

Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Departamento de Biología

TESIS DE DIPLOMA

Actividad antifúngica *in vitro* de extractos de hojas de especies del orden *Zingiberales* frente a *Mycosphaerella fijiensis* Morelet

Autor: Wendy Gómez Menéndez

Tutores: Dr. C Orelvis Portal Villafaña

Lic. Dianella Iglesias Rodríguez

Consultante: MSc. Katia Ojito Ramo

Santa Clara, 2015



Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Departamento de Biología



TESIS DE DIPLOMA

Actividad antifúngica *in vitro* de extractos de hojas de especies del orden *Zingiberales* frente a *Mycosphaerella fijiensis* Morelet

Autor: Wendy Gómez Menéndez

Tutores: Dr. C Orelvis Portal Villafaña (orelvispv@uclv.cu)*

Lic. Dianella Iglesias Rodriguez (diglesias@uclv.cu)*

Consultante: MSc. Katia Ojito Ramos (kojito@uclv.edu.cu)*

***Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Departamento de Biología. Carretera de Camajuaní km 5.5. Santa Clara, Villa Clara, Cuba.**

Santa Clara, 2015

El ser humano es tan solo una parte del todo, llamado "Universo", una parte limitada en tiempo y espacio. Se percibe así mismo, en pensamiento y sentimiento, como algo separado del resto -un tipo de ilusión óptica del subconsciente-. Esta ilusión es una clase de prisión para nosotros, nos restringe a decisiones personales y por tanto afecta a los que nos rodean...

Nuestra tarea debería de ser liberarnos de esta prisión, ampliando nuestro círculo de compasión para incluir a todas las criaturas vivientes y a toda la belleza de la naturaleza.

Albert Einstein

A: Flavia (mi mami) y Zenaida (mi mamá)

A Orelvis, por tomar la responsabilidad de mi formación como profesional, enseñarme a buscar la pregunta detrás de la respuesta y a nunca estar conforme con mis conocimientos.

A Nella y Katia, por brindarme su ayuda en todo lo que fuese necesario y por sus consejos, los cuales contribuyeron en gran medida a la culminación exitosa de este trabajo.

A Ana Paula por compartir su habitación.

A todas las personas que de una forma u otra me ayudaron: Berkys, Leyanes, Eilyn, Yaciel, Mari Carmen, Lili, Edgardo, Luis, Mayra, Jose, Yumi y de forma muy especial a Venancio, Mileidys y Baby, quienes a pesar de las tantas molestias nunca dijeron que no.

A todos los profesores de la carrera por darme las herramientas necesarias para la culminación de mis estudios.

A mis compañeros de aula, por todo lo que aprendí de cada uno y sin los cuales estos cinco años no hubiesen resultado divertidos; en especial a Lucia.

A Divaldo, Maibel y Yunita, por mantener su amistad a pesar de ya no estar juntos.

A Aimee, compañera de litera, trenes, descarrilamientos, camiones y otros medios de transporte indeterminados, además de una amiga con quien contar.

A Anaimy y Annerys, que estuvieron en las buenas, las malas y las regulares. Ana mi compañera de maldades y amiga sincera. Annerys por ser mi modelo a seguir y demostrarme que ante las adversidades las personas se crecen. A las dos por brindarme su amistad incondicional.

A Celia, Anabel y Gretel, amigas de siempre que me animaron desde la distancia.

A Luis Enrique, mi papá, por siempre estar pendiente de mi salud y orgulloso de todos mis logros.

A Zenaida mi mamá, quien siempre me ha apoyado y alentado a seguir adelante en mis estudios independientemente de las circunstancias. Enseñarme a no juzgar a las personas y esperar siempre lo mejor de ellas. Tenerme la suficiente confianza para dejarme tomar mis propias decisiones y alentarme a encontrar una solución cuando me equivoco. Por ser además de madre, amiga y confidente.

A mis suegros Samuel y Nilda, quienes han sido unos segundos padres y nunca encontraré la forma de agradecerles todo lo que les debo, ni el cariño que me han brindado durante

estos años. Nini por ser la mejor suegra malvada que se pueda tener y Samuel por tenerme presente como una hija.

A Flavita, por darme el empujón que necesitaba para decidirme por esta profesión y sus sabios consejos de viajes en trenes. Por ser más que una prima, una hermana y darme su apoyo en todo momento.

A mis hermanos Andy y la pequeña Sofía y a Madyi, Emmanuel y Yoa por los que siento el mismo cariño que los dos primeros.

A mi tía Mercy y mi tío Rafelito, quienes junto al resto de mi familia me han apoyado y aconsejado en numerosas ocasiones.

A Armando quien de una forma u otra me ha brindado su ayuda y a Mailin por darme su cariño.

A Samuel, mi novio, mejor amigo, consejero y apoyo incondicional. Quien, junto a mi madre y mi abuela, es el tercer pilar que me sostiene. Ninguna palabra sirve para expresar cuan agradecida estoy por todo lo que has hecho por mí. Gracias por haber sido mis alas para llegar hasta aquí.

Finalmente a mi abuela Flavia (mi mami), quien ha sido más que una abuela, una madre en todos los sentidos. Gracias por cuidar siempre de mí y hacerme saber que puedo llegar muy lejos con solo proponérmelo.. A ti debo todo lo que soy y seré el resto de mi vida.

A todos un millón de Gracias

Resumen

Mycosphaerella fijiensis es el agente causal de la Sigatoka negra, principal enfermedad que afecta a los plátanos y bananos en Cuba. La aparición de resistencia en *M. fijiensis* a fungicidas, ha encaminado la búsqueda de alternativas, como el uso de extractos de plantas. Las fenilfenalenonas son fitoanticipinas y fitoalexinas presentes en especies del orden *Zingiberales*. El objetivo de este estudio fue determinar la actividad antifúngica *in vitro* de extractos de hojas de especies del orden *Zingiberales* frente a *M. fijiensis*. Los extractos se obtuvieron mediante extracción asistida por ultrasonido, se realizó una partición de los mismos con solventes de diferente polaridad; una cromatografía en placa delgada y se cuantificó el contenido de fenoles. Para cada extracto y las fracciones se determinó la concentración mínima inhibitoria. A los extractos y fracciones promisorias se les determinó la inhibición del crecimiento y de la germinación de conidios de *M. fijiensis*. Se identificó la presencia de fenilfenalenonas en los extractos crudos, así como en las fracciones clorofórmicas y etílicas. Las fracciones clorofórmicas de todas las especies y las fracciones etílicas de *Musa textilis* y *Alpina purpurata* mostraron actividad frente a *M. fijiensis* a concentraciones iguales o inferiores a 4 000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. A las 72 h de incubación solamente inhibieron el crecimiento del hongo las fracciones clorofórmicas de *Strelitzia reginae*, *A. speciosa* y *A. purpurata*. Todos los extractos promisorios mostraron un porcentaje inhibición de la germinación del tubo germinativo de los conidios de *M. fijiensis*, superior al 85%. Este estudio demostró la potencialidad del uso de extractos de hojas de plantas del orden *Zingiberales* para el control de *M. fijiensis*.

Palabras clave: platanos y bananos, fenilfenalenonas, extractos de plantas

Abstract

Mycosphaerella fijiensis is the causal agent of black Sigatoka, the main disease that affect plantains and bananas in Cuba. The apparition of resistance in *M. fijiensis*, to fungicides, had motive the search of alternative, as the use of plant extract. The phenylphenalenones are phytoanticipins and phytoalexin presents in species of the *Zingiberales* order. The aim of this research was to determinate the *in vitro* antifungal activity of leaves extracts of species of the *Zingiberales* order against *M. fijiensis*. The extracts were obtained by ultrasound-assisted extraction; a partition with solvent of different polarity was done to the extract, a thin layer chromatography was done and total content of phenols was quantified. For each extract and the fractions, it was determinate the minimum inhibitory concentration. To the promissory extract and fraction the inhibition of the mycelial growth and the germination of conidia were determinate. The presence of phenylphenalenones was identified in the crude extract and in the choloformics and ethyls fractions. All chloroformics fractions and ethyls fractions of *Musa textilis* and *Alpina purpurata* showed activity against *M. fijiensis* at the concentration equal o inferior of 4 000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. At the 72 h of incubation the growth of the fungus only was inhibit by the choloformic fraction of *Strelitzia reginae*, *A. speciosa* and *A. purpurata*. All the promissory extract showed an inhibition percentage of the conidia germination superior to the 85%. This study demonstrated the potential of using extracts of leaves of plants in *Zingiberales* order for the control of *M. fijiensis*.

