tomate.

Las dos formas de inóculo infectivo probadas; suspensiones de conidios y suspensiones de propágulos, permitieron una correcta infección (Figura 3) y desarrollo de los síntomas de la enfermedad tanto a los 7 como a los 14 días, no se encontraron diferencias significativas con respecto al porcentaje del área foliar afectada en ambos casos (Figura 4).



**Figura 3.** Síntomas desarrollados en plantas de tomate a los 14 días de inoculación con suspensiones de conidios (a y b) y suspensiones de propágulos (c y d)



**Figura 4.** Porcentaje del Área Foliar Afectada en plantas de *Lycopersicon esculentum* inoculadas con suspensiones de conidios y de propágulos de *P. fulva* a los 7 y 14 días de inoculación. (Prueba T para muestras independientes  $p < 0.05$ )

#### 4.3.2 Efectividad de los extractos hidroalcohólicos de *Citrus reticulata* y *Citrus aurantiifolia* frente a *P. fulva* en plantas de tomates en condiciones no controladas.

Los dos extractos evaluados inhibieron el desarrollo del hongo en alguno de los tratamientos ensayados (Figura 5).

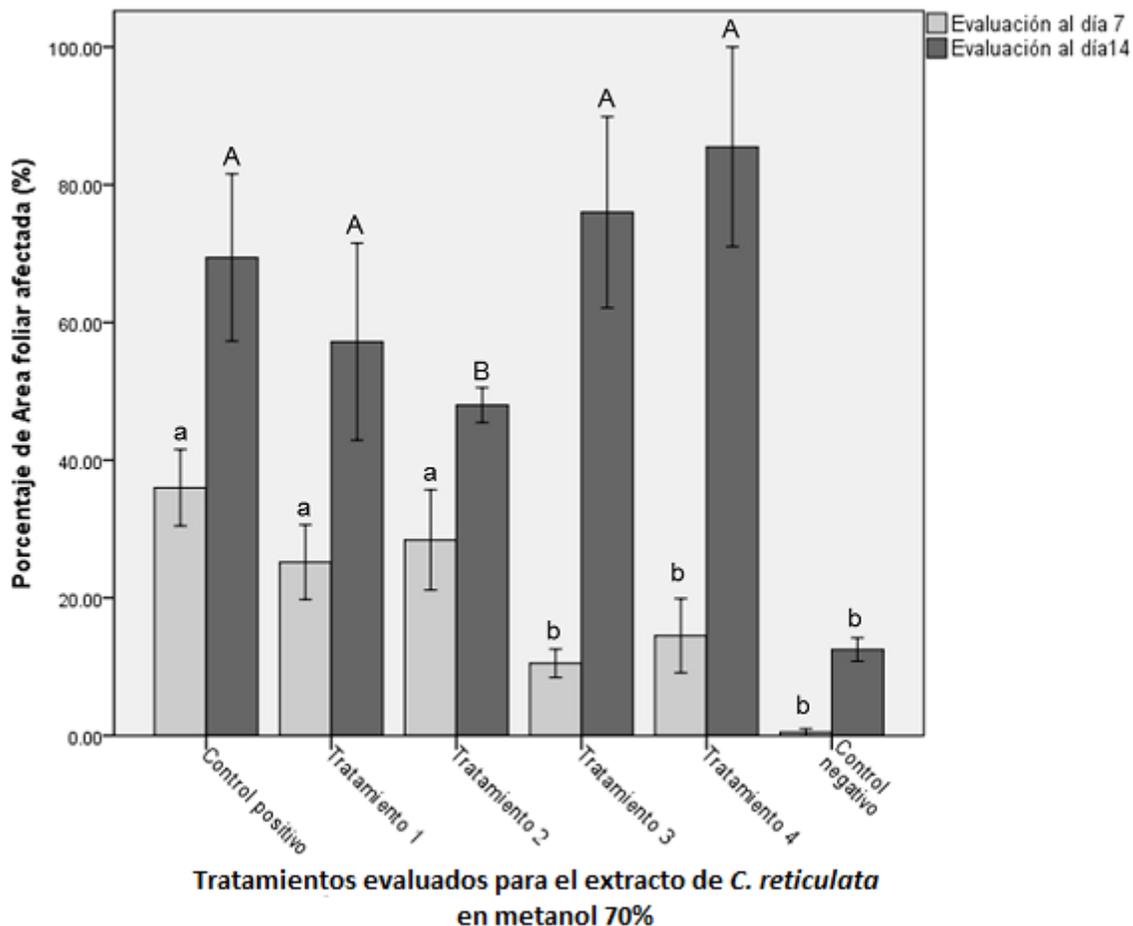


**Figura 5.** Plantas de tomate inoculadas con *P. fulva* sin aplicar ningún extracto (a), con aplicación del extracto de hojas de *C. aurantiifolia* 24 horas antes de inocular (c), con aplicación del extracto de *C. reticulata* a las 24 horas de inoculación (d) y sin inocular con *P. fulva* (b).

En la evaluación a los siete días de inoculación de las plantas de tomate con suspensiones de micelio de *P. fulva* cuando se empleó el extracto *C. reticulata* en metanol 70%, el



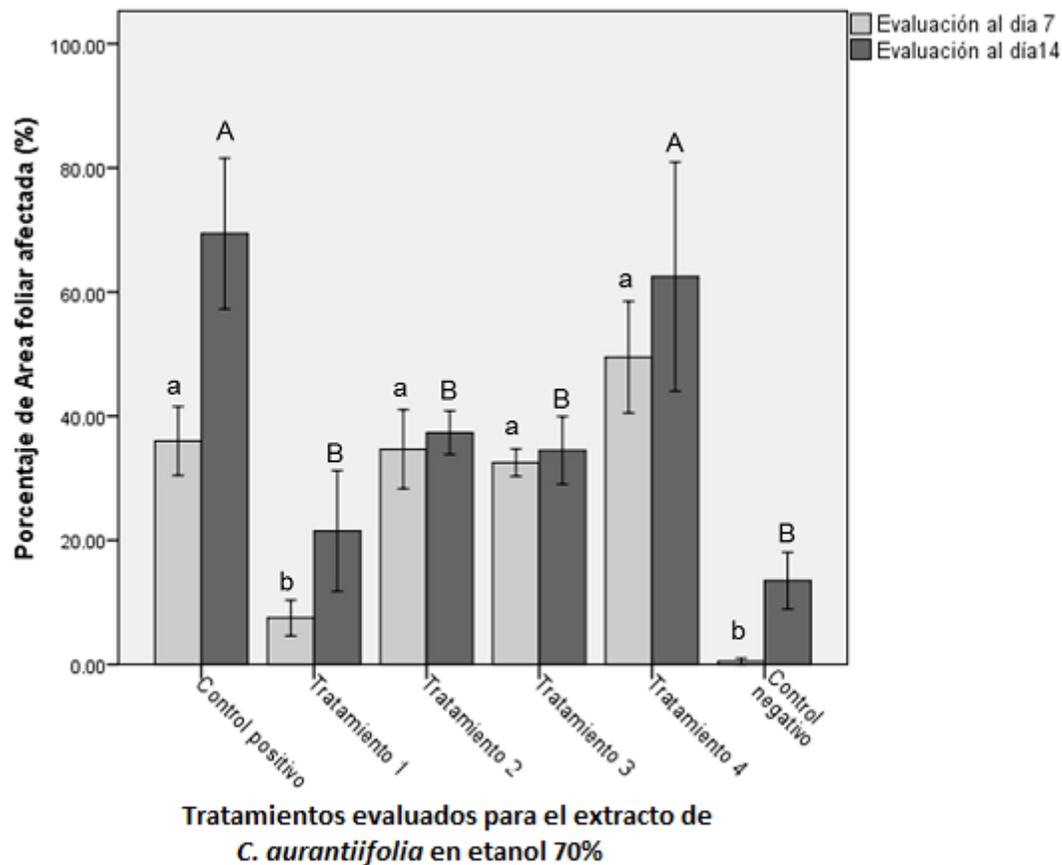
porcentaje de área foliar afectada fue menor cuando se aplicó el extracto a las 48 horas (tratamientos 3) y a las 24 y 48 horas (tratamientos 4) de la inoculación con respecto al control positivo (plantas inoculadas sin aplicarle el extracto) (Figura 6). En la evaluación a los 14 días solo mostró diferencias significativas con respecto al control positivo cuando se aplicó el extracto a las 24 horas de inoculación.



**Figura 6.** Porcentaje del Área Foliar Afectada en plantas de *Lycopodium esculentum* inoculadas con suspensiones de propágulos de *P. fulva* y asperjadas con extractos de hojas de *C. reticulata* en metanol 70% a diferentes tiempos: 24 horas antes de la inoculación (Tratamiento 1), a las 24 horas de la inoculación (Tratamiento 2), a las 48 horas de la inoculación (Tratamiento 3) y a las 24 y 48 horas de la inoculación (Tratamiento 4) evaluadas a los 7 y 14 días de inoculación. Cada barra representa la media de tres réplicas independientes. Letras distintas en las barras indican que las medias de los tratamientos con respecto al control positivo difieren estadísticamente para  $p \leq 0,05$  (Kruskal Wallis/ U de Mann Whitney).



En la evaluación a los siete días de inoculación de las plantas de tomate con suspensiones de micelio de *P. fulva* cuando se empleó el extracto *C. aurantiifolia* en etanol 70%, el porcentaje de área foliar afectada fue menor cuando se aplicó el extracto a las 24 horas antes de la inoculación (tratamientos 1) con respecto al control positivo (plantas inoculadas sin aplicarle el extracto) (Figura 7). En la evaluación a los 14 días además del tratamiento 1, también mostró diferencias significativas con respecto al control positivo cuando se aplicó el extracto a las 24 horas (tratamiento 2) y a las 48 horas (tratamiento 3) de inoculación.



**Figura 7.** Porcentaje del Área Foliar Afectada en plantas de *Lycopersicum esculentum* inoculadas con suspensiones de propágulos de *P. fulva* y asperjadas con extractos de hojas de *C. aurantiifolia* en etanol 70% a diferentes tiempos: 24 horas antes de la inoculación (Tratamiento 1), a las 24 horas de la inoculación (Tratamiento 2), a las 48 horas de la inoculación (Tratamiento 3) y a las 24 y 48 horas de la inoculación (Tratamiento 4) evaluadas a los 7 y 14 días de inoculación. Cada barra representa la media de tres réplicas independientes. Letras distintas en las barras indican que las

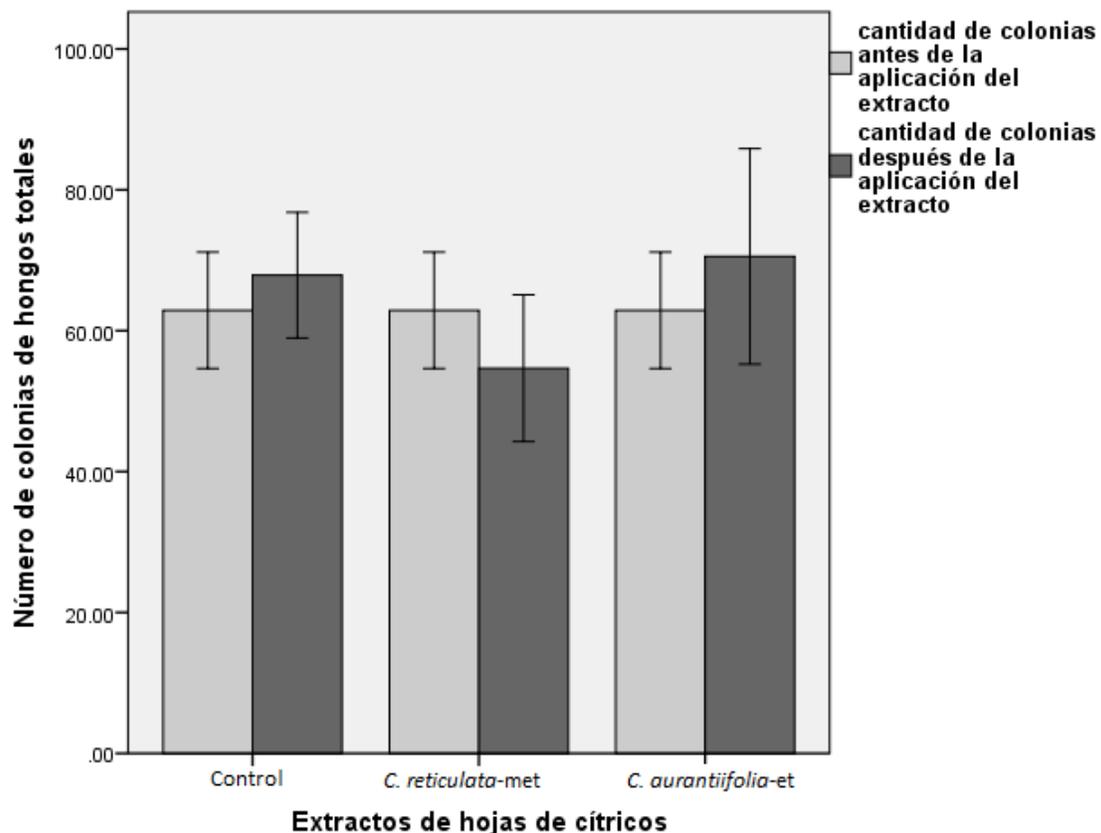


medias de los tratamientos con respecto al control positivo difieren estadísticamente para  $p \leq 0,05$  (Kruskal Wallis/ U de Mann Whitney).

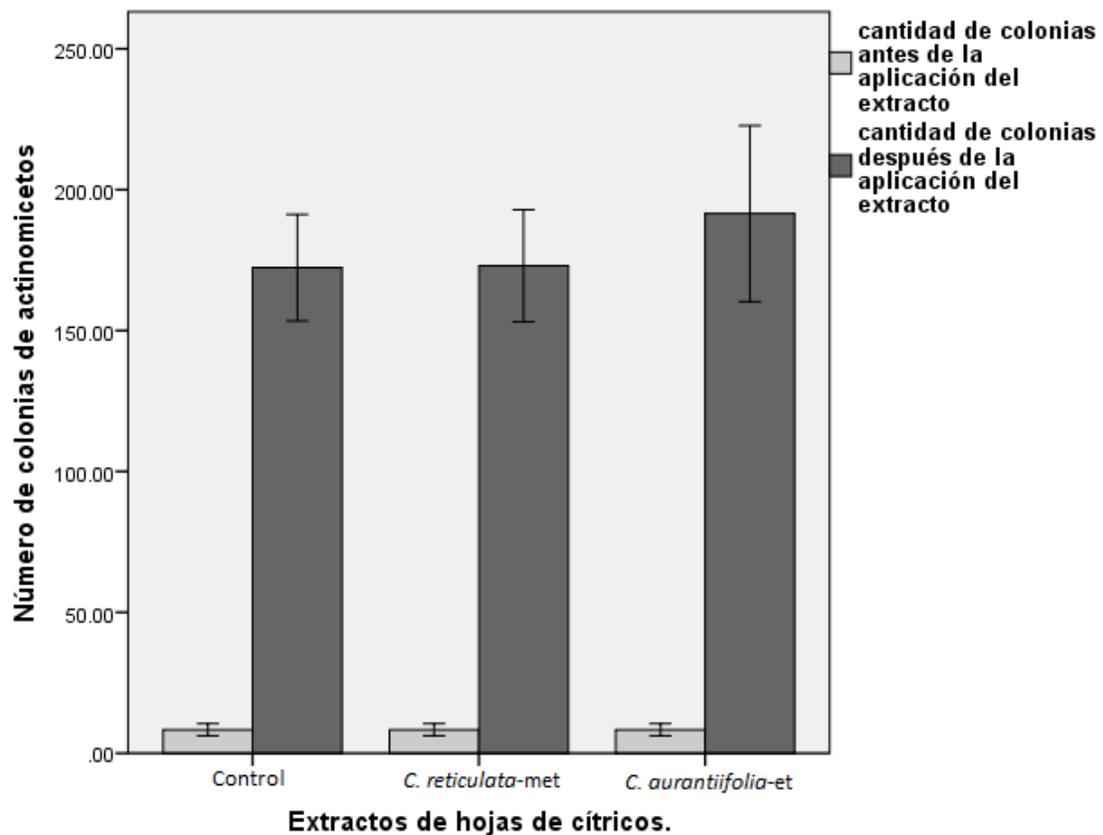
#### 4.4 Efecto de los extractos hidroalcohólicos de *Citrus reticulata* y *Citrus aurantiifolia* en la microbiota del suelo.

Los dos extractos evaluados no presentaron efectos negativos sobre la microbiota del suelo, debido a que no disminuyó la cantidad total de colonias de los microorganismos evaluados del suelo tratado con respecto al control negativo.

Frente a hongos y actinomicetos, los extractos evaluados ocasionaron ningún cambio significativo en cuanto al número de colonias con respecto al suelo no tratado (Figura 8 y 9).

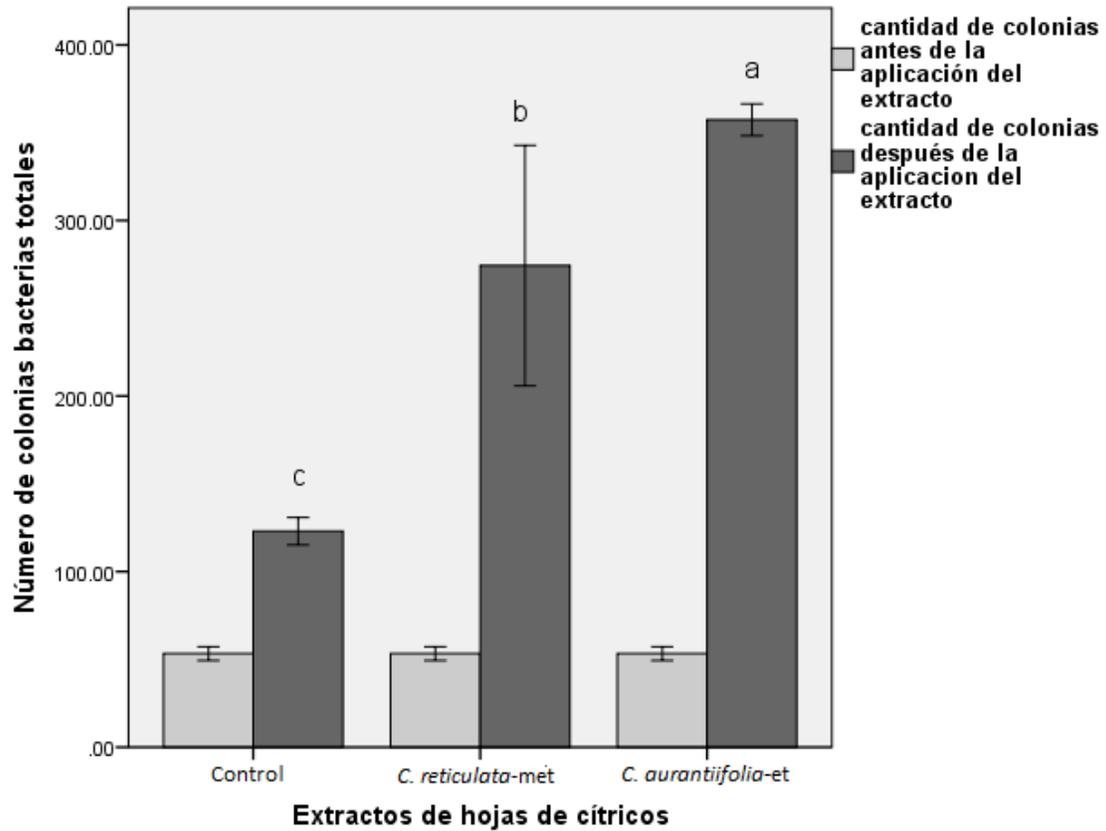


**Figura 8.** Número de colonias de hongos totales presentes en el suelo antes y después de la aplicación de extractos de hojas *C. aurantiifolia* en etanol 70% y *C. reticulata* en metanol 70%. (Wilcoxon  $p < 0.05$ )

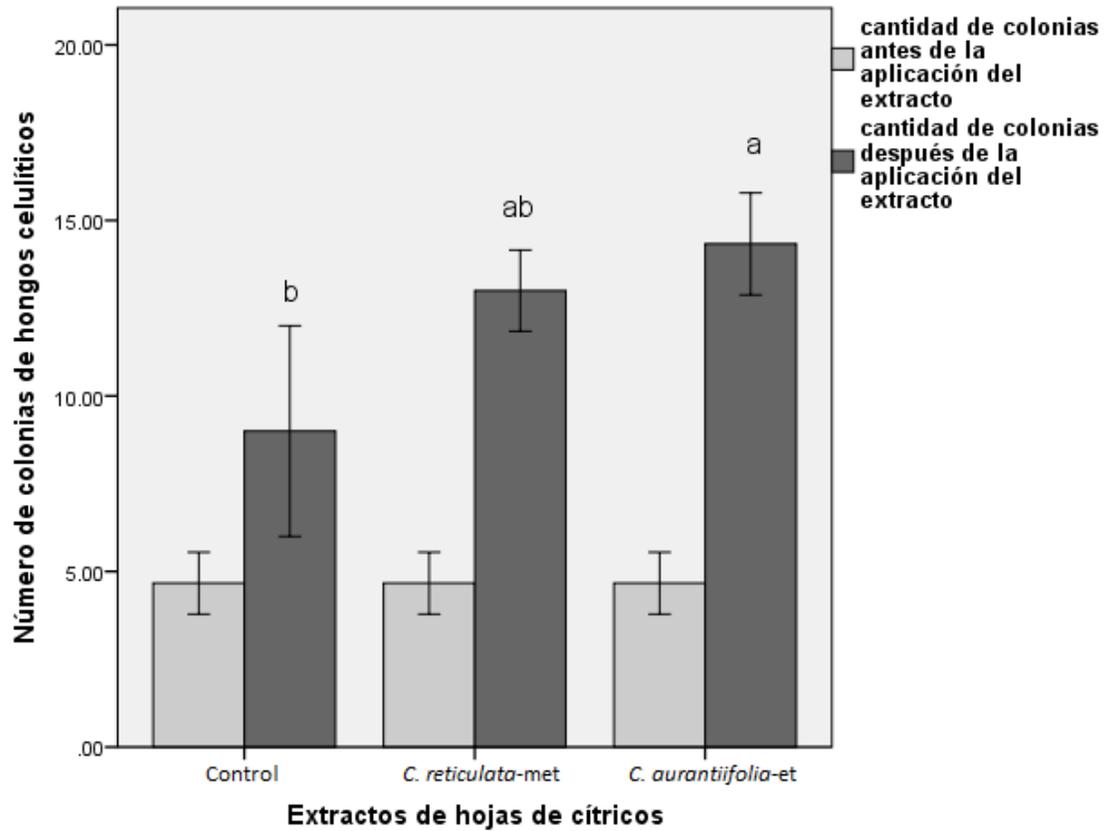


**Figura 9.** Número de colonias de actinomicetos presentes en el suelo antes y después de la aplicación de extractos de hojas *C. aurantiifolia* en etanol 70% y *C. reticulata* en metanol 70%. (Wilcoxon  $p < 0.05$ )