Keywords: plantains and banana, phenylphenalenones, plant extract

Índice

1. Introducción	1
2. Revisión bibliográfica	3
2.1. Plátanos y bananos	3
2.1.1. Origen, distribución y taxonomía	3
2.1.2. Características generales	3
2.1.3. Importancia económica	4
2.1.4. Principales enfermedades	5
2.2. Sigatoka negra	7
2.2.1. Origen y distribución	7
2.2.2. Agente causal	8
2.2.3. Modo de infección y sintomatología	8
2.2.4. Interacción <i>Musa</i> spp.- <i>Mycosphaerella fijiensis</i>	10
2.2.5. Estrategias de control	11
2.3. Uso de extractos para el control de <i>Mycosphaerella fijiensis</i>	14
2.4. Fenilfenalenonas	15
2.4.1. Clasificación y estructura	15
2.4.2. Ruta biosintética	17
2.4.3. Propiedades antifúngica	17
2.5. Características de las especies del orden <i>Zingiberales</i>	18
3. Materiales y métodos	23
3.1. Caracterización de los extractos de hojas de especies del orden <i>Zingiberales</i>	23
3.1.1. Obtención de los extractos	23
3.1.2. Cromatografía en placa delgada (TLC)	24
3.1.3. Cuantificación del contenido de fenoles totales	25
3.2. Efecto de extractos de hojas de especies del orden <i>Zingiberales</i> en el crecimiento micelial de <i>Mycosphaerella fijiensis</i>	25
3.2.1. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC)	26
3.2.2. Cuantificación del crecimiento micelial	27
3.3. Efecto de extractos de hojas de especies del orden <i>Zingiberales</i> en la germinación de conidios de <i>Mycosphaerella fijiensis</i>	27

3.4. Procesamiento estadístico	28
4. Resultados y discusión	29
4.1. Caracterización de los extractos de hojas de especies del orden <i>Zingiberales</i>	29
4.1.1. Obtención de los extractos	29
4.1.2. Cromatografía en placa delgada	31
4.1.3. Cuantificación de la concentración de fenoles totales	33
4.2. Efecto de extractos de hojas de especies del orden <i>Zingiberales</i> en el crecimiento micelial de <i>Mycosphaerella fijiensis</i>	34
4.2.1. Concentración mínima inhibitoria	34
4.2.2. Cuantificación del crecimiento micelial	36
4.3. Efecto de extractos de hojas de especies del orden <i>Zingiberales</i> en la germinación de conidios de <i>Mycosphaerella fijiensis</i>	38
5. Conclusiones	40
6. Recomendaciones	41
7. Referencias bibliográficas	

1. Introducción

Los plátanos y bananos (*Musa* spp.), debido, entre otras razones, a su elevado contenido en carbono, minerales, almidón y vitaminas, constituyen el alimento fundamental para más de 400 millones de personas en el mundo. Sus especies son cultivadas en más de 130 países y su producción anual asciende a las 129×10^6 t, con casi 10×10^6 ha de cultivo. A nivel mundial constituyen el cuarto cultivo de mayor importancia económica, después del arroz, el trigo y el maíz (Marín *et al.*, 2003).

Entre las múltiples enfermedades que afectan a *Musa* spp., la Sigatoka negra o el rayado negro de la hoja, causado por el hongo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, es considerada la enfermedad foliar más destructiva y costosa a nivel mundial. El hongo, aunque no influye significativamente sobre el crecimiento vegetativo de la planta, disminuye el rendimiento del cultivo. Ello ha ocasionado pérdidas de entre el 30 y el 50% de la producción (Manzo *et al.*, 2005a).

En Cuba, la Sigatoka negra es la enfermedad más devastadora de cuantas afectan a plátanos y bananos. Luego de su aparición, se produjo una reducción de más del 50% de las hectáreas destinadas a estos cultivos, y aumentaron significativamente los costos de producción por concepto de compra de fungicidas sintéticos para el control químico de la enfermedad (Pérez-Vicente, 2012).

Los fungicidas más empleados son protectantes como el mancozeb y el clorotalonil o sistémicos como benzimidazoles, aminas, triazoles, estrobirulinas y anilino pirimidinas (Martínez *et al.*, 2011). Aunque su aplicación constituye la medida más efectiva para el manejo de la enfermedad, el uso continuado de estos productos aumenta el grado de contaminación del ambiente, causa daños a la salud humana y provoca la aparición de resistencia. Por tal razón, resulta necesaria la búsqueda de alternativas ambientalmente seguras y efectivas en el manejo de la Sigatoka negra, como lo es el empleo de extractos de plantas (Hernández *et al.*, 2009).

Los extractos de plantas constan de una combinación de elementos activos producto del metabolismo celular, a los cuales se debe su actividad antifúngica. Muchos de estos compuestos son metabolitos secundarios como alcaloides, esteroides, fenoles, saponinas, taninos y terpenos, que participan en los mecanismos naturales de defensa de la planta frente a microorganismos (Viveros y Castaño, 2006). Es por ello que estos biopreparados

pueden emplearse como parte de un sistema de manejo integrado, para el control de enfermedades causadas por hongos.

Las especies del orden *Zingiberales*, son ricas en compuestos fenólicos, como las fenilfenalenonas, que pueden actuar como fitoanticipinas y/o fitoalexinas, lo cual tiene una implicación directa en los mecanismos de defensa de las plantas frente a hongos. En el género *Musa* se ha demostrado la actividad antifúngica de las fenilfenalenonas frente a *M. fijiensis* (Quiñones *et al.*, 2000, Otálvaro *et al.*, 2007), así como la existencia de una correlación entre la concentración de estos compuestos en la planta y los genotipos resistentes al hongo (Otálvaro *et al.*, 2002a).

Ante esta problemática se plantea la siguiente hipótesis científica:

Extractos de hojas de especies del orden *Zingiberales* pudieran presentar actividad antifúngica frente a *Mycosphaerella fijiensis*, debido a la presencia de fenilfenalenonas.

Objetivo general:

Determinar la actividad antifúngica *in vitro* de extractos de hojas de especies del orden *Zingiberales* frente a *Mycosphaerella fijiensis*.

Objetivos específicos:

1. Caracterizar los extractos de hojas de especies del orden *Zingiberales*.
2. Determinar el efecto de extractos de hojas de especies del orden *Zingiberales* en el crecimiento micelial de *Mycosphaerella fijiensis*.
3. Determinar el efecto de extractos de hojas de especies del orden *Zingiberales* en la germinación de conidios de *Mycosphaerella fijiensis*.

2. Revisión bibliográfica

2.1. Plátanos y bananos

2.1.1. Origen, distribución y taxonomía

Los plátanos y bananos son los nombres comunes con que se conocen las especies comestibles del género *Musa*. Este género de monocotiledóneas pertenece a la familia *Musaceae*, del orden *Zingiberales*, donde además, se agrupan los géneros *Ensete* y *Musella* (De Langhe *et al.*, 2009). *Musa* spp. tiene su centro de origen en el sudoeste de Asia, en un área localizada entre la India, Papúa Nueva Guinea y varias islas del Pacífico. El cultivo de plátanos y bananos tiene lugar en la mayor parte de las áreas tropicales y subtropicales de Asia, África, América y Australia (Marín *et al.*, 2002).

El género *Musa* agrupa aproximadamente 50 especies, divididas en cinco secciones según el número básico de cromosomas, orientación y el ordenamiento de las flores en la inflorescencia: *Eumusa* (n=11), *Australimusa* (n=10), *Callimusa* (n=9 o 10), *Rodochlamys* (n=11) e *Ingentimusa* (n=14) (Heslop-Harrison y Schwarzacher, 2007). Existe una segunda clasificación basada únicamente en el número de cromosomas, en la que se proponen dos secciones: *Eumusa* y *Callimusa* (Häkkinen, 2013).

Eumusa es la sección más antigua, diversificada, y de mayor distribución, en la cual se incluyen *Musa acuminata* Colla (genoma A) y *Musa balbisiana* Colla (genoma B), a partir de cuya hibridación se originaron todas las variedades comestibles de bananos (Fuentes, 2009). Los cultivares del subgrupo Cavendish representan entre el 30 y el 40% de la producción de bananos a nivel mundial. La variedad triploide 'Dwarf Cavendish' es la de mayor distribución (Mohapatra *et al.*, 2010).

2.1.2. Características generales

Las especies de *Musa* son hierbas perennes que pueden alcanzar de 2-8 m de altura, en dependencia de las condiciones ambientales. Las variedades comestibles no presentan semillas, se reproducen mediante un rizoma subterráneo, del cual se origina el pseudotallo formado por las vainas foliares. Las hojas son erguidas, oblongas, pueden alcanzar hasta 2 m de largo por 55 cm de ancho, redondeadas en el ápice y en la base, con un total de 35-50 por planta. Las inflorescencias se producen de 7-9 meses después de la plantación, miden hasta 1,5 m de largo y poseen brácteas violáceas. Los frutos son partenocápicos,

crecen en racimos que contienen 30-70 unidades, con un periodo de maduración entre 3-4 meses (Augstburger *et al.*, 2001, Hernández y Vit, 2009).

No existen características botánicas para diferenciar los plátanos y bananos. De forma general, los plátanos tienen más almidón en los frutos y se cocinan para su consumo. Mientras, los bananos se consumen sin cocinar y son más dulces (Heslop-Harrison y Schwarzacher, 2007).

Las áreas óptimas para el cultivo de *Musa* spp. se encuentran en regiones de clima tropical. El ciclo vegetativo y la emisión de hojas son afectados notablemente por las variaciones de temperatura; por lo general se consideran idóneos los valores comprendidos entre 19-33 °C. El crecimiento se detiene por encima de los 38 °C, o por debajo de los 14 °C. Mientras, valores cercanos a 0 °C causan la muerte de la planta. La altitud adecuada para la siembra se encuentra desde el nivel del mar hasta los 2000 msnm. Las raíces son altamente susceptibles al déficit de agua; para un desarrollo apropiado se requieren de 120-150 mm de lluvia mensual o 1 800 mm anuales. Sin embargo, el fenómeno de inundación puede ser negativo, ya que destruye las raíces, lo cual reduce el número de hojas y afecta la floración. La humedad relativa puede afectar indirectamente este cultivo, pues favorece la incidencia de enfermedades foliares, principalmente causadas por hongos (Palencia *et al.*, 2006).

2.1.3. Importancia económica

A nivel mundial, los plátanos y bananos constituyen el cuarto cultivo de mayor importancia económica -luego del arroz, el trigo y el maíz. Son cultivados en más de 130 países. La producción anual asciende a 129×10^6 t. El principal productor es la India, con alrededor de 11 000 t anuales. Ecuador es el principal exportador, al comercializar el 67% de su producción. Ello representa un tercio del mercado global (Marín *et al.*, 2003).

Los frutos de los plátanos y bananos son parte importante en la dieta humana; aportan nutrientes como vitaminas, minerales y principalmente carbohidratos (100 g equivalen a 120 kcal). Pueden ser consumidos de forma natural o cocidos. El pseudotallo se aprovecha como fuente de almidón. En la India, la ceniza obtenida de las hojas es utilizada como sustituta de la sal y como saborizante del curry (Mohapatra *et al.*, 2010).

Algunas especies, como *Musa textilis* Neé, se utilizan para la confección de ropas a partir de las fibras obtenidas del pseudotallo. También, en la industria papelera, se emplean en la elaboración de bolsas de té, filtros de cigarrillos y papel de impresión de alta calidad.

Algunas culturas del Pacífico utilizan la savia de la raíz con fines medicinales para curar verrugas en la piel (Roux *et al.*, 2008).

En Cuba, los plátanos y bananos constituyen un renglón de elevada prioridad dentro del programa alimentario nacional, dadas la posibilidad de su producción todos los meses del año, su elevado potencial productivo, el arraigado hábito de consumo y la diversidad de usos (Martínez y González, 2007). En el país, un total de 92 053 ha cultivadas, genera una producción de 485 800 t (FAOSTAT, 2012), lo cual representa un 40% de las viandas cosechadas. Tal producción se basa en los cultivares pertenecientes a los subgrupos Cavendish (AAA), Plantain (AAB, ABB) y tetraploides (AAAA, AAAB, AABB) introducidos por la Fundación Hondureña de Investigaciones Agrícolas (FHIA) (Martínez y González, 2007).

2.1.4. Principales enfermedades

La principal problemática en el cultivo de plátanos y bananos está asociada a los daños causados por enfermedades. La producción se ve afectada por un amplio rango de microorganismos entre los cuales se destacan los nemátodos, bacterias, virus y hongos.

Los nemátodos se encuentran ampliamente distribuidos por todas las regiones productoras de plátanos y bananos. Más de 100 especies afectan estos cultivos. De ellas *Radopholus similis* (Cobb) Thorne, conocido comúnmente como el nematodo barrenador, está considerado como el más importante (Marín *et al.*, 2002). Las lesiones causadas por este endoparásito migratorio, al alojarse en las raíces de la planta, disminuyen su capacidad de absorción de agua y nutrientes. Ello trae como resultado la caída de las flores y la disminución del peso de los racimos (Elsen *et al.*, 2002, Hölscher *et al.*, 2014).

Otro grupo importante de patógenos son las bacterias. Entre ellas destacan *Xanthomonas campestris* pv. *musacearum* (Yirgou y Bradbury) Dye y *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi, causantes de la total marchites de la planta y la caída de sus hojas. Como resultado, se detiene el crecimiento de la planta y, eventualmente, provoca su muerte (Tushemereirwe *et al.*, 2003). Cuando *R. solanacearum*, agente causal de la enfermedad conocida como Moko, se presenta en el racimo produce una maduración prematura y una pudrición parda y seca (Palencia *et al.*, 2006).

Entre los virus, el BBTV (del inglés: *Banana bunchy top virus*) provoca los mayores daños a plátanos y bananos. El BBTV causa pérdidas de entre el 50 y el 80% en las áreas

afectadas. El virus afecta las células del floema e induce síntomas como clorosis, enanismo, atrofia de las hojas y aclaramiento de las nervaduras (SuSu *et al.*, 2003).

La enfermedad producida por el BSV (del inglés: *Banana streak virus*) puede propagarse a través del material infestado o por la especie *Planococcu scitri* Russo. Sus primeros síntomas se observan en forma de pequeños puntos amarillos en las hojas, los cuales posteriormente se extienden hasta formar grandes estrías que necrosan el tejido. El vigor de la planta se reduce y los frutos se deforman (Singh *et al.*, 2011).

Las enfermedades causadas por hongos se encuentran entre las más destructivas que afectan plátanos y bananos. *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Smith) Snyder y Hansen (*Foc*), agente causal del Mal de Panamá, es considerado uno de los patógenos que mayores daños ha causado a la industria bananera. *Foc* ha destruido vastas plantaciones de bananos en países tropicales y subtropicales. Una vez que el suelo es infectado por *Foc*, los cultivos susceptibles no pueden volverse a plantar en 30 años (Ploetz, 2006).

Foc penetra a través de las raíces y coloniza el xilema, bloquea los vasos conductores, ocasiona el marchitamiento, necrosis y caída de las hojas, y puede conllevar a la muerte de la planta (Rawal, 1996). Basado en la especificidad del hongo, se reconocen cuatro razas: raza 1, patogénica para 'Gros Michel' (AAA) y 'Silk' (AAB); raza 2, patogénica para 'Bluggoe' (AAB); raza 3, patogénica solo en *Heliconia* spp.; raza 4, que afecta al grupo Cavendish y a los cultivos susceptibles a las razas 1 y 2. La raza 4 se encuentra dividida en subtropical y tropical. Se considera a esta última como la más letal (Fourie *et al.*, 2011).

El complejo Sigatoka agrupa a tres hongos que frecuentemente pueden coexistir en una misma lesión: *Mycosphaerella musicola* Leach ex Mulder (anamorfo: *Pseudocercospora musae* (Zimm.) Deighton), causante de la Sigatoka amarilla; *Mycosphaerella eumusae* Crous y Mourichon (anamorfo: *Pseudocercospora emusae* Crous y Mourichon) que produce la mancha foliar eumusae; y *Mycosphaerella fijiensis* Morelet (anamorfo: *Pseudocercospora fijiensis* (Morelet) Deighton) que causa el rayado negro de la hoja o Sigatoka negra. Esta última está considerada a escala mundial, como la enfermedad foliar más devastadora que afecta al género *Musa*, ya que la mayoría de las variedades de interés económico son altamente susceptibles (Jones, 2000, Arzanlou *et al.*, 2008, Churchill, 2011).

Dado que las lesiones que ocasionan y sus estados sexuales son muy similares, *M. fijiensis*, *M. musicola* y *M. eumusae* son difíciles de distinguir basándose en la sintomatología que

producen. No obstante, las especies pueden ser identificadas basándose en las diferencias morfológicas entre sus estados asexuales (Calier *et al.*, 2003).

En Cuba, la Sigatoka negra es la enfermedad más perjudicial en las plantaciones de *Musa* spp. Cuatro años después de su aparición (Vidal, 1992), la Sigatoka negra reemplazó a la Sigatoka amarilla en todas las áreas del país. En 1989, existían más de 40 000 ha de plátanos (AAB) y 14 000 ha de banano 'Cavendish' (AAA). A finales de 1995, se habían reducido en un 69 y 51%, respectivamente. Entre 1980 y 1990, los gastos en control fúngico oscilaban entre 134 y 241 USD por hectárea. Sin embargo, dos años después del primer informe de *M. fijiensis*, los gastos aumentaron entre 640 y 810 USD por hectárea (Pérez *et al.*, 2003b).

2.2. Sigatoka negra

2.2.1. Origen y distribución

El primer informe de Sigatoka negra se registró en la costa sudeste de Viti Levu en la isla de Fiji (Rhodes, 1964). Sin embargo, su amplia distribución por el Pacífico sugiere que estaba presente en la región mucho antes de su descubrimiento (Stover y Simmonds, 1987). En 1972, se documentó por primera vez en Honduras, diseminándose rápidamente por todo el continente hasta alcanzar la región del Caribe. En África, la enfermedad se informó por primera vez en Tanzania. De allí se diseminó hacia el sur del continente (Calier *et al.*, 2000, Pasberg-Gauhl *et al.*, 2000).

Inicialmente, la Sigatoka negra se usó para referirse a una enfermedad similar, causada por *M. fijiensis* var. *difformis* Mulder y Stover (Marín *et al.*, 2003). Sin embargo, estudios moleculares y morfológicos indicaron que *M. fijiensis* y *M. fijiensis* var. *difformis* eran la misma especie (Pons, 1987, Marín *et al.*, 2003). La enfermedad se encuentra en todas las regiones productoras de plátanos y bananos (Figura 1). Es uno de los principales problemas fitosanitarios para el desarrollo de *Musa* spp. (Mourichon *et al.*, 1997).



Figura 1. Campo de *Musa* spp. infectado con Sigatoka negra (Bayer, 2007).