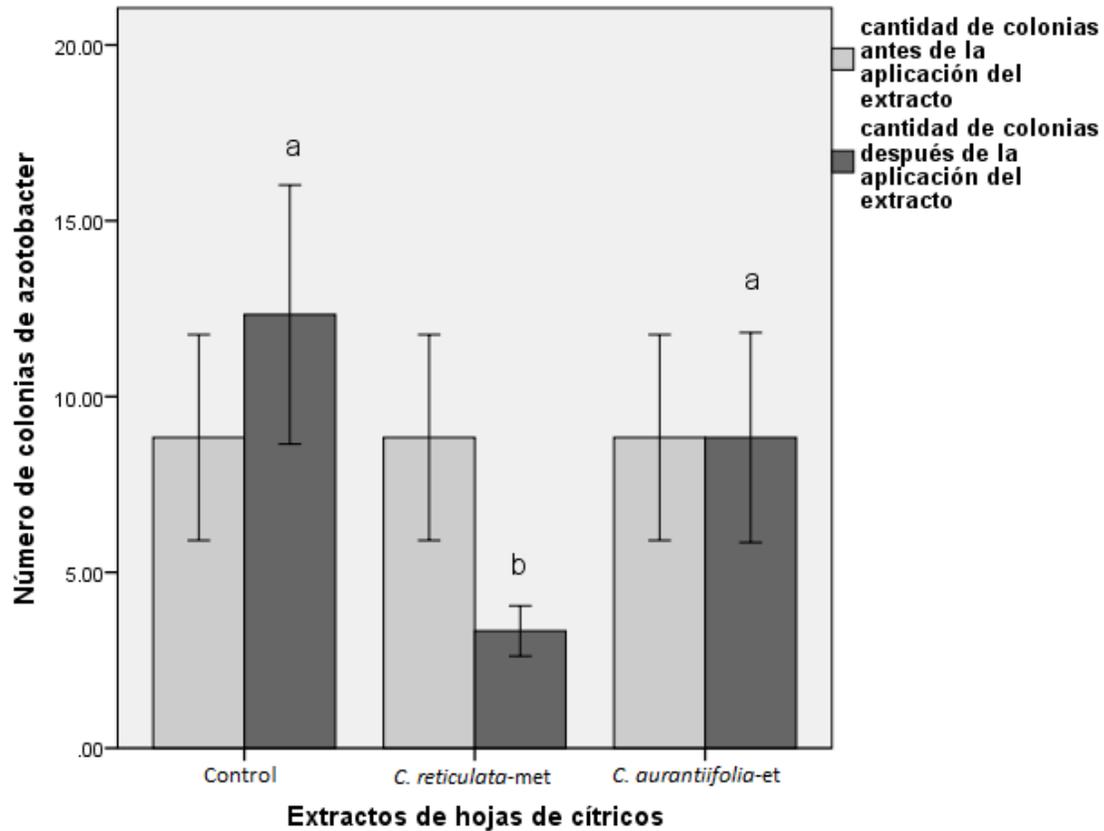
El número de colonias de bacterias totales y hongos celulíticos, aumentaron significativamente cuando se emplearon los extractos evaluados con respecto al número de colonias presentes en el suelo no tratado. Cuando se empleó el extracto de *C. aurantiifolia* en etanol 70% se obtuvieron los mayores valores (Figura 10 y 11).



**Figura 10.** Número de colonias de bacterias totales presentes en el suelo antes y después de la aplicación de extractos de hojas *C. aurantiifolia* en etanol 70% y *C. reticulata* en metanol 70%. Letras distintas en las barras indican que las medias de los tratamientos difieren estadísticamente para  $p \leq 0,05$  (Wilcoxon).



**Figura 11.** Número de colonias de hongos celulíticos presentes en el suelo antes y después de la aplicación de extractos de hojas *C. aurantiifolia* en etanol 70% y *C. reticulata* en metanol 70%. Letras distintas en las barras indican que las medias de los tratamientos difieren estadísticamente para  $p \leq 0,05$  (Wilcoxon).



**Figura 12.** Número de colonias de azotobacter presentes en el suelo antes y después de la aplicación de extractos vegetales de hojas de *C. aurantiifolia* en etanol 70% y *C. reticulata* en metanol 70%. Letras distintas en las barras indican que las medias de los tratamientos difieren estadísticamente para  $p \leq 0,05$  (prueba T para muestras relacionadas).

El número de colonias de azotobacter no se afectaron cuando se empleó el extracto de *C. aurantiifolia* en etanol 70% con respecto al número de colonias presentes en el suelo no tratado (Figura 12). Sin embargo, cuando se empleó el extracto de hojas de *C. reticulata* en metanol 70% el número de colonias disminuyó considerablemente.



## 5. Discusión

### 5.1 Obtención de extractos hidroalcohólicos de hojas de *C. reticulata* y *C. aurantifolia*

El género *Citrus* es originario de Asia tropical (Chanthaphon *et al.*, 2008), pero se encuentra distribuido por toda la zona tropical y subtropical (Saonere, 2011); siendo los mayores productores Brazil, China, Estados Unidos, Europa y México (Bernardi *et al.*, 2010). Dentro de este género se incluyen la naranja, la mandarina, la lima, el limón y la toronja (Siddique *et al.*, 2011), todas estas plantas son ricas en metabolitos secundarios (Johann *et al.*, 2007) entre los que se encuentran azúcares, terpenoides (Ekwenye y Edeha, 2010), compuestos fenólicos como los flavonoides (Gashemi *et al.*, 2009) y carotenoides (Afshar *et al.*, 2011).

Los métodos de extracción permiten la separación de los compuestos biológicamente activos de las plantas con el empleo de solventes con similar polaridad a la de éstos (Tiwari *et al.*, 2011); las técnicas de extracción tradicionales provocan la degradación de parte de los elementos biológicamente activos ya que son expuestos a elevadas temperaturas por largos períodos de tiempo (Kamran *et al.*, 2010) y requieren grandes cantidades de solvente (Wang *et al.*, 2006). En este estudio se utilizó como método de extracción la técnica de extracción asistida por ultrasonido, y se obtuvieron extractos con elevada concentración de metabolitos secundarios en 20 minutos, sin el empleo de solventes orgánicos.

La extracción asistida por ultrasonido ha sido empleada frecuentemente para la extracción de fenoles totales (Ma *et al.*, 2009). El ultrasonido provoca el aumento de la permeabilidad de la membrana citoplasmática de las células de las plantas provocando su apertura por un proceso de cavitación (Swami *et al.*, 2008), lo que facilita la salida de elementos del interior de la célula al solvente (Santos *et al.*, 2013). Esta técnica comparada con las técnicas de extracción tradicionales favorece la extracción de un máximo de obtención de constituyentes biológicos en un menor tiempo, con un menor costo (Ma *et al.*, 2008), con menos riesgos de contaminación y en donde se use menor cantidad de solvente (Wang *et al.*, 2006).

### 5.2 Cuantificación del contenido de fenoles totales.

Los compuestos fenólicos poseen múltiples propiedades, lo que ha favorecido el desarrollo de métodos para su identificación y cuantificación, entre las que se incluyen técnicas cromatografías y espectrofotométricas (Lorrain *et al.*, 2013). El método de Folin Ciocalteu (1927), es un método colorimétrico (Luís *et al.*, 2012) y espectrofotométrico (Khoddami *et al.*, 2013) estándar para la cuantificación de fenoles (Medina *et al.*, 2011), que se basa en



la capacidad de los fenoles para reaccionar con agentes oxidantes. El reactivo de Folin Ciocalteu contiene molibdato y tungstato sódico, que reaccionan con cualquier tipo de fenol (Gutiérrez *et al.*, 2008) y forman complejos fosfomolibdico-fosfotúngstico (Stratil *et al.*, 2008). La transferencia de electrones a pH básico reduce los complejos fosfomolibdico-fosfotúngstico en óxidos cromógenos de color azul intenso (Jadhav *et al.*, 2012), de tungsteno ( $W_8O_{23}$ ) y molibdeno ( $Mo_8O_{23}$ ), siendo proporcional este color al número de grupos hidroxilo de la molécula (Gutiérrez *et al.*, 2008). El método de Folin Ciocalteu es un método de cuantificación rápido y es válido en cuanto a repetitividad, reproducibilidad, linealidad y precisión (Butnariu *et al.*, 2012); no obstante, existen diferencias en cuanto a la unidad de medida empleada para los resultados analíticos, porque se utilizan indistintamente mg equivalentes de ácido gálico/g de peso fresco (Lu *et al.*, 2011), mg equivalentes de ácido gálico/g de extracto pesado (Lobo *et al.*, 2011; Abdullah *et al.*, 2012), g de ácido gálico/g de extracto seco (Cepoi *et al.*, 2009) y mg equivalentes de ácido gálico/g de corteza fresca o pulpa fresca (López *et al.*, 2010) mg equivalentes de ácido gálico/ g de muestra (Ho *et al.*, 2010), lo cual impide una adecuada comparación entre resultados de diferentes trabajos científicos.

Se han realizado cuantificaciones de fenoles en extractos acuosos de *Citrus aurantiifolia* y de jugos del fruto de *Citrus reticulata* que muestran concentraciones superiores a los  $404,27 \pm 2,89$  mg equivalentes de ácido gálico/100 g de extracto (Hameed, 2009) y 800  $\mu$ g equivalentes de ácido gálico/mL de extracto (Rekha *et al.*, 2012), respectivamente. Los extractos evaluados en el presente trabajo se obtuvieron a una concentración de 0,1 gramo de material vegetal por mL de solvente, los resultados de la cuantificación de fenoles totales se expresaron en mg de ácido gálico/mL de extractos, por lo que las concentraciones de fenoles totales obtenidas son modularmente superiores. Lo anterior demuestra que las hojas de estas plantas son una excelente fuente de obtención de estos metabolitos bioactivos y corrobora que la técnica de extracción empleada es efectiva para estos fines.



### **5.3 Determinación de la actividad antifúngica *in vivo* de extractos hidroalcohólicos de hojas de *C. reticulata* y *C. aurantifolia***

#### **5.3.1 Estandarización del uso del inóculo infectivo para la determinación de la actividad antifúngica *in vivo* de extractos hidroalcohólicos de *C. reticulata* y *C. aurantifolia* en plantas de tomate.**

En el proceso de desarrollo de una enfermedad es de mucha importancia el modo de inoculación mediante el cual el patógeno (inóculo) se pone en contacto con el hospedante a través de diferentes formas (Herrera y Mayea, 1994).

En experimentos *in vivo*, generalmente, se utilizan dos formas de inóculo infectivo: suspensiones de conidios (Saleem *et al.*, 2011) y suspensiones de micelio (Cruz *et al.*, 2010); ambas son formas de inóculo infectivo rápidas, fáciles, prácticas, reproducibles para la inducción de la enfermedad en condiciones de campo (Bernal *et al.*, 2009 y Leiva *et al.*, 2010). Éstas dos formas de inóculo infectivo han sido utilizadas en investigaciones para determinar la expresión de la resistencia sobre un determinado hospedante (Islam *et al.*, 2001; Nutsugah y Wilson, 2007; Rahmanpour *et al.*, 2011; Akhtar *et al.*, 2012), para determinar la efectividad de extractos vegetales (Sallam, 2011) y de extractos obtenidos a partir de antibióticos de bacterias con actividad antifúngica (Hwang *et al.*, 2001 y Lee *et al.*, 2003). Se han empleado también para probar la efectividad de microorganismos antagonistas (Bernal *et al.*, 2006 y Carrión *et al.*, 2011) y filtrados bacterianos (Cruz *et al.*, 2010), además se utilizan en estudios donde se caracteriza el desarrollo de diferentes enfermedades fúngicas (Vloutoglou y Kalogerakis, 2000).