2.2.2. Agente causal

La Sigatoka negra es causada por el hongo ascomiceto *M. fijiensis*, el cual pertenece a la familia *Mycosphaerelleaceae*, orden *Capnodiales* y clase *Dothideomycetes*. *M. fijiensis* es un hongo haploide, hemibiotrófico y heterotálico (Churchill, 2011). La fase asexual de *M. fijiensis* está relacionada con la formación de conidios en el interior de los conidióforos, que emergen principalmente por la superficie abaxial de la hoja. Se presenta en lesiones jóvenes y se asocia con la diseminación del hongo a cortas distancias (Manzo *et al.*, 2005a). La fase sexual de *M. fijiensis*, de mayor importancia en el desarrollo de la enfermedad, se produce en lesiones maduras, en estructuras, denominadas pseudotecios, en cuyo interior se encuentran las ascosporas. En periodos de alta humedad las ascosporas se liberan al ambiente y las corrientes de aire las dispersan a largas distancias (Nelson, 2008).

2.2.3. Modo de infección y sintomatología

El ciclo de infección de *M. fijiensis* (Figura 2) consta de cuatro etapas: germinación de las esporas, penetración en el hospedante, desarrollo de los síntomas y producción de esporas (Churchill, 2011). La infección tiene lugar primeramente en las hojas más jóvenes de la planta. Los síntomas siguen un gradiente de evolución desde el ápice hasta la base (De Bellaire *et al.*, 2010).

Las plantas pueden ser infestadas tanto por los conidios como por las ascosporas. Luego de dos o tres días, las esporas germinan en la superficie de la hoja. Se produce un crecimiento epifítico del tubo germinativo, el cual penetra a través de los estomas y prolifera en el espacio intercelular (Nelson, 2008). Una vez dentro, las hifas de *M. fijiensis* colonizan las células adyacentes por un periodo de siete días sin causar daños aparentes. El hongo emerge por los estomas, crece sobre la superficie de la hoja y vuelve a penetrar por otros estomas o produce conidióforos. Este crecimiento epifítico permite una mayor dispersión de *M. fijiensis*, lo cual contribuye al rápido desarrollo de los síntomas (Marín *et al.*, 2003).

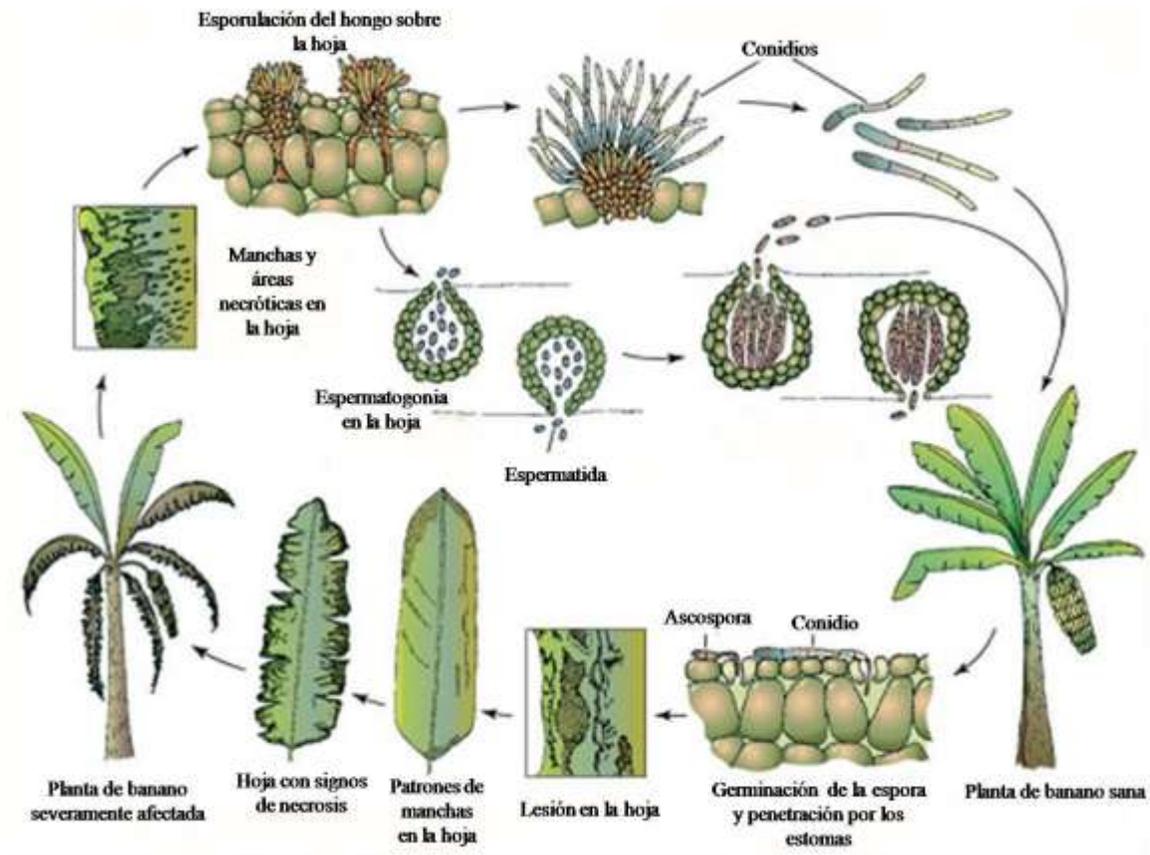


Figura 2. Ciclo de vida de *Mycosphaerella fijiensis*, agente causal de la Sigatoka negra en plátanos y bananos (modificado de Churchill, 2011).

Concluido el periodo de incubación de la enfermedad, alrededor de los 14-15 días, comienza la aparición de los primeros síntomas en la superficie abaxial de la tercera o cuarta hoja completamente expandida (De Bellaire *et al.*, 2010). La evolución de los síntomas se agrupa en seis fases: uno de punto, dos de rayas y tres de manchas. En el estado inicial se observa el desarrollo de pequeños puntos cloróticos de 0,25 mm de diámetro en la superficie abaxial

(Manzo *et al.*, 2005a). A partir de los puntos se forman estrías de color castaño de 1 mm de ancho x 2 mm de largo, visibles en la superficie adaxial y paralelas a las venas laterales de la hoja. Posteriormente, se produce un alargamiento de las estrías hasta los 20-25 mm, que se tornan marrón oscuro (Stansbury *et al.*, 2000). En el primer estado de manchas las estrías se rodean por una zona amarillo pálida. El centro de la mancha se torna negro y sufre un colapso, el borde es acuoso y se encuentra delimitado por un halo amarillo. Finalmente, el centro de la mancha se seca volviéndose hundido o comprimido, toma una coloración gris, el borde se torna negro y se establece un área amarillo intenso entre este y el verde normal de la hoja (Manzo *et al.*, 2005a).

La susceptibilidad de plátanos y bananos y las variaciones climáticas pueden influir considerablemente en el periodo de incubación de la enfermedad (De Bellaire *et al.*, 2010). *M. fijiensis* ha alcanzado una amplia variedad genética (Rieux *et al.*, 2011, Robert *et al.*, 2012), y patogénica (Zandjanakou-Tachinab *et al.*, 2013). Las abundantes precipitaciones, temperaturas cálidas y una alta humedad relativa del aire favorecen su permanencia en el hospedante y son determinantes en el nivel de severidad de ataque (Sáez-Sáez y Puche, 2003). Con valores elevados de humedad relativa y precipitaciones, en un cultivar susceptible, los síntomas pueden aparecer a los 14 días, mientras que a temperaturas inferiores a los 20 °C y en los periodos secos pueden demorar hasta 35 días. Su gran capacidad reproductiva le ha permitido adaptarse a diversas condiciones ambientales. (Marín *et al.*, 2003).

2.2.4. Interacción *Musa* spp.-*Mycosphaerella fijiensis*

La interacción entre *Musa* spp. y *M. fijiensis* se inicia cuando los conidios o ascosporas penetran al interior de la hoja por los estomas. Según el tipo de interacción establecida, los cultivares de *Musa* spp. se agrupan en tres categorías: resistentes (interacción incompatible), tolerantes (interacción compatible) y susceptibles (interacción compatible) (Manzo *et al.*, 2005b).

En las interacciones compatibles, *M. fijiensis* coloniza los espacios intercelulares que se encuentran entre las células del mesófilo, sin la formación de haustorios. La diferencia principal en el desarrollo de la enfermedad entre los cultivares susceptibles y los tolerantes se encuentra en la velocidad de crecimiento de las hifas (Lepoivre *et al.*, 2003). *M. fijiensis* se comporta como un hongo biotrófico por un periodo de hasta cuatro semanas en los cultivares susceptibles, luego comienzan a observarse los primeros síntomas de necrosis (Hoss y

Bochow, 2000). Los cultivares tolerantes se caracterizan por un lento desarrollo de los síntomas (Manzo *et al.*, 2005a), dado por la acumulación de compuestos fenólicos en las hojas del parénquima que retardan el avance de la infección (Torres *et al.*, 2009).

Por el contrario, la interacción incompatible se caracteriza por un rápido bloqueo de la infección (Manzo *et al.*, 2005a). En los cultivares resistentes, una necrosis temprana rodea los sitios de penetración de *M. fijiensis*. La muerte rápida de algunas células del hospedante detiene el avance de la infección, lo cual se encuentra relacionada con los mecanismos de la respuesta hipersensible (Lepoivre *et al.*, 2003). La resistencia a las infecciones por *M. fijiensis* pudiera estar relacionada con la activación temprana de mecanismos posteriores a la infección como la síntesis de proteínas PR (del inglés: *Pathogenesis related*) y de fitoalexinas.

2.2.5. Estrategias de control

La aparición de la Sigatoka negra en Cuba, y su rápida diseminación por todas las áreas productoras de plátanos y bananos, trajo consigo un aumento significativo en los costos para su control. Como resultado, se desarrolló un sistema de manejo integrado que comprende pronóstico bioclimático, medidas de control cultural, uso de cultivares resistentes y empleo de fungicidas sistémicos y protectantes (Pérez *et al.*, 2003b).

En los principales países productores y exportadores, se hace imprescindible la educación de los campesinos, así como la certificación de programas de manejo seguro, la regulación de las infraestructuras, el adecuado almacenamiento de los agroquímicos y el transporte. Sin embargo, las soluciones a largo plazo dependen de las políticas e infraestructura para el control de la Sigatoka negra, sin el empleo de compuestos químicos, como alternativa a los fungicidas (Polidoro *et al.*, 2008).

Pronostico bioclimático

Muchos procesos relacionados con la reproducción de *M. fijiensis* dependen de la presencia de una capa de agua en la superficie de la hoja y de elevados valores de humedad relativa (Gauhl *et al.*, 2000). Se ha logrado establecer una correlación entre la duración e intensidad de las precipitaciones y el estado de desarrollo de la enfermedad. Ello permite establecer el momento más adecuado para la aplicación de los fungicidas. Tal resultado pudiera disminuir la probabilidad de que aislados de *M. fijiensis* sean menos sensibles a los fungicidas (Guzmán *et al.*, 2000, Amil *et al.*, 2007, Manzo *et al.*, 2012, Aguilar-Barragan *et al.*, 2014). El

empleo del modelo de pronóstico bioclimático ha posibilitado una reducción en un 40% de los costos totales para el control de la Sigatoka negra en las plantaciones de 'Cavendish', lo cual se traduce en una reducción del número de importaciones de fungicidas (Pérez *et al.*, 2003a).

Control cultural

La implementación o modificación de ciertas prácticas de cultivo pueden generar un ambiente menos favorable para la reproducción, diseminación e infección de *M. fijiensis*, y el consiguiente desarrollo de la enfermedad. Estas prácticas fitosanitarias se encuentran encaminadas a la reducción del inóculo, el control de malas hierbas, la nutrición adecuada y la correcta distribución de las plantas (Martínez *et al.*, 2011). El deshoje (despunte y cirugía) a intervalos semanales (Güerere-Pereira *et al.*, 2008), unido a la aplicación de urea como inhibidor de la esporulación, se encuentran entre las medidas más empleadas. La nutrición mineral balanceada es también un aspecto relevante. Algunos elementos como el silicio (Liu *et al.*, 2014b), cobre, calcio, boro y zinc contribuyen a reducir la severidad de la enfermedad. La reducción del número de plantas por rizomas contribuye a disminuir la humedad y a una mejor distribución al aplicar fungicidas (Etebu y Young-Harry, 2011).

Cultivares resistentes

A partir de 1994, se introdujeron en Cuba los cultivares 'FHIA-18', 'FHIA-03', 'FHIA-01', 'FHIA-02' y 'FHIA-21', desarrollados por la FHIA, con resistencia parcial a la Sigatoka negra (Pérez *et al.*, 2003b). Existen aproximadamente 10 000 ha plantadas de estos cultivares. Sin embargo, sus frutos son pocos aceptados por el consumidor y por tanto afecta negativamente la demanda. Además, requiere de mucho tiempo y espacio así como de una intensa labor de manejo (Vuylsteke *et al.*, 1997).

Control químico

La aplicación de fungicidas químicos constituye la medida más efectiva y extendida para el control de la Sigatoka negra (Barraza *et al.*, 2011). Según Bennet y Arneson (2003) una plantación comercial requiere entre 38 y 50 aplicaciones de fungicida anuales. Más del 30% del costo de producción total de los bananos está dirigido directamente al control químico de *M. fijiensis* (Kema, 2006).

Según su especificidad, los fungicidas pueden clasificarse como protectantes o sistémicos (Pérez-Vicente, 2012). Los fungicidas protectantes son de acción multisitio (bajo o nulo riesgo de resistencia). Se incluyen en este grupo el mancozeb y el clorotalonil. Los fungicidas sistémicos son de acción sitio-específico (moderado a alto riesgo de resistencia) e incluyen fungicidas de grupos como los benzimidazoles, aminas, triazoles, estrobirulinas y anilino pirimidinas (Martínez *et al.*, 2011).

Los fungicidas protectantes, aplicables solo en agua o en emulsiones, forman una capa sobre la superficie de la hoja que inhibe la germinación de las esporas y la penetración de *M. fijiensis* en la hoja. Mientras, los fungicidas sistémicos son absorbidos por la planta y pueden actuar sobre el hongo (Marín *et al.*, 2003). Debido a esto, generalmente, se utilizan mezclas de fungicidas sistémicos y protectantes o dos sistémicos con diferentes mecanismos de acción. Estos compuestos pueden ser preparados en emulsiones aceite-agua o en mezclas de diferentes aceites (Pérez-Vicente, 2012).

Las continuas aplicaciones de estos productos aumentan el grado de contaminación del ambiente y el deterioro de la salud humana. Se ha detectado, además, pérdida de la sensibilidad de *M. fijiensis* a los fungicidas sistémicos del grupo de benzimidazoles, principalmente el benomyl. La resistencia a benomyl persiste aún tras el cese de las aplicaciones por períodos de 3 y hasta 5 años. También, existe pérdida de la sensibilidad al fungicida sistémico propiconazol (triazol) cuando se aplica junto con benomyl (Manzo *et al.*, 2005a). Como consecuencia, se ha incrementado el número de aplicaciones, y el control de la enfermedad resulta más complejo y costoso.

Control biológico

El hecho de que *M. fijiensis* sea un patógeno foliar, y que la Sigatoka negra sea una enfermedad policíclica dificulta su control biológico. La búsqueda de alternativas biológicas para el control de la Sigatoka negra ha recibido poca atención en el pasado, posiblemente por la efectividad de los fungicidas. Sin embargo, debido a la aparición de aislados de *M. fijiensis* resistentes a fungicidas sistémicos (Brent y Hollomon, 2007), aumentan las investigaciones en este sentido (Glare *et al.*, 2012).

Patiño *et al.* (2007) al aplicar bacterias con actividad lítica frente a *M. fijiensis*, en rotación con fungicidas comerciales, lograron la reducción en el total de aplicaciones de un 43% en plátanos y 46% en bananos. Ceballos *et al.* (2012) mostraron cómo una cepa de *Bacillus*

subtilis EA-CB0015 y otra de *B. amyloliquefaciens* EA-CB0847 tenían efectos antagonistas frente a *M. fijiensis* y características *in vitro* que podrían proporcionarles ventajas para colonizar la filosfera de las plantas de *Musa* spp.

Hasta el momento, dos productos comerciales basados en cepas de *B. subtilis* QST 713 (Serenade®) y *B. pumilus* QST 2808 (Sonata®), han sido probados con éxito frente a Sigatoka negra (Serrano *et al.*, 2013). Gutiérrez-Monsalve *et al.* (2015) demostraron el control de la Sigatoka negra por un fungicida biológico basado en *B. subtilis* EACB0015 y sus metabolitos.

Algunos estudios demuestran que las cepas de *Trichoderma* spp. tienen efectos antibióticos y micoparásitos sobre *M. fijiensis* (Alvindia, 2012), al inhibir el crecimiento del micelio del hongo a partir de la producción de glucanasas y quitinasas (Ochoa, 2002). El efecto antagonista de *Trichoderma* spp. se basa fundamentalmente, en la competencia por espacio y nutrientes en el hospedante (Arzate-Vega *et al.*, 2006).

La aceptación pública, debido a algunas inconsistencias en experimentos de campo (Hynes y Boyetchko, 2006, Glare *et al.*, 2012), y los costos de producción de los productos biológicos son los mayores impedimentos para su generalización. No obstante, la integración de estos productos con los fungicidas convencionales podría mejorar el manejo a la resistencia de los fungicidas. Esta problemática ha favorecido la aparición de investigaciones encaminadas a la búsqueda de alternativas menos dañinas para el control de la Sigatoka negra (Echeverri, 2013).

El empleo de extractos de plantas constituye otra alternativa sostenible en el control de la Sigatoka negra. Diversos estudios *in vivo* han logrado reducir el índice de infección de *M. fijiensis* a valores de 25-33% (Marín *et al.*, 2008).

2.3. Uso de extractos de plantas para el control de *Mycosphaerella fijiensis*

El uso de extractos de plantas se encuentra entre las alternativas más viables, para el control de patógenos. Estos biopreparados, dado su origen biológico, son biodegradables y no impactan negativamente sobre la salud humana o el ambiente (Viveros y Castaño, 2006).

Se ha realizado un grupo de estudios dirigidos al uso de extractos de plantas para el control de *M. fijiensis*. Morales *et al.* (2010) obtuvieron extractos acuosos de *Momordica charantia* L., *Salvia officinalis* L. y *Cymbopogon citratus* (DC. ex Nees) Stapf, los cuales mostraron actividad inhibitoria sobre la fase asexual de *M. fijiensis*. En condiciones semicontroladas,

estos extractos asperjados en el cultivar 'Grande naine' mostraron un efecto antifúngico frente a *M. fijiensis*, con una respuesta similar al Maconzeb (Morales *et al.*, 2011). Por su parte, Azuola y Vargas (2007) al evaluar combinaciones de extractos etanólicos de *Heliotropium indicum* L. y *Ricinus communis* L. frente a *M. fijiensis* obtuvieron bajos valores de infección.