Los hongos son diseminados generalmente por esporas aunque en algunos casos pueden esparcirse a partir de fragmentos de hifas y micelio (Agrios, 2005), para lo que utilizan disímiles mecanismos de dispersión por el aire, la lluvia, los vectores (Lucas, 1998), salpicaduras de agua y restos de cosechas (Martínez *et al.*, 2007). Anteriormente se ha demostrado la eficacia de suspensiones de conidios de *P. fulva* como inóculo infectivo en tomate para desarrollar el moho foliar del tomate (Bernal *et al.*, 2009), técnica que emplean la mayoría de los investigadores que trabajan con este patógeno (Matthieu *et al.*, 1989 y Džamić *et al.*, 2010). Sin embargo, también se ha demostrado la eficacia del empleo de suspensiones miceliales de *Mycosphaerella fijensis* como métodos para la inoculación artificial para el desarrollo de Sigatoka negra en plátano (Leiva *et al.*, 2010). *P. fulva* pertenece a la familia *Mycosphaerellaceae*, y posee semejanzas a *M. fijensis* en cuanto al ciclo de vida y modo de infección (Crous *et al.*, 2000). En el presente trabajo no se



encontraron diferencias entre las suspensiones miceliarias y las de conidios con respecto al porcentaje de área foliar afectada en la planta, lo que demuestra que se pueden emplear indistintamente una u otra forma de inoculo infectivo de *P. fulva* con estos fines.

### **5.3.2 Determinación del efecto de los extractos hidroalcohólicos de *Citrus reticulata* y *Citrus aurantifolia* en plantas de tomates *in vivo* en condiciones no controladas.**

Una enfermedad es el resultado de complejas interacciones entre un patógeno, la planta hospedante y el medio ambiente; en el caso de los hongos debe ocurrir antes del proceso de penetración, la germinación del mismo, asegurando el establecimiento del patógeno sobre la planta (Echemendía *et al.*, 2010).

En la literatura consultada no se han encontrado muchos trabajos de evaluación de actividad antifúngica de extractos vegetales frente a *P. fulva*.

El extracto de *C. reticulata* en metanol presentó los mejores resultados cuando se aplicó a las 24 horas, a las 48 horas y a las 24 y 48 horas post-inoculación, lo que sugiere que tiene una mayor actividad cuando se ha habido penetración del patógeno. Esto puede deberse al efecto que posee este extracto sobre la inhibición del crecimiento micelial de *P. fulva* por la presencia de compuestos como las quinonas (Iglesias, 2012). La actividad antimicrobiana de las quinonas se basa en su capacidad de formar complejos irreversibles con los aminoácidos hidrofílicos de las proteínas de membranas microbiales, lo cual conduce a la inactivación de estas. Su blanco más probable lo constituyen las adhesinas expuestas en la superficie de las membranas y los polipéptidos presentes en la paredes celulares (Domingo y López-Brea, 2003). Además, el radical  $O_2^-$  puede reaccionar al reducir quinonas y complejos de metales de transición Fe-Cu, afectando la actividad de enzimas que contengan estos metales (Camarena, 2006) y ocasionando estrés oxidativo, con la consecuente muerte celular.

Resultados similares se han alcanzado con extractos de *Achillea millefolium*, *Artemisia camphorata*, *Cymbopogon citratus* y *Rosmarinus officinalis* contra *P. fulva* en plantas de tomate (Itako *et al.*, 2009), así como con extractos de *Azadirachta indica*, *Cassia fistula* y *Cannabis sativa* contra *Sclerotium rolfsii* (Farooq *et al.*, 2010).

El extracto de *C. aurantiifolia* en etanol 70% mostró los mejores resultados a los siete y 14 días de evaluación cuando se empleó antes de la inoculación del hongo, lo que indica que este extracto tiene una actividad preventiva cuando se aplica antes de la llegada del hongo; esto puede deberse a la capacidad que tiene este extracto para inhibir la germinación de



esporas y el crecimiento micelial de *P. fulva* (Iglesias, 2012). La actividad antifúngica de este extracto se le atribuye a la presencia de flavonoides (Iglesias, 2012).

La actividad antimicrobiana de los flavonoides se debe a su capacidad de alterar las zonas hidrofóbicas e hidrofílicas de la membranas microbiales, interfiriendo con su fluidez, además de provocar la fusión de orgánulos citoplasmáticos (Saleem *et al.*, 2010). Del mismo modo, estos compuestos pueden formar complejos con la pared de las células microbianas y las proteínas solubles en el citoplasma, alterando la función de estas estructuras (Cushnie y Lamb, 2005). Los flavonoides también inhiben la síntesis de ADN y ARN microbiano, a consecuencia de que su anillo  $\beta$  se intercala en la doble hélice de la molécula, e interfiere con la incorporación de precursores radioactivos de los ácidos nucleicos, afectando así la síntesis proteica. Además, actúan como potentes inhibidores enzimáticos, debido a las interacciones que se producen entre el residuo de azúcar de su anillo aromático y el centro activo de las proteínas. Estos polifenoles pueden potenciar su actividad antimicrobiana al combinarse con residuos metálicos y al actuar de modo sinérgico con otros flavonoides (Cushnie y Lamb, 2005). Además, los flavonoides pueden afectar diferentes componentes de la cadena respiratoria siendo el complejo II (succinato deshidrogenada) uno de los más sensibles a la acción de estos metabolitos (Hodnick, *et al.*, 1986; Trassi *et al.*, 2007). Todos estos modos de acción pudieran explicar el efecto preventivo de este extracto. Resultados similares se han obtenido con la aplicación de extractos de *Lippia dulcis* (Trev.) sobre plantas de tomate antes de la inoculación de *Alternaria solani* (Pupo, 2007).

El extracto de *C. aurantifolia* en etanol 70% también exhibió buenos resultados en la evaluación a los 14 días de inoculación cuando se aplicó a las 24 horas y cuando se aplicó a las 48 horas post-inoculación, por lo que podría tener un importante efecto curativo, luego de la penetración del patógeno. Esto puede deberse a que los flavonoides, como se había mencionado anteriormente actúan como potentes inhibidores enzimáticos, debido a las interacciones que se producen entre el residuo de azúcar de su anillo aromático y el centro activo de las proteínas. Estos polifenoles pueden potenciar su actividad antimicrobiana al combinarse con residuos metálicos y al actuar de modo sinérgico con otros flavonoides (Cushnie y Lamb, 2005). Además, los flavonoides debido a sus características estructurales poseen bajos potenciales oxidativos que les permiten reducir el  $\text{Fe}^{3+}$  y el  $\text{Cu}^{2+}$  para sufrir una autooxidación, o incluso involucrarse en un proceso de ciclaje redox, actuando de esta manera como agentes prooxidantes (Martínez *et al.*, 2002 y Pérez, 2003); de esta forma, pudieran inhibir la enzima SOD citoplasmática Cu-Zn. Por otra parte, también se ha



demostrado que flavonoides con un grupo catecólico, como miricetina, baicaleína, quercetina, epicatequina, catequina y fisetina, son capaces de generar  $H_2O_2$  en solución amortiguadora acetato pH 7,4, al donar un átomo de hidrógeno de su estructura al oxígeno por conducto de un  $O_2^-$ . (Miura *et al.*, 1998). También, la naringenina, la naringina, la hesperitina y la apigenina, por medio de sus respectivos radicales fenoxilos prooxidantes, pueden oxidar al NADH en el sistema peroxidasa/  $H_2O_2$ , los radicales NAD originados pueden generar  $H_2O_2$  en el medio (Chan *et al.*, 1999), todo lo cual contribuye a la generación de estrés oxidativo, mecanismo que pudiera ocasionar la muerte celular.

Resultados similares se han obtenido a las 24 horas post-inoculación con la aplicación de extractos de *Cleome viscosa*, *Lantana camara* y *L. dulcis* contra *A. solani* en plantas de tomate (Pupo *et al.*, 2007), y con extractos de *Hedera helix* y *Paeonia suffruticosa* contra *P. infestans* también en tomate (Röhner *et al.*, 2003)

#### **5.4 Determinación del efecto de los extractos hidroalcohólicos de *Citrus reticulata* y *Citrus aurantifolia* en la microbiota del suelo.**

El suelo es considerado un espacio heterogéneo definido por sus características físicas, químicas y biológicas, que bajo condiciones naturales tiende a desarrollar un equilibrio dinámico entre sus diferentes atributos, lo que genera las condiciones adecuadas para una diversidad de organismos principalmente bacterias y hongos (Reyes y Valery, 2007). La microbiota del suelo juega un papel importante en el ecosistema ya que participa en la adquisición de nutrientes, en el ciclo del nitrógeno, carbono y biogeoquímicos y además, en la formación del suelo (van der Heijden *et al.*, 2008) también juega un papel importante en la fertilidad, (Reyes y Valery, 2007) y en la detoxificación de residuos de fungicidas (Sherif *et al.*, 2011). Algunos de los microorganismos del suelo producen compuestos con propiedades antimicrobiales y antifúngicas por lo que son usados como control biológico (Kristek *et al.*, 2006). Debido a la importancia de la microbiota del suelo, probar el efecto de fungicidas sobre éste, tiene gran significación, porque aunque no se apliquen directamente sobre el suelo (Martínez *et al.*, 1998) pueden tener efectos perjudiciales sobre ellos (Fawole y Olowonih, 2009).

Los extractos de limón etanol y mandarina metanol, probados en este trabajo no dañaron la microbiota del suelo, en contraste con los fungicidas químicos que provocan daños sobre el suelo ya que reducen el número de microorganismos, actividad bioquímica y diversidad (Monkiedje y Spiteller, 2005; Cycoń y Piotrowska, 2007; Fawole y Olowonih, 2009), afectan la germinación de esporas y el crecimiento de las hifas de algunos hongos y micorrizas (Zou



*et al.*, 2007; Chiocchio *et al.*, 2000) los que provoca la ruptura de la cadena alimenticia y con ello el disturbio del balance natural (Sherif *et al.*, 2011).

Los extractos de hojas de *C. aurantiifolia* en etanol 70% y *C. reticulata* en metanol 70% pueden considerarse una alternativa como estrategia de control de *P. fulva* en plantas de tomate, que no causa daños adversos al ecosistema.



## 6. Conclusiones

1. Las suspensiones de conidios y de propágulos, permitieron una correcta infección y desarrollo de los síntomas de la enfermedad en plantas de tomate, tanto a los 7 como a los 14 días de inoculación.
2. El extracto de *C. reticulata* en metanol 70% resultó efectivo en el control de *P. fulva*, mostrando un efecto curativo, mientras que el extracto de *C. aurantiifolia* en etanol 70% fue efectivo con efecto preventivo y curativo.
3. Los extractos de *C. reticulata* en metanol 70% y *C. aurantiifolia* en etanol 70% no presentaron efectos negativos sobre la microbiota del suelo.



## **7. Recomendaciones**

4. Determinar de la actividad antifúngica en condiciones no controladas con una aplicación del extracto evaluado, a los siete días de la inoculación.
5. Determinar de la actividad antifúngica en condiciones no controladas con los extractos a otras concentraciones de fenoles totales con el fin de optimizar su utilización.
6. Realizar pruebas de toxicidad tópica del extracto en humanos.



## Referencias Bibliográficas

Abad, M.J, M. Ansuategui y P. Bermejo (2007): Active antifungal substances from natural sources. **ARKIVOC**. 7: 116-145.

Abdullah, N., W. Saidatul. Z. Samicho, K. Sykirah y N. Aziman (2012): Study on antioxidant capacity and phenolic content of various parts of wax gourd (*Benincasa hispida*). **World Appl. Sci. J.** 19:1051-1056.