Niño *et al.* (2007) evaluaron la actividad antifúngica de extractos metanólicos y de diclorometano de hojas de especies de las familias *Solanaceae*, *Asteraceae*, *Rubiaceae* y *Euphorbiaceae* frente a *M. fijiensis*. Los extractos de las especies *Commelina diffusa* Burm, *M. charantia*, *Pavonia* sp., *Plenax* sp., *Piper hispidum* Sw., *Piper peltatum* L., *Sida rhombifolia* L. y *Zisygium aromaticum* (L.) Merr. y Perry inhibieron la germinación del tubo germinativo de las ascosporas de *M. fijiensis*. Mosquera *et al.* (2009) mostraron que extractos de *Topobea discolor* Hochr. presentan porcentajes de inhibición del crecimiento de *M. fijiensis* tanto en la fase sexual como en la asexual. En consecuencia, esta especie de planta se podría considerar como un buen agente para el control de la Sigatoka negra.

El uso de los extractos de plantas como fungicidas se debe, fundamentalmente, a la presencia de combinaciones de compuestos bioactivos producto del metabolismo celular. Muchos de estos compuestos son metabolitos secundarios, no esenciales para procesos como la fotosíntesis, respiración, crecimiento, desarrollo y reproducción de las plantas, pero con un papel importante en la interacción con el ambiente (Verpoorte, 2000). Su clasificación es compleja. Entre ellos podemos encontrar los alcaloides, esteroides, ácidos fenólicos, flavonoides, saponinas, taninos y terpenos (Dixon, 2001), los cuales participan en los mecanismos naturales de defensa de la planta contra microorganismos (Viveros y Castaño, 2006).

En el género *Musa* y otros grupos emparentados se ha detectado la presencia de fenilfenalenonas, cuya concentración, en el caso de *Musa* spp., muestra una correlación positiva con los fenotipos resistentes a *M. fijiensis* (Otálvaro *et al.*, 2002a). Esto indica que estos compuestos pudieran tener una implicación en los mecanismos de defensa de *Musa* spp. frente a *M. fijiensis*.

2.4. Fenilfenalenonas

2.4.1. Clasificación y estructura

Las fenilfenalenonas son compuestos fenólicos presentes en la familia *Musaceae* que pueden actuar como fitoalexinas (Luis *et al.*, 1993, Luis *et al.*, 1995, Echeverri *et al.*, 2012) y fitoanticipinas (Luis *et al.*, 1999). En las familias *Strelitziaceae* (Hölscher y Schneider, 2000), *Haemodoraceae* (Hölscher y Schneider, 1997, Opitz y Schneider, 2002) y *Pontederiaceae* (Della Greca *et al.*, 1993) actúan como fitoanticipinas (Flors y Nonell, 2006).

Muchas fenilfenalenonas son pigmentos constitutivos de las raíces de plantas de la familia *Haemodoraceae*. En *Musa acuminata*, las fenilfenalenonas se acumulan cuando son enfrentadas a *Colletotrichum musae* Berk. y Curt (Kamo *et al.*, 2001), *F. oxysporum* (Luis *et al.*, 1994, Luis *et al.*, 1996) y *M. fijiensis* (Luis *et al.*, 1993). También, infecciones con *R. similis* estimulan la producción de fenilfenalenonas (Binks *et al.*, 1997, Hölscher *et al.*, 2014). Estos compuestos se han aislados de las raíces y las cáscaras de los frutos de los bananos, así como de los sitios de infección sobre la hoja, una muestra de que las fenilfenalenonas pueden actuar como fitoalexinas y jugar un importante papel en los mecanismos de defensa de plátanos y bananos.

Las fitoalexinas son compuestos de bajo peso molecular con actividad antimicrobiana, sintetizadas y acumuladas en las plantas después de su exposición ante un microorganismo o algún estrés (Paxton, 1980). Las fitoanticipinas pueden estar presentes antes o después de la exposición frente a un microorganismo aunque se producen a partir de constituyentes preexistentes (VanEtten *et al.*, 1994).

El término fenilfenalenona deriva del sistema principal tricíclico del fenaleno, un grupo carbonilo y un anillo fenilo lateral enlazado al carbono C-4 ó C-9 (Echeverri *et al.*, 2012). Estos compuestos son generalmente referenciados como derivados de 9-fenilfenalenonas o 4-fenilfenalenonas, refiriéndose a la relación 1,3 (*peri*) entre un carbono oxigenado y el carbono que soporta el anillo fenilo lateral (Hidalgo *et al.*, 2009).

La primera fenilfenalenona aislada en el género *Musa* fue la irenolona (4-fenilfenalenona) en la especie *Musa x paradisiaca* (Luis *et al.*, 1993). Seguidamente, se encontraron cuatro nuevos compuestos del tipo 9-fenilfenalenonas, los cuales se denominaron de forma general musanolonas (Figura 3) (Luis *et al.*, 1996). Estudios posteriores han demostrado la existencia de varios tipos de fenilfenalenonas en las musáceas. Algunos de estos

compuestos se han encontrado en más de una especie como: 2-hidroxi-9-fenilfenalen-1-ona (anigorufona), 2-hidroxi-9-(4-hidroxifenil)-fenalen-1-ona (hidroxianigorufona), 3,3'-bis-[2-hidroxi-9-(4-hidroxifenil)-fenalen-1-ona] (3,3'-bis-hidroxianigorufona), irenolona y musanolona E (Luis *et al.*, 1995, Luis *et al.*, 1996, Binks *et al.*, 1997, Hölscher y Schneider, 1998, Otálvaro *et al.*, 2002b, Liu *et al.*, 2014a).

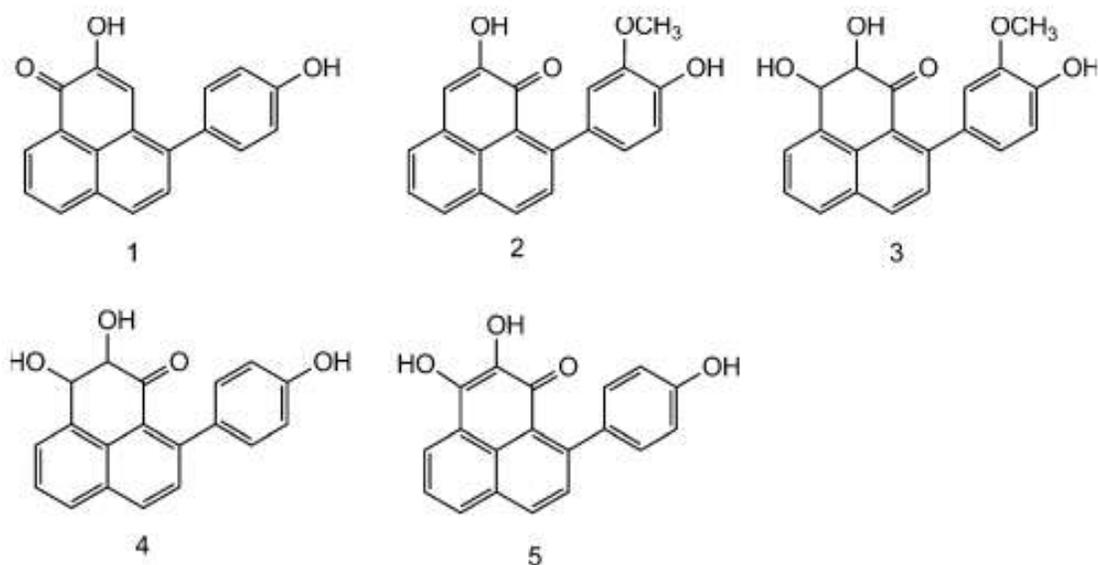


Figura 3. Estructura de las primeras fenilfenalenonas aisladas de *Musa* spp. (1) Irenolona y (2-4) Musanolonas (Echeverri *et al.*, 2012).

2.4.2. Ruta biosintética

La síntesis de las fenilfenalenonas depende de dos importantes rutas metabólicas: la del ácido siquímico y la de los fenilpropanoides. Mediante la ruta del ácido siquímico se genera el aminoácido fenilalanina, principal precursor de estos compuestos. La fenilalanina es transformada en ácido p-cumárico por las enzimas fenilalanina amonio liasa y cinamato hidroxilasa. Dos unidades de ácidos fenilpropanoicos -una de ácido cinámico y otra de hidroxicinamatos-, se condensan con un carbono del acetato dando lugar a la formación de un intermediario diarilheptanoide, el cual, vía cicloadición intramolecular de Diels-Alder forma el núcleo fenilfenalénico (Hidalgo *et al.*, 2009, Torres *et al.*, 2009).