Acevedo, L. R. y M. S. García (2007): Antifungal activity of a protean extract from *Amaranthus hypochondriacus* seeds. **J. Mex. Chem. Soc.** 51:136-140.

Afshar, M. M., Z. Mobrami y R., H. Sajedi (2011): Bioactive compounds and antioxidant capacities in the flavedo tissue of two citrus cultivars under low temperatura. **Braz. J. Plant. Physiol.** 23:203-208.

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

Ahmed, S., N. Zaman y S. N. Khan (2012): Management of root rot disease of groundnut (*Arachis hypogaeae* L.) by plant extracts. **Afr J. Microbiol. Res.** 6:4489-4494.

Ahmed, S., y A. M. Abdelgaleil (2005): Antifungal activity of extracts and sesquiterpene lactones from *Magnolia grandiflora* L. (*Magnoliaceae*). **Int. J. Agri. Biol.** 7: 638-642

Akhatar, K. P., M. Y. Saleem, M. Asghar, S. Ali, N. Sarwar y M. T. Elahi (2012): Resistance of *Solanum* species to *Phytophthora infestans* evaluated in the detached-leaf and whole-plant assays. **Pak J. Bot.** 44: 1141-1146.

Al.Mughrabi, K.I., T. A. Aburjai, G. H. Anfoka y W. Shahrour (2001): Antifungal activity of olive cake extracts. **Phytopathol. Mediterr.**40:240-244.

Alain Hno. (1957): **Flora de Cuba. 4.** Contr. Ocas. Mus. Hist. Nat. Colegio "De La Salle" 16, La Habana. 556 pp.

Alam, A. (2012): Antifungal activity of *Plagiochasma rupestre* (Forst.) Steph. Extracts. **Researcher.** 4: 62-64.

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



Alghazeer, R., H. El- Saltani, N. Saleh, A. Al-Najjar y F. Hebail (2012): Antioxidant and antimicrobial properties of five medicinal Libyan plants extracts. **Natural Science**. 4:324-335.

Amini, M., N. Safaie, M.J. Salmani y M. Shams-Bakhsh (2012): Antifungal activity of three medicinal plant essential oils against some phytopathogenic fungi. **Trakia J. Sci**. 10:1-8.

Arie, T; H. Takahashi, M. Kodama, T. Teraoka (2007): Tomato as a model plant for plant-pathogen interactions. **Plant Biotechnol**. 24: 135–147.

Aslam, A., F. Naz, M. Arshad, R. Qureshi y C. A. Rauf (2010): In vitro antifungal activity of selected medicinal plant diffusates against *Alternaria solani*, *Rhizoctonia solani* and *Macrophomina phaseolina*. **Pak. J. Bot**. 42:2911-2919.

Badillo, L.M.D., R.E.M. Muñoz, R. S. Garciglia, M. M. M. Pacheco (2010): In vitro antioomycete activity of *Artemisia ludoviciana* extracts against *Phytophthora* spp. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**. 9:136-142.

Bahraminejad, S. (2012): In vitro and in vivo antifungal activities of Iranian plant against *Pythium aphanidermatum*. **Ann. Biol. Res**. 3: 2134-2143.

Benítez, A. L., S. R. L. Betancuort, M. E. V. Badillo, S. A. R. Herrera, M. M. Elos y E. Padrón (2005): Inhibición del crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum* Schlechtend. *F. sp lycopersici* (Sacc). Snyder y Hansen, *Rhizoctonia solani* Kühn y *Verticillium dahliae* Kleb. Mediante extractos vegetales acuosos. **Revista Mexicana de Fitopatología**. 23:183-190.

Bernal, A, J.F. Zamora, G.V. Callero y R. Nuño (2005): Actividad biológica in vitro de extractos de *Lupinus* spp. sobre hongos fitopatógenos. **Revista Mexicana de Fitopatología**. 23: 140-146.

Bernal, A., B. Martínez y D. Infante (2009): Método para evaluar la respuesta de genotipos de tomate inoculados con *Passalora fulva* (Cooke) U. Braun y Crous en invernadero. **Rev. Protección Veg**. 24:102-105.

Bernal, A., I. G. Martínez, M. D. Castellanos, L. H. Isla y B. Martínez (2006): Empleo de cepas de bacterias antagonistas en el control de *Stemphylium solani* Webber en tomate bajo cultivo protegido. **Centro Agrícola**. 3:37-40.



Bernal, A., M. Díaz, C. Huerres, D. Cabrera, M. González y G. Pérez (2003): Incidencia de enfermedades fúngicas en híbridos de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) bajo condiciones de cultivo protegido. **Centro Agrícola**.30:91-93.

Bernal, B., L. Hernández y F. Cabrera (2010): Registro de plagas en el híbrido de tomate HA-3057 bajo condiciones protegidas. **Fitosanidad**. 14:185-187.

Bernardi, J., C. Licciardello, M. P. Russo, M. L. Chiusano, G. Carletti, G. Reforgiato y A. Marocco (2010): Use of a custom array to study differentially expressed genes during blood orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) ripening. **J. Plant Physiol.**167: 301-310.

Bhardwaj, S. K. (2012): Evaluation of plant extracts as antifungal agents against *Fusarium solani* (Mart.) **Sac. World J. Agric. Sci.** 8:385-388.

Butnariu, M. y C. Z. Coradini (2012): Evaluation of biologically active compounds from *Calendula officinalis* flowers using spectrophotometry. **Chemistry Central Journal**. 6: 1-7.

Camarena, G (2006): Las especies reactivas del oxígeno en defensa de las plantas contra patógenos. **Revista Chapingo. Serie Ciancias Forestales y del Ambiente**. 12:25-30

Carravedo, F. M. (2006): **Variedades autóctonas de tomates de Aragón**. Editorial Centro de Investigación de Tecnología Alimentaria de Aragón (CITA), Zaragoza, España, 238pp.

Carrión, A. R., A. D. Santos, L. H. Isla y R. C. Santana (2011): Utilización de antagonistas como una alternativa ecológica en el control de enfermedades foliares en tomate. **Centro Agrícola**. 38: 37-43.

Casanova, S. A. et al. (2007): **Manual para la producción protegida de hortalizas**. Editorial Liliana Instituto de Investigaciones Horticolas Liliana Dimitrova, La Habana, Cuba, 138pp.

Cepoi, L., L. Rudi, V. Miscu, A. Cojocari, T. Chiriac y D. Sadovnic (2009): Antioxidative activity of ethanol extracts from *Spirulina platensis* and *Nostoc linckia* measured by various methods. *Anaie Universității din Oradea, Fascicula Biologie*. Tom. 16: 43-48 pp.

Chan, T., G. Galati, P. J. O' Brien (1999): Oxygen activation during peroxidase catalyzed metabolism of flavones or flavanones. **Chem. Biol. Interact**. 122:15-25.



Chanthaphon, S., S. Chanthachum y T. Hongpattarakere (2008): Antimicrobial activities of essential oils and crude extracts from tropical *Citrus* spp. against food-related microorganisms. **Songklanakarín J. Sci. Technol.** 30:125-131.

Chiocchio, V., N. Venedikian, A. E. Martinez, A. Menendez, J. A. Ocampo y A. Godeas (2000): Efecto del fungicida benomyl on spore germination and hyphal length of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. **Internatl. Microbiol.** 3:173-175.

Chutia, M, P.D. Bhuyan, M.G. Pathak, T.C. Sarma y P. Boruah (2009): Antifungal activity and chemical composition of *Citrus reticulata* Blanco essential oil against phytopathogens from North East India. **Food Sci. Technol.** 42: 777-780.

Costa, J. M., E. Heuvelink, P. Lindhout, M. Dorais, M. E. Saltveit, M. M. Peet, A. A. Csizinszky, D. J. Schuster, J. B. Jones, J. C. Lenteren y G. W. H. Welles (2005): **Tomatoes**. Editorial CABI Publishing, Wageningen, Netherlands, 325pp.

Cravotto, G., L. Boffa, S. Mantegna, P. Perego, M. Avogadro y P. Cintas (2008): Improved extraction of vegetable oils under high-intensity ultrasound and/or microwaves. **Ultrasonics Sonochem.** 15: 898-902.

Crous, P. W., A. Aptroot, J-C Kang, U. Braun y MJ Wingfield (2000): The genus *Mycosphaerella* and its anamorph. *Studies of Mycology.* 45:107-121.

Cruz, M., Y. Alvarado, M. Acosta, B. Roque y M. Leiva (2010): Efecto de filtrados cultivo bacterianos con actividad antifúngica in vitro en la interacción *Musa* spp.-*Mycosphaerella fijensis*. **Biotecnología Vegetal.** 10:99-104.

Cushnie, T y Lamb, A (2005): Antimicrobial activity of flavonoids. **Int. J. Antimicrob. Agents.**26:343-356.

Cvetnić, Z. y S. V. Knežević (2004): Antimicrobial activity of grapefruit seed and pulp ethanolic extract. **Acta Pharm.** 54: 243-250.

Cycoń, M. y Z. Piotrowska-Seget (2007): Effect of selected pesticides on soil microflora involved in organic matter and nitrogen transformations: pot experiment. **Pol. J. Ecol.** 55: 207-220.



Damicone, J y Brandenberger, L (1993): Common Diseases of Tomatoes. Part I. Diseases Caused by Fungi. Division of Agricultural Sciences and Natural Resources. Oklahoma State University.

Dawar, S., S. Khaliq y M. Tariq (2010): Comparative effect of plant extract of *Datura alba* Ness and *Cynodon dactylon* (L.) Pers., alone or in combination with microbial antagonists for the control of root rot disease of cowpea and okra. **Pak. J. Bot.** 42:1273-1279.

Deepak, S.A, G. Oros, S.G. Sathyanarayana, H. Shekar y S. Sashikanth (2007): Antisporulant Activity of Watery Extracts of Plants against *Sclerospora graminicola* Causing Downy Mildew Disease of Pearl Millet. **Am. J. Agril. & Biol. Sci.** 2: 36-42.

Delgado, V., A. Ibacache, C. Theoduloz y J. A. Valderrama (2012): Synthesis and in vitro cytotoxic evaluation of aminoquinones structurally related to marine isoquinolinequinones. **Molecules.** 17: 7042-7056.

Dhanavade, M.J, C.B. Jalkute, J.S. Ghosh y K.D. Sonawane (2011): Study Antimicrobial Activity of Lemon (*Citrus lemon* L.) Peel Extract. **Br. J. Pharmacol. Toxicol.** 2: 119-122.

Ding, T., T. Jiang, J. Zhou, L. Xu y Z. M. Gao (2010): Evaluation of antimicrobial activity of endophytic fungi from *Camptotheca acuminata* (Nyssaceae). **Genet. Mol. Res.** 9:2104-2112.

Djoukeng, J., V. Arbona, R. Argamasilla y A. Gomez (2008): Flavonoid profiling in leaves of *Citrus* genotypes under different environmental situations. **J. Agric. Food Chem.** 56:11087-11097.

Domingo, D y López-Brea, M (2003): Plantas con acción antimicrobiana. **Rev. Esp. Quimoterap.** 16: 385-393.

Dueñas, F., Y. Martínez, M. Álvarez, C. Moya, B. Peteira, Y. Arias, M.J. Diez, P. Hanson y T Shagarodsky (2008): Caracterización agromorfológica y evaluación de la resistencia al TYLCV en nuevos genotipos de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) como apoyo al Programa de Mejoramiento Genético de la Hortaliza para la Enfermedad. **Cultivos Tropicales.** 29: 53-60.

Duru, Ch. M. y N. E. Onyedineke (2010): In vitro antimicrobial assay and phytochemical analysis of ethanolic extracts of *Voacanga africana* seed. **Journal of American Science.** 6:119-122.



Dwivedi, S. K. y N. Dwivedi (2012): Antifungal activity of some plant extracts against guava wilt pathogen. **International Journal of Environmental Sciences**. 3: 412-420.

Džamić, A. M., M. D. Soković, M. S. Ristić, M. Novaković, S. Grujić, V. Tešević y P. D. Marin (2010): Antifungal and antioxidant activity of *Mentha longifolia* (L.) Hudson (*Lamiaceae*) essential oil. **Bot. Serb.** 34: 57-61.

Echemendía, M. (2010): **Sanidad Vegetal**. Tomo 1. Editorial Félix Varela, La Habana, Cuba, 161pp.

Ekwenye, U. N. y O. V. Edeha (2010): The antibacterial activity of crude leaf extract of *Citrus sinensis* (Sweet orange). **International Journal of Pharma and Bio Sciences**. 1: 742-750.

Escalona, V; P. Alvarado, V. Hernán, C. Urbina y A. Martín (2009): Manual de cultivo del tomate *Lycopersicum esculentum*. Facultad de CS. Agronómicas. Universidad de Chile.

Escobar, I., J.J. Berenguer, M. Navarro y J. Cuartero (2012): **La calidad gustativa y nutricional como atributos para liderar el mercado de tomate en fresco**. Editorial Caja Rural de Granada, Granada, España, 80 pp.

Farooq, M. A., U. Iqbal, Sh. M. Iqbal, R. Afzal y A. Rasool (2010): In-vitro evaluation of different plant extracts on mycelial growth of *Sclerotium rolfsii* the cause of root rot of sugar beet. **Mycopath.** 8:81-84.

Fawole, O. B., M. Aluko y T.E. Olowonibi (2008 & 2009): Effects of a carbendazim-mancozeb fungicidal mixture on soil microbial populations and some enzyme activities in soil. **Agrosearch**. 10:65-74.

Fawzi, E.M, A.A. Khalil y A.F. Afifi (2009): Antifungal effect of some plant extracts on *Alternaria alternata* and *Fusarium oxysporum*. **Afr. J. Biotechnol.** 8: 2590-2597.

Florido, M., M. Alvarez, R. M. Lara, D. Plana, A. Caballero, R. Florido, T. Shagarodsky y C. Moya (2008): Análisis de la variabilidad morfoagronómica en la colección de tomate (*Solanum* L. sección *Lycopersicon* subsección *Lycopersicon*) conservada ex situ en Cuba. **Cultivos Tropicales** J. 29: 43-48.

Food and Agriculture Organization of The United Nations (<http://www.faostat.fao.org>).

Fungal Database Nomenclature and Species Banks. (<http://www.mycobank.org>).



Ghafar, M. F. A., K. N. Prasad, K. K. Weng y A. Ismail (2010): Flavonoid, hesperidine, total phenolic contents and antioxidant from *Citrus* species. **Afr J. of Biotechnol.** 9: 326-330.

Ghasemi, K., Y. Ghasemi y M. A. Ebrahimzadeh (2009): Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of 13 citrus species peels and tissues. **Pak. J. Pharm. Sci.** 22: 277-281.

Gómez, O. y A. Casanova (2000): **Mejora genética y manejo del Cultivo del Tomate para la producción en el Caribe.** Editorial Instituto de Investigaciones "Liliana Dimitrova", La Habana, Cuba, 159pp.

Gosh, S., E. Subudhi y S. Nayak (2008): Antimicrobial assay of *Stevia rebaudiana* Bertoni leaf extracts against 10 pathogens. **Int. J. Integr. Biol.** 2:27-31.

Guenkov, G. (1996): **Fundamentos de la Horticultura Cubana.** Editorial Ciencia y Técnica, La Habana, Cuba, 355pp.

Gülay, F., A. Tavman, B. Dülger y G. Türker (2009): Antimicrobial activity of turkish *Citrus* peel oils. **Pak. J. Bot.** 41:3207-3212.

Gupta, A, M. Naraniwal y V. Kothatari (2012): Modern extraction methods for preparation of bioactive plant extracts. **IJANS.** 1: 8-26.

Gurjar, M. S., Sh. Ali, M. Akhtar y K. S. Singh (2012): Efficacy of plant extracts in plant disease management. **Agricultural Sciences.** 3:425-433.

Gutiérrez, D. M., Ch A. Ortiz y A. Mendoza (2008): Medición de Fenoles y Actividad Antioxidante en Malezas Usadas para Alimentación Animal. Simposio de Metrología 2008. Santiago de Querétaro, México.

Hamdi, Y. A. (1985): La fijación del Nitrógeno en la explotación de los suelos. **Boletín de suelos de la FAO.** Roma, Italia.188pp.

Hameed, S. (2009): Antioxidant properties of water extracts for the Iraqi plants *Phoenix dactylifera*, *Loranthus europeas*, *Zingiber officinalis* y *Citrus aurantifolia*. **Mod. Appl.Sci.** 3: 161-166.

Haouala, R., S. Hawala, A. El-Ayeb, R. Khanfir y N. Boughanmi (2008): Aqueous and organic extracts of *Trigonella foenum* L. inhibit the mycelia growth of fungi. **Journal of Environmental Sciences.** 20:1453-1457.



Hayashi, A., A. C. Gillen y J. R. Lott (2000): Effects of daily oral administration of quercetin chalcone and modified *Citrus* pectin implanted colom-25 tumor growth in balb-c mice. **Alternative Medicine Review**. 5:546-552.

Herrera, L. y S. Mayea (1994): **Fitopatología General**. Editorial Félix Varela, La Habana, Cuba, 343pp.

Herzog, L. J., L. M. Rista, M. Sillon, G. Herzog y M. Hecklein (1998): *Alternaria solani* en tomate bajo invernaderos: relación entre número de esporas, enfermedad potencial y monocultivo. **Revista FAVE**. 12:49-55.

Ho, S. T., Y. T. Tung, K. Ch. Cheng y J. H. Wu (2010): Screening, determination and quantification of major antioxidants from *Balanophora laxiflora* flowers. **Food Chem**. 122:584-588.

Hodnick, W. F., F. S. Kung, W. J. Roettger, C. W. Bohmont, R. S. Pardini (1986): Inhibition of mitochondrial respiration and production of toxic oxygen radicals by flavonoids. A structure activity study. **Biochem. Pharmacol**. 35:2345-2357.

Huerres, C. y N. Caraballo (1988): **Horticultura**. Editorial Pueblo y Educación, La Habana, Cuba, 193pp.

Hussain, F., B. Ahmad, I. Hameed, G. Dastagir, P. Sanallah y S. Azam (2010): Antibacterial, antifungal and insecticidal activities of some selected medicinal plant of polygonaceae. **Afr. J. Biotechnol**. 9:5032-5036.

Hussain, H., K. Krohn, V. U. Ahmad, G. A. Miana y I. R. Green (2007): Lapachol: an overview. **ARKIVOV**.2:145-171.

Hussin, N.M, R. Muse, S. Ahmad, J. Ramli, M. Mahmood, M.R. Sulaiman, M.Y.A. Shukor, M.F.A. Rahman y K.N.K. Aziz (2010): Antifungal activity of extracts and phenolic compounds from *Barringtonia racemosa* L. (*Lecythidaceae*). **Afr. J. Biotechnol**. 8: 2835-2842.

Hwang, B. K., S. W. Lim, B. S. Kim, J. Y. Lee y S. S. Moon (2001): Isolation and invivo and in vitro antifungal activity of phenylacetic acid and sodium phenylacetic from *Streptomyces humidus*. **Appl. Environ. Microbiol**. 67:3739-3745.

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



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

Islam, M. T. y A. N. Faruq (2012): Effect of some medicinal plant extracts on damping-off disease of winter vegetable. **World Appl. Sci. J.** 17:1498-1503.

Islam, N., B. K. Pramanik, Md R. Khokon y M. Ashrafuzzaman (2001): Performance assessment of tomato advanced lines to late blight and early blight under Natural Epiphytotics. **Pakistan Journal of Biological Sciences.** 4:1361-1363.

Itako, A.T, K.R.F. Schwan-Estrada, J.R. Stangarlin, J.B. Tolentino, M.E.S. Cruz (2009): Controle de *Cladosporium fulvum* em tomateiro por extratos de plantas medicinais. **Arq. Inst. Biol.** 76: 75-83.

Jabeen, K. (2012): Antifungal activity of *Azadirachta indica* against *Alternaria solani*. **Journal of Life Sciences and Technologies.** 1:89-93.

Jadhav, A. P., J. A. Kareparamban, P. H. Nikam y V. J. Kadam (2012): Spectrophotometric estimation of ferulic acid from *Ferula asafoetida* by Folin-Ciocalteu's Reagent. **Der Pharmacia Sinica.** 3:680-684.

Johann, S, V. Lopes de Oliveira, M.G Pizzolatti, J. Schripsema, R. Braz-Filho, A. Branco, A. Smânia (2007): Antimicrobial activity of wax and hexane extracts from *Citrus* spp. peels. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** 102: 681-685.

Jones, J.B, J. Jones, R. Stall y T. Zitter (1997): Compendium of Tomato Diseases. **St. Paul, MN: APS Press.** 1: 1-5.

Jongedijk, E; H. Tigelaar, J. S .C. van Roekel, S. A. Bres-Vloemans, I. Dekker, P. J.M . van den Elzen, B. J .C. Cornelissen y L. S . Melchers (1995): Synergistic activity of chitinases and  $\beta$ -1,3-glucanases enhances fungal resistance in transgenic tomato plants. **Euphytica.** 85: 173 -180

Joosten, M. H. A. J. y P. J. G. M. De Wit (1989): Identification of several pathogenesis-related proteins in tomato leaves inoculated with *Cladosporium fulvum* (syn. *Fulvia fulva*) as  $\beta$ -1,3-Glucanases and Chitinases. **Plant Physiol.** 89:945-951.

Kamran, M, M. Abert-Vian, A. Fabiano-Tixier, O. Dangles y F. Chemat (2010): Ultrasound-assisted extraction of polyphenols (flavanone glycosides) from orange (*Citrus sinensis* L.) peel. **Food Chem.** 119: 851-858.



Ke-Qiang, C. y A. H. C. Bruggen (2001): Inhibitory efficacy of several plant extracts and plant products on *Phytophthora infestans*. **Journal of Agricultural University of Hebei**.

Khalil, A. B., B. F. Dabanehn y G. H. Anfoka (2005): Antifungal activity of medicinal plant from Jordan environment. **Plant Pathol. J.** 4: 130-132.

Khallil, A. R. M. (2001): Phytofungitoxic Properties in the Aqueous Extracts of Some Plants. **Pakistan Journal of Biological Sciences** .4:392-394.

Khanzada, S. A., S. M. Iqbal y A. Akram (2006): In vitro efficacy of plant leaf extracts against *Sclerotium rolfsii* Sacc. **Mucopath.** 4:51-53.

Khoddami, A., M. A. Wilkes y T. H. Roberts (2013): Techniques for analysis of plant phenolic compounds. **Molecules**.18: 2328-2375.

Kristek, S., A. Kristek, V. Guberac y A. Stanisavljević (2006): Effect of bacterium *Pseudomonas fluorescens* and low fungicide dose seed treatments on parasite fungus *Aphanomyces cochlioides* and sugar beet yield and quality. **Plant Soil Environ.** 52: 314-320.

Lee, J. Y., S. S. Moon y B. K. Hwang (2003): Isolation and antifungal and antioomycete activities of aerugine produced by *Pseudomonas fluorescens* strain MM-B16. **Appl. Environ. Microbiol.** 69:2023-2031.