2.4.3. Propiedades antifúngicas

La actividad biológica de las fenilfenalenonas, frente a microorganismos, se debe principalmente a su acción como fitotoxina. Ante la estimulación luminosa estos compuestos

promueven la síntesis de singletes de oxígeno $O_2(a'\Delta g)$ con un cuanto de eficiencia (Φ_{Δ}) (Flors *et al.*, 2006). Los $O_2(a'\Delta g)$ reaccionan con un amplio número de sustratos biológicos como: membranas lipídicas, proteínas y ácidos nucleicos (Flors y Nonell, 2006). En presencia de los $O_2(a'\Delta g)$ el ergosterol, un importante componente de las membranas celulares de los hongos y precursor de la vitamina D, se transforma en peróxido de ergosterol. El aumento de las concentraciones de peróxido de ergosterol provoca inestabilidad de las membranas celulares y muerte celular (Trigos y Ortega-Regules, 2002).

Se halla bien argumentada la presencia de fenilfenalenonas en familias del orden *Zingiberales*, por lo que el estudio de especies de estas y otras familias del orden pudieran representar un avance en la búsqueda de estos compuestos con acción frente a *M. fijiensis*, ya que se ha visto que pueden actuar como fitoanticipinas y/o fitoalexinas.

2.5. Características de las especies del orden *Zingiberales*

Zingiberales es un orden monofilético de monocotiledóneas con aproximadamente 2 000 especies, distribuidas en las regiones tropicales y subtropicales. El orden consta de 92 géneros distribuidos en ocho familias: *Musaceae*, *Strelitziaceae*, *Lowiaceae*, *Heliconiaceae*, *Zingiberaceae*, *Costaceae*, *Cannaceae* y *Marantaceae* (Kress *et al.*, 2001) (Figura 4). La familia más numerosa es *Zingiberaceae* con unas 1 200 especies (Kress *et al.*, 2002), mientras que las de menor tamaño son *Canaceae* y *Lowiaceae* con 10 especies cada una (Prince y Kress, 2002).

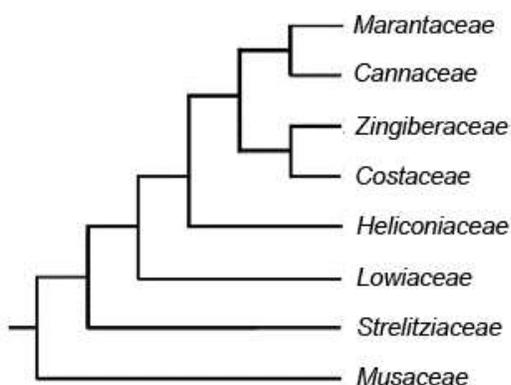


Figura 4. Cladograma representando las relaciones filogenéticas en las ocho familias del orden *Zingiberales* (Manchester y Kress, 1993).

Excepto *Lowiaceae*, el resto de las familias presentan especies con alto valor económico y/u ornamental. Los géneros *Musa* y *Ensete* de la familia *Musaceae*, así como *Maranta*

arundinacea L. y *Canna indica* L. de las familias *Marantaceae* y *Cannaceae*, respectivamente, constituyen una fuente importante de almidón. Las especies de la familia *Zingiberaceae* son ampliamente utilizadas como condimentos, colorante (*Curcuma* spp.), perfumes (*Hedichyllum* spp.) y por sus propiedades medicinales (*Zingiber officinale* Roscoe, *Amomum villosum* Lour, *Stahlianthus involucratus* (King ex Baker) Craib ex Loes. y *Curcuma* spp.) (Prince y Kress, 2002).

En Cuba, es amplia la presencia de especies del orden *Zingiberales*. Estas, además de los plátanos y bananos, tienen su mayor valor como flores de porte. No obstante, el estudio de extractos de algunas de ellas pudiera aportar conocimientos en la búsqueda de nuevos compuestos para el control de la Sigatoka negra.

Musa textilis

Es una hierba perenne y con rizomas de la familia *Musaceae*, originaria de Filipinas. Se conoce con el nombre abacá. Presenta un pseudotallo formado por vainas foliares que puede alcanzar de 3-8 m de alturas con un diámetro de 12-30 cm. El limbo de la hoja es lanceolado con una coloración verde brillante en la superficie adaxial y la presencia de manchas rojizas en la región abaxial. Posee inflorescencias en espigas cortas formadas por 10-12 brácteas agrupadas en dos filas donde las flores femeninas se disponen en la región basal y las masculinas en la distal. Los frutos son de 5-10 cm, angulosos, con tres caras, curvados hacia arriba cuando maduran, la pulpa es dura y con numerosas semillas negras (Delin y Kress, 2000).

Las fibras de *M. textilis* son ampliamente utilizadas en la industria textil y en la manufactura de papel de alta calidad (del Río y Gutiérrez, 2006). En esta especie se ha detectado la presencia del al menos siete fenilfenalenonas de los cuales el (1R)-2,3-dihidro-4,9-dihidroxi-8-metoxi-1-fenilfenaleno no se había identificado en otras especies (del Río *et al.*, 2006).

***Musa acuminata* cv. 'Pelipita' Colla**

Es una planta de la familia *Musaceae*, originaria de las Filipinas, que pertenece al grupo ABB. El pseudotallo es verde claro y puede alcanzar una altura de hasta 4,5 m. Los frutos son cortos con un promedio de 120 por racimo, el cual puede alcanzar un peso de 20 kg. Este cultivar es resistente a *M. fijiensis*, lo cual pudiera estar relacionado con la presencia del compuesto (1R*,2 S*,3 R*)-2,3-dihidro-1,2,3-trihidroxi-9-(4'-metoxifenil)-1h-fenaleno, que actúa como precursor en la biosíntesis de la fenilfenalenonas (Otálvaro *et al.*, 2002a).

***Strelitzia reginae* Banks**

Es una planta herbácea, perenne y con rizomas conocida como ave del paraíso, que pertenece a la familia *Strelitzaceae*. Las raíces son fasciculadas, gruesas y carnosas, y acumulan gran cantidad de sustancias de reserva. Las hojas son de color verde glauco, coriáceas, con los bordes ondulados, ápice generalmente cóncavo y peciolo muy largo. Del cuello de la planta nacen escapos de 0,4-1,7 m donde se asientan las inflorescencias. Las inflorescencias están protegidas por una espata carnosa en forma de barquilla, en cuyo interior están las flores. El fruto es una cápsula dehiscente trilobular y las semillas son de forma esférica o ligeramente globales que suelen ser de 70-80 (Odriozola y García, 1972). Hölscher y Schneider (2000) identificaron en esta especie la presencia de cinco fenilfenalenonas, de los cuales el 4-hidroxi-2-metoxipenalen-1-ona fue descrito por primera vez.

***Ravenala madagascariensis* Sonn**

Es una planta de la familia *Strelitzaceae*, originaria de Madagascar, y nombrada comúnmente como árbol del viajero. Presenta hábito de palmera con tronco solitario de hasta 25 m. Las hojas son pinnadas, pecioladas, dispuestas en dos filas. La inflorescencia es lateral, compuesta de 6-12 espádices cimosos con espatas dispuestas en dos filas. Las flores son trímeras con cáliz y corola. La corola posee dos de los segmentos mayores que el tercero. El androceo tiene seis estambres. El fruto es en forma de cápsula, con numerosas semillas provistas de un arilo azul brillante (Gilman y Watson, 1994).

R. madagascariensis se cultiva generalmente con fines ornamentales, aunque en la medicina tradicional se emplea como remedio para algunas enfermedades. Extractos n-hexánicos, en acetato de etilo, etanólicos y acuosos de esta planta se han utilizado en tratamientos contra la diabetes mellitus con resultados positivos (Priyadarsini *et al.*, 2010).

***Heliconia wagneriana* Petersen**

La heliconia arco iris pertenece a la familia *Heliconiaceae* y es originaria de las zonas más calurosas y húmedas de América Central y El Caribe. Alcanza hasta 2,5 m de altura y posee 4-5 hojas lineal-lanceoladas, de peciolo largo, apuntadas y de más de 80 cm de longitud. Las brácteas son dirigidas hacia arriba y en forma de barco, constituyen una unidad compacta de color rosa rojo, rojo anaranjado en los bordes, Se hallan ribeteadas por un reborde verde y duro. Las brácteas superiores son más cortas que las inferiores; algunas veces acaban en

punta coloreada. Las flores de color verde, crecen en ovillo y sobresalen de las brácteas. El pétalo externo central aparece aislado y claramente engrosado, los cinco pétalos restantes crecen unidos. Existen cinco estambres fértiles y uno corto y estéril (petaloide) (Tropical Biology, 2010).

***Heliconia rostrata* Ruiz y Pav**

Es una hierba de 3-6 m de altura, que pertenece a la familia *Heliconiaceae*. Presenta hojas con peciolo de 19-30 cm de largo y lámina de 92-125 cm de longitud. La inflorescencia es péndula, de hasta 70 cm de largo. El raquis es flexuoso, de color rojo aracnoide a mínimamente pubérulo. Las espatas son dísticas a espiraladas, 14-30 por inflorescencia, rojas con márgenes y ápices amarillo verdosas. Las flores son blancas hacia la base y amarillo-verdosas hacia el ápice, glabras y rectas. El fruto es tipo drupa (Hermano Leon, 1946).