Leiva, M., N. Veitía y Y. Alvarado (2010): Protocolo para la diferenciación de genotipos de papa mediante la inoculación artificial de suspensiones miceliales de *Alternaria solani* Sor. en cantero y campo. **Biotecnología Vegetal.** 6:45-49.

Leiva, M., Y. A. Capó, M. C. Martín, C. S. García y B. Roque (2010): Protocolo para la inoculación artificial de plantas de *Musa* spp. con *Mycosphaerella fijensis* y evaluación de su respuesta mediante variables epifitológicas y componentes de la resistencia. **Biotecnología Vegetal.** 10:79-88.

Lobo, R., V. Sodde, N. Dashora, N. Gupta y K. Prabhu (2011): Quantification of flavonoid and phenol content from *Macrosolen parasiticus* (L.) danser. **J. Nat. Prod. Plant Resour.** 1:96-99.

Lopes-Lutz, D., J. Dettmann, Ch. Nimalaratne y A. Schieber (2010): Characterization and quantification of polyphenols in amazon grape (*Pourouma cecropiifolia* Martius). **Molecules.** 15:8543-8552.



Lorrain, B., I. Ky, L. Pechamat y P. L. Teissedre (2013): Evolution of analysis of polyphenols from grapes, wines and extracts. **Molecules**. 18:1076-1100.

Lourenço, V, A. Moya, F. González-Candelas, I. Carbone, L. Mafia y E. Mizubuti (2009): Molecular Diversity and Evolutionary Processes of *Alternaria solani* in Brazil Inferred Using Genealogical and Coalescent Approaches. **Popul. Biol.** 99: 765-74.

Lu, X., J. Wang, H. M. Al-Qadiri, C. F. Ross, J. R. Powers, J. Tang y B. A. Rasco (2011): Determination of total phenolic content and antioxidant capacity of onion (*Allium cepa*) and shallot (*Allium oschaninii*) using infrared spectroscopy. **Food Chem.**129: 637-644

Lucas, J. A. (1998): **Plant Pathology and Plant Pathogens**. Blackwell Publishing, Berlin, Alemania, 274 pp.

Luís, A., N. Gil, M. Amaral, F. Dominges y A. Duarte (2012): *Ailanthus altissima* (Miller) Swingle: A source of bioactive compounds with antioxidant activity. **BioResources**. 7:2105-2120.

Ma, Y, X. Ye, Y. Hao, G. Xu, G. Xu y D. Liu (2008): Ultrasound-assisted extraction of hesperidin from Penggan (*Citrus reticulata*) peel. **Ultrason. Sonochem.** 15: 227-232.

Ma, Y. Q., J. Ch. Chen, D. H. Liu y X. Q. Ye (2009): Simultaneous extraction of phenolic compounds of citrus peel extracts: Effect of ultrasound. **Ultrasonics Sonochem.**16: 57-62.

Maharjan, B. L., K. Shrestha y S. Basnyat (2010): Botanical control of late blight of potato. **Nepal Journal of Science and Technology**. 11:37-40.

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

Manoj, J. y R. Kumar (2011): In vitro anthelmintic activity of aqueous and alcoholic extracts of *Citrus medica* leaves. **Der Pharmacia Lettre**. 3: 396-399.

Manzoor, M., F. Anwar, Z. Mahmood, U. Rashid y M. Ashraf (2012): Variation in minerals, phenolics and antioxidant activity of peel and pulp of different varieties of peach (*Prunus pérsica* L.) fruit from Pakistan. **Molecules**. 17: 6491-6506.

Martín, M. C., Y. A. Capó, M. A. Suárez, B. Roque y M. L. Mora (2010): Efecto de filtrados cultivo bacterianos con actividad antifúngica in vitro en la interacción *Musa* spp.-*Mycosphaerella fijensis*. **Biotecnología Vegetal**. 10: 99-104.



- Martínez, E., G. Barrios, L. Rovesti y R. Santos (2007): **Manejo Integrado de Plagas. Manual Práctico. Editorial Centro Nacional de Sanidad Vegetal (CNSV)**, Entrepueblos, Gruppo di Volontariato Civile (GVC), Cuba, España, Italia, 519pp.
- Martínez, M. V., V. Salmerón, B. Rodelas, C. Pozo y J. González (1998): Effects of the fungicide Captan on some functional groups of soil microflora. **Applies Soil Ecology**.7:245-255.
- Martínez-Flores, S., J. Gonzalez-Gallego, J. M. Culebras y M<sup>a</sup> J. Muñón (2002): Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. **Nutr.Hosp.** 17:271-278.
- Mayea, S., R. Novo, A. Valiño (1982): **Introducción a la microbiología del suelo**. Editorial Pueblo y Educación, La Habana, Cuba, 186pp.
- Medina, M. (2011): Determination of the total phenolics in juices and superfruits by a novel chemical method. **Journal of Functional Foods**. 3:79-87.
- Mishra, A, M. Amita, HK. Kehri, B. Sharma y AK. Pandey (2009): Inhibitory activity of Indian spice plant *Cinnamomum zeylanicum* extracts against *Alternaria solani* and *Curvularia lunata*, the pathogenic dematiaceous moulds. **Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.** 8:1-7.
- Miura, Y. H., I. Tomita, T. Watanabe, T. Hirayama, S. Fukui (1998): Active oxygen generation by flavonoids. *Biol. Pharm Bull.* 21:93-96
- Mohammad, A. (2011): The Price for Agricultural Products -Tomato. **Aust. J. Basic & Appl. Sci.** 5:2311-2315.
- Monkiedje, A. y M. Spiteller (2005): Degradation of metalaxyl and mefenoxam and effects on the microbiological properties of tropical and temperate soils. **Int. J. Environ. Res. Public Health.** 2:272-285.
- Moya, C., J. Arzuaga, I. Amat, L. Santiesteban, M. Álvarez, D. Plana, F. Dueñas, M. Florido, J. Hernández y E. Fonseca (2009): Evaluación y Selección participativa de nuevas líneas y variedades de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) en la región Oriental. **Cultivos Tropicales.** 30:66-72.
- Moya, C., M. Álvarez, J. Arzuaga, C. de la Fe, A. Caballero, M. Ponce, D. Plana, M. Florido, F. Dueñas, J. Rodríguez y J. Hernandez (2010): La selección participativa de variedades (SPV) en el cultivo de tomate. *Cultivos Tropicales.* 31:87-92.



Mvuemba, H. N., S. E. Green, A. Tsopmo y T. J. Avis (2009): Antimicrobial efficacy of cinnamon, ginger, horseradish and nutmeg extracts against spoilage pathogens. **Phytoprotection**. 90:65-70.

Naika, S., J. L. Jeude, M. Goffau, M. Hilmi y B. Dam (2005): **Cultivation of tomato, production, processing and marketing**. Editorial Agromisa Fundation and CTA, Wageningen, Netherlands, 91pp.

Narayanasamy, P. (2002): Microbial plant pathogens and crop disease management. Science Publishers, Inc., Enfield, NH, Estados Unidos, 553pp

Nduagu, C. E. J. Ekefan y A. O. Nwankiti (2008): Effect of some crude plant extracts on growth of *Coletotrichum capsici* (Synd) Butler & Bisby, casual agent of pepper anthracnose. **Journal of Applied Biosciences**. 6: 184-190.

Nutsugah, S. K. y J. P. Wilson (2007): Development of a reliable inoculation technique to assess resistance in pearl millet to *Fusarium* grain mold. **SAT eJournal**. 5:1-3.

Ochoa, M.J. y M. Carravedo (1990): **Catálogo de Semillas de Tomates Autóctonos**. Editorial Diputación General de Aragón, Departamento de Agricultura y Medio Ambiente, Servicio de Investigación Agroalimentaria, Dirección General de Tecnología Agraria, Zaragoza, España, 108pp.

Okemo, P. O., H. P. Bais y J. M. Vivanco (2003): In vitro activities of *Maesa lanceolata* extracts against fungal plant pathogens. **Fitoterapia**. 74:312-316.

Onaran, A. y M. Yilar (2012): Antifungal activity of *Trachystemon orientalis* L. aqueous extracts against plant pathogens. **Journal of Food, Agriculture & Environment**. 10:287-291.

Pandey, M.K, R. Pandey, V.P. Singh, V.B. Pandey y U.P. Singh (2002): Antifungal Activity of 4',7-Dimethoxyisoflavone Against Some Fungi. **Mycobiology**. 30: 55-56.

Peralta, I, S. Knapp y D. Spooner (2006): Nomenclature for wild and cultivated tomatoes. **Report of the Tomato** (Genetics Cooyervative). 56: 6-12.

Pérez, G. (2003): Los flavonoides: antioxidantes o peroxidantes. **Rev. Cub. Inv. Biom.** 22:48-57



Peterson, J., G. Beecher, S. Bhagwat, J. Dwyer, S. Gebhardt, D. Haytowitz y J. Holden (2006): Flavonones in grapefruit, lemons, and limes: A compilation and review of the data from the analytical literatura. **Journal of Food Composition and Analysis**. 19: 74-80.

Pupo, Y (2008): Selección en condiciones *in Vitro* de extractos vegetales promisorios para el control de *Alternaria solani* (Ellis y Martin) Jones y Grout y *Alternaria porri* Ell. y Cif. [tesis maestría] Bayamo: Universidad de Granma.

Pupo, Y (2010): Selección de extractos vegetales para el control de la alternariosis en *Solanum lycopersicum* L. y *Allium cepa* L. en sistemas agrarios urbanos. [tesis doctoral] Bayamo: Universidad de Granma.

Pupo, Y. G., L. Herrera, B. Vargas, Y. Marrero, R. Arévalo y M.C. Jimenez (2007): Efecto del extracto crudo de hojas de *Tagetes erecta* L. en el control de cuatro hongos patógenos de hortalizas "in vitro". **Centro Agrícola**. 34:83-86.

Rahamanpour, S., D. Backhouse y H. M. Nonhebel (2011): Reaction of *Brassica* species to *Sclerotinia sclerotiorum* applying inoculation techniques under controlled conditions. **Crop Breeding Journal**. 1:143-149.

Rekha, C., G. Poornima, M. Manasa, V. Abhipsa, J. Pavithra, H. T. Vijay y T. R, Prashith (2012): Ascorbic acid, total phenol content and antioxidant activity of fresh juices of four ripe and unripe citrus fruits. **Chem. Sci. Trans**. 1:303-310.

Reyes, I. y A. Valery (2007): Efecto de la fertilidad del suelo sobre la microbiota y la promoción del crecimiento del maíz (*Zea mays* L.) con *Azotobacter* spp. **Bioagro**. 19: 117-126.

Rezende, R., W. Vilegas, I. Zappone y M. S. Gonçalves (2011): Antitumor and immunomodulatory effects of the naphthoquinone 5-methoxy-3,4-dehydroxanthomegnin. **Braz. J. of Pharmacogn**. 21: 1084-1088.

Riffel, A, L. F. Medina, V. Stefani, R. C. Santos, D. Bizani y A. Brandelli (2002): *In vitro* antimicrobial activity of a new series of 1,4-naphthoquinones. **Braz. J. Med. Biol. Res**. 35: 8-11.

Rivero, A. (2007): Nutritional and antioxidant properties of fresh and processed tomato (*Lycopersicon esculentum*) cultivars from Cuba and Germany. . [tesis doctoral] Göttingen: University Göttingen.



Rodríguez, A., N. Companioni, E. Peña, F. Cañet, J. Fresneda, J. Estrada, R. Rey, E. Fernández, L. Vázquez, R. Aviléz, N. Arozarena, B. Dibut, R. González, J. L. Pozo, R. Cun y F. Martínez (2007): **Manual Técnico para Organopónicos, Huertos Intensivos y Organoponía Semiprotegida**. Editorial ACTAF/INIFAT, La Habana, Cuba, 184pp.

Rodríguez, R., J.M. Rodríguez y J.A. San Juan (1996): **Cultivo Moderno del Tomate**. Editorial Aedos s.a., Madrid, España, 793pp

Röhner, E., A. Carabet y H. Buchenauer (2004): Effectiveness of plant extracts of *Peonia suffruticosa* and *Hedera helix* against diseases caused by *Phytophthora infestans* in tomato and *Pseudoperonospora cubensis* in cucumber. **Journal of Plant Diseases and Protection**. 111:83-95.

Salas, M. P., G. Céliz, H. Geronazzo, M. Diaz y S. I. Resnik (2011): Antifungal activity of natural and enzymatically-modified flavonoids isolated from *Citrus* species. **Food Chem.** 124:1411-1415.

Saleem, M. Y., K. P. Akhatar, M. Asghar, Q. Iqbal y A. R. Khan (2011): Genetic control of late blight, yield and some yield related traits in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill). **Pak. J. Bot.** 45: 2601-2605.

Saleem, M., M. Nazir, M. S. Ali, H. Hussain, Y. S. Lee, N. Riaza y A. Jabbara (2010): Antimicrobial natural products: an update on future antibiotic drug candidates. **Nat. Prod. Rep.** 27: 238-254.

Sallam, M.A. y K. A.M. Abo-Elyousr (2012): Evaluation of Varius Plant Extracts against the Early Blight of tomato Plants under Greenhouse and Field Conditions. **Plant Protect. Sci. J.** 48 : 74-79.

Sallam, N. M. A. (2011): Control of Tomato early blight disease by certain aqueous plant extracts. **Plant Pathol. J.** 10:187-191.

Santos, D. T., R. N. Cavalcanti, M. A. Rostagno, C. L. Queiroga, M. N. Eberlin y M. A. A. Meireles (2013): Extraction of polyphenols and anthocyanins from the Jambul (*Syzygium cumini*) fruit peels. **Food and Public Healt.** 3:12-20.

Saonere, J.A (2011): An overview of *Citrus aurantium* used in treatment of various diseases. **Afr. J. Plant Sci.** 5: 390-395.



Sarita, V (1993): Cultivo de tomate de mesa. Boletín Técnico No.19. Fundación de Desarrollo Agropecuario. Santo Domingo, República Dominicana.

Sharma, V., S. Walia, J. Kumar, M. G. Nair y B. S. Parmar (2003): An efficient method for the purification and characterization of nematicidal Azadirachtins A, B, and H, using MPLC and ESIMS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**.

Sherif, A. M., A. A. Elhussein y A. G. Osman (2011): Biodegradation of fungicide Thiram (TMTD) in soil under laboratory conditions. **Am. J. Biotechnol. Mol. Sci.** 1:57-68.

Shinde, S. L., S. B. Junne y S.S. Wadje (2011): Utilization of medicinal plants to control seed borne pathogens of selected seeds. **Asian J. Pharm. Hea. Sci.** 1:79-82.

Siddique, S., M. Shafique, Z. Parveen, S. J. Khan y R. Khanum (2011): Volatile components, antioxidant and antimicrobial activity of *Citrus aurantium var bitter* orange peel oil. **Pharmacologyonline.** 2:499-507.

Silalahi, J. (2002): Anticancer and health protective properties of citrus fruit components. **Asia Pacific. J. Clin. Nutr.** 11: 79-84.

Singh, S., R. Srivastava y S. Choudhary (2010): Antifungal and HPLC analysis of the crude extracts of *Acours calamus*, *Tinospora cordifolia* and *Celestrus paniculatus*. **Journal of Agricultural Technology.** 6:149-158.

Siripornvisal, S. (2010): Antifungal activity of ajowan oil against *Fusarium oxysporum*. **Tech. J.** 10:45-51.

Stratil, P., V. Kunáň y J. Fojtová (2008): Comparison of the phenolic content and total antioxidant activity in wines as determined by spectrophotometric methods. **Czech J. Food. Sci.** 26: 242-253.

Sultana, B., F. Anwar y M. Ashraf (2009): Effect of extraction solvent/technique on the antioxidant activity of selected medicinal plant extracts. **Molecules.** 14:2167-2180.

Suryawanshi, J. A. S. (2011): An overview of *Citrus aurantium* used in treatment of various diseases. **Afr. J. of Plant Sci.** 5: 390-395.

Švecová, E., S. Proietti, C. Caruso, G. Colla y P. Crinò (2013): Antifungal activity of *Vitex agnus-castus* extracts against *Pythium ultimum* in tomato. **Crop Protection.** 43:223-230.



Swami, S., M. Fermeiglia, J. Singh, A. Kumar, S. Tandon, S. Rane, Ch. Kant, V. Govind, R. Kant, A. Bertucco, G. Franceschin, M. Mohan, K. Shanker, S. Kumar, S. Kumar y K. Vasisht (2008): **Extraction technologies for medicinal and aromatic plants**. United Nations Industrial Development Organization and the International Centre for Science and High Technology. Trieste, Italia. 260pp.

Tapwal, A., S. Garg, N. Gautam y R. Fumar (2011): In vitro antifungal potency of plant extracts against five phytopathogens. **Braz. Arch. Biol. and Technol.** 54:1093-1098.

Terry, E., Z. Terán, R. Martínez y M. A. Pino (2002): Biofertilizantes, una alternativa promisorio para la producción hortícola en organopónicos. **Cultivos Tropicales.** 23:43-46.

Thomas, C., M. Dixon, M. Parniske, C. Golstein y J.D.G. Jones (1998): Genetic and molecular analysis of tomato *Cf* genes for resistance to *Cladosporium fulvum*. **Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.** 353:1413-1424.

Thomma, B.P.H.J, H. Van Esse, P. Crous y P. De Wit (2005): *Cladosporium fulvum* (syn *Passalora fulva*), a highly specialized plant pathogen as a model for functional studies on plant pathogenic Mycosphaerellaceae. **Mol. Plant Pathol.** 6:379-393.

Timmerman, D. A. (2011): Leaf and Fruit Diseases of Tomatoes. Division of the Institute of Agriculture and Natural Resources. University of Nebraska-Lincoln.

Tiwari, P., B. Kumar, M. Kaur, G. Kaur y H. Kaur (2011): Phytochemical screening and extraction: A review. **Internacionale Pharmaceutica Scientia.** 1:98-106.

Toledo, M., E. Tamayo, S. Espinosa, J. Diégues y P. Verdecia (2012): Evaluación y selección de variedades de tomate (*Solanum lycopersicon L.*) en dos localidades de la provincia de Gramna. **Revista Granma Ciencia.** 16.

Torres, E, J. Iannacone, H. Gómez (2008): Biocontrol del moho foliar del tomate *Cladosporium fulvum* empleando cuatro hongos antagonistas. **Bragantia**, Campinas. 67: 169 -178.

Trassi, G., N. Seiko-Yamamoto, A. Bracht (2007): Efeitos do extracto de folhas e caule de *Arrabidaea chica* sobre o metabolism hepático. **EAIC.** 25:345-347.

Tuberoso, C.I.G, P. Montorob, S. Piacenteb, G. Coronac, M. Deianac, M.A. Dessic, C. Pizzab.y P. Cabrasa (2009): Flavonoid characterization and antioxidant activity of hydroalcoholic extracts from *Achillea ligustica* All. **J. Pharm. Biomed. Anal.** 50: 440-448.



Vadlapudi, V. y K. Ch. Naidu (2010): In-vitro bioactivity of Indian medicinal plants *Lantana camara* and *Mimosa pudica* against important pathogens. **Annals of Biological Research**. 1:98-101.

Vaillant, D. F., C. R. Carballo, E. R. Ramos, M. G. García, R. R. Ochoa y J. G. Pentón (2009): Efecto inhibitorio in vitro de cinco monoterpenos de aceites esenciales sobre un aislado de *Rhizoctonia solani* en papa (*Solanum tuberosum* L.). **Fitosanidad** J. 13:197-200.

van den Ackerveken, G.F.J.M., Dunn, R.M., Cozijnsen, A.J., Vossen, J.P.M.J., van den Broek, H.W.J. y de Wit, P.J.G.M. (1994): Nitrogen limitation induces expression of the avirulence gene Avr9 in the tomato pathogen *Cladosporium fulvum*. **Mol. Gen. Genet.** 243: 277–285.

van der Heidjen, M., R. D. Bardgett y N. M. van Straalen (2008): The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. **Ecology Letters**.11:296-310.

van Esse, H.P., B. P.H.J. Thomma, J.W. Klotser y P. J.G.M. Wit (2006): Affinity-tags are removed from *Cladosporium fulvum* effector proteins expressed in the tomato leaf apoplast. **Journal of Experimental Botany**. 57:599-608.

Vasudeva, N. y T. Sharma (2012): Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of *Citrus limettioides* Tanaka. **Journal of Pharmaceutical Technology & Drough Reseach**.

Vloutoglou, I. y S. N. Kalogerakis (2000): Effects of inoculum concentration, wetness duration and planta ge on development of early blight (*Alternaria solani*) and on shedding of leaves in tomato plants. **Plant Pathol.** 49:339-345.

Wang, L. y C. L. Weller (2006): Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. **Trends in Food Science & Technology**. 17: 300-312.

Wei, S., W. Wu y Z. Ji (2012): New antifungal pyranoisoflavone from *Ficus tikoua* Bur. **Int. J. Sci.** 13: 7375-7382.

Wuthi-udomlert, M, P. Kupittayanant y W Gritsanapan (2010): In vitro evaluation of antifungal activity of anthraquinone derivates of *Senna alata*. **Health Res.** 24: 117-122.



Yanar, Y, A. Gökçe, I. Kadioglu, H. Çam y M. Whalon (2011): *In vitro* antifungal evaluation of various plant extracts against early blight disease (*Alternaria solani*) of potato. **Afr. J. Biotechnol.** 10: 8291-8295.

Zaid, A., H. G. Hughes, E. Porceddu y F. Nicholas (2004): **Glosario de biotecnología para la agricultura y la alimentación.** Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, Roma, Italia.510pp.

Zou, Ch., M. Mo, Y. Gu, J. Zhou y K. Zhang (2007): Possible contributions of volatile-producing bacteria to soil fungistasis. **Soil Biology & Biochemistry.** 39:2371-2379.



**Anexo 1** Historial Meteorológico de la provincia Sancti Spíritus en los meses de enero, febrero y marzo.

<b>Fecha</b>	<b>Temperatura máxima diaria ( °C)</b>	<b>Temperatura mínima diaria( °C)</b>
30-1-2013	29	19
31-1-2013	29	20
1-2-2013	29.4	20
2-2-2013	29.4	21.7
3-2-2013	31	19
4-2-2013	30	20
5-2-2013	28.3	18.9
6-2-2013	28.3	21
7-2-2013	29.4	18.9
8-2-2013	28.9	20
9-2-2013	30	20
10-2-2013	30	21.1
11-2-2013	30.6	20.6
12-2-2012	30	20.6
13-2-2013	29.4	17.8
1-3-2013	28.3	20
2-3-2013	28.3	19.4
3-3-2013	23.9	18.9
4-3-2013	28.3	17.8
5-3-2013	27.2	16.1
6-3-2013	27.8	19.4
7-3-2013	31.1	19.4
8-3-2013	29.4	18.3
9-3-2013	27.2	16.1
10-3-2013	27.8	16.7
11-3-2013	28.3	17.2
12-3-2013	27.8	18.3
13-3-2013	25.6	21.1
14-3-2013	28.9	19.4
15-3-2013	28.9	20.6