***Alpinia speciosa* (JC Wendl) Schum**

Es una planta herbácea de la familia *Zingiberaceae*, de rizomas robustos y tallo que puede alcanzar más de 2 m de altura. Las hojas son oblongo lanceoladas con una longitud de 30-70 cm. Las flores poseen un cáliz subcampanado de 1,8-2,5 cm y se agrupan en una inflorescencia en panoja racemiforme. En un análisis fitoquímico de hojas de esta especie se identificó la presencia de taninos, fenoles y alcaloides, así como aceites esenciales con actividad antioxidante (Devi y Rao, 2014). Los extractos hidroalcohólicos de *A. speciosa* se utilizan en la medicina tradicional como antidiuréticos y para el tratamiento de la hipertensión arterial (Vargas y Carvalho, 2010).

***Alpinia purpurata* (Vieill.) Schum**

Es una planta perenne y con rizomas, que pertenece a la familia *Zingiberaceae*. Esta especie presenta un sistema de ramificación simpodial, de rizomas gruesos y carnosos. El pseudotallo posee una estructura erecta no ramificada que puede alcanzar 1-4 m de altura. En la parte terminal del pseudotallo se origina la inflorescencia, que está constituida por una vistosa espiga de brácteas rojo brillante, que encierran en la axila una flor blanca tubular inconspicua (González y Mogollón, 2001).

Extractos hidroalcohólicos de *A. purpurata* se han utilizado como tratamiento contra la hipertensión arterial (Pimentel *et al.*, 2009). Además, extractos etanólicos, clorofórmicos y en

éter de petróleo han mostrado actividad antimicrobiana (Kochuthressia *et al.*, 2010). En la bibliografía consultada no se ha encontrado ningún estudio relacionando con la presencia de fenilfenalenonas en esta especie.

En la bibliografía consultada no se encontró ningún estudio relacionando con la presencia de fenilfenalenonas en *R. madagascariensis*, *H. wagneriana*, *H. rostrata*, *A. speciosa* y *A. purpurata*. No obstante, debido a la estrecha relación filogenética que existen entre las especies de *Zingiberales*, por ser este un orden monofilético, estos compuestos pudieran estar presentes. La posible presencia de fenilfenalenonas y otros compuestos en estas especies, así como su actividad antifúngica frente a *M. fijiensis* son de gran interés en la búsqueda de alternativas ambientalmente seguras y efectivas en el manejo de la Sigatoka negra, principal enfermedad que afecta a los plátanos y bananos en Cuba.

3. Materiales y métodos

3.1. Caracterización de extractos de hojas de especies del orden *Zingiberales*

Con el objetivo de caracterizar los extractos de hojas de ocho especies del orden *Zingiberales* se realizó una extracción asistida por ultrasonido en metanol 70%, a partir de la cual se obtuvieron fracciones en cloroformo (clorofórmica), acetato de etilo (etílica) y agua (acuosa). Después, se cuantificó el contenido de fenoles totales de los extractos crudos y se realizó una Cromatografía en capa delgada a cada uno de ellos y sus correspondientes fracciones.

3.1.1. Obtención de los extractos

Se colectaron hojas de *M. textilis*, *R. madagascarensis*, *H. wagneriana*, *H. rostrata*, *S. reginae*, *A. speciosa* y *A. purpurata* en áreas del Centro de Estudios Jardín Botánico de la Universidad Central “Martha Abreu” de Las Villas, Santa Clara, Cuba, las cuales fueron identificadas por especialistas de la institución. Las hojas de *M. acuminata* cv. ‘Pelipita’ se adquirieron en el Instituto de Biotecnología de las Plantas, Santa Clara, Cuba (Figura 5).

Las hojas de todas las especies se lavaron con agua destilada y se secaron en una estufa (Haubelt Laborgeräte GmbH, Alemania) a 60 °C por cinco días. Seguidamente, se trituraron en un molino de cinco pulgadas (Christy y Norris, Reino Unido), y se tamizaron con una maya de un tamaño de poro de 0,5 mm. A 5 g de polvo se le adicionaron 30 mL de metanol 70% (UniChem, China), se colocaron en un baño ultrasónico (Branson Ultrasonic Corporation, EE.UU.) durante 20 min, seguidamente se filtraron en una bomba de vacío (Liuyi, China). Los extractos se secaron al aire en campana de extracción (Siemens, Alemania), y posteriormente se le determinó la masa seca y el rendimiento. Las extracciones se realizaron tres veces para cada una de las especies.

A partir del extracto crudo de cada especie, se obtuvieron tres fracciones mediante dos particiones con solventes de diferentes polaridades. Primeramente, se realizó una partición en cloroformo (UniChem, China)-agua destilada y luego la fracción acuosa se particionó con acetato de etilo (Titolchimica, Italia). En ambos casos, la partición se realizó tres veces a una proporción 2:1, 1:1, 1:1, respectivamente. Las fracciones clorofórmica y etílica se secaron al aire en campana de extracción, mientras que la fracción acuosa se liofilizó en un *Alpha 1-2 LD plus* (Crist, Alemania), y se les determinó la masa seca. Las particiones se realizaron dos veces para cada una de las especies.



Figura 5. Especies del orden *Zingiberales* utilizadas para la obtención de los extractos objeto de estudio. (A) *Musa textilis*, (B) *Musa acuminata* cv. 'Pelipita', (C) *Ravenala madagascariensis*, (D) *Heliconia wagneriana*, (E) *Strelitzia reginae*, (F) *Heliconia rostrata*, (G) *Alpinia speciosa* y (H) *Alpinia purpurata*.

3.1.2. Cromatografía en placa delgada (TLC)

Se realizó un análisis cromatográfico a cada extracto crudo y sus correspondientes fracciones. Se empleó como fase estacionaria placas de sílica gel 60 F254 (Merck, Alemania) y como fase móvil el sistema dietil éter (Merck, Alemania)/n-hexano (UniCehm,

China) (7:1). La detección de compuestos fenólicos se realizó con luz ultravioleta a 365 nm en un transiluminador (Liuyi, China) (Heftmann, 1967). La detección de fenilfenalenonas se realizó empleando como revelador el sistema de solventes ácido sulfúrico (Panreac, Francia)/ácido acético (UniChem, China) (1:9) (Otálvaro *et al.*, 2007).

3.1.3. Cuantificación del contenido de fenoles totales

La concentración de fenoles totales en cada extracto crudo se cuantificó según el método descrito por (Silva-Espinoza *et al.*, 2013), con modificaciones. Brevemente, a 150 µL del extracto disuelto en 850 µL de agua destilada se le adicionó 80 µL de Folin-Ciocalteu 1N (Merck, Alemania), y se mantuvo a temperatura ambiente durante 5 min. Luego, se añadió 800 µL de Na₂CO₃ 7% (UniChem, China) y se completó con agua destilada hasta 2 mL; se agitó en vortex *Genius 3* (IKA, Alemania) y se mantuvo a temperatura ambiente durante 90 min. Se midió la absorbancia en un espectrofotómetro UV-VIS (Rayleigh 1601, China) a una longitud de onda de 750 nm.

La concentración de fenoles totales se determinó mediante extrapolación en una curva de calibración empleando como patrón ácido gálico (Sigma-Aldrich, Alemania). La concentración de fenoles totales de cada extracto crudo se expresó en mg equivalentes de ácido gálico.mL⁻¹ de extracto (EAG.mL⁻¹). Los extractos crudos se ensayaron por triplicado y la cuantificación se realizó dos veces.

3.2. Efecto de extractos de hojas de especies del orden *Zingiberales* en el crecimiento micelial de *Mycosphaerella fijiensis*

Con el objetivo de determinar el efecto de extractos de hojas de especies del orden *Zingiberales* en el crecimiento micelial de *M. fijiensis*, se determinó la concentración mínima inhibitoria de los extractos crudos y sus fracciones clorofórmica, etílica y acuosa frente una suspensión micelial de *M. fijiensis*. La concentración mínima inhibitoria sirvió de guía para evaluar los extractos y fracciones promisorios en la inhibición del crecimiento micelial de *M. fijiensis*.

La suspensión micelial de *M. fijiensis* se preparó a partir del aislado monoascospórico CCIBP-Pf-83 crecido en medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (Difco, Alemania). El micelio de *M. fijiensis* se fragmentó en homogenizador *Ultra-Turrax T 25* (Rose Scientific Ltd., Canadá) y se inoculó en Erlenmeyers (250 mL de capacidad) con 100 mL de medio de cultivo Mínimo (KH₂PO₄ 1 g.L⁻¹ (UniChem, China), MgSO₄ 7H₂O 0,5 g.L⁻¹ (UniChem, China),

KCl 0,5 g.L⁻¹ (UniChem, China), FeSO₄ 7H₂O 10 mg.L⁻¹ (UniChem, China), NaNO₃ 2 g.L⁻¹ (UniChem, China), Glucosa 1% (UniChem, China), solución de elementos traza 0.2 ml.L⁻¹, pH 5,6±0,2) (Ocaña, 2008). Los Erlenmeyers se incubaron durante 14 días a 28 °C en zaranda (Gerhardt, Alemania) a 120 rpm. Luego del periodo de incubación, a partir de 0,5 g de micelio se preparó mediante homogenización una suspensión micelial de aproximadamente 5 x 10⁵ propágulos de *M. fijiensis*.mL⁻¹ en medio de cultivo Mínimo, la cual se usó en los ensayos de determinación de la actividad antifúngica.

3.2.1. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC)

La MIC de los extractos crudos y sus fracciones se determinó empleando el método de microdilución descrito por Eloff (1997) En cada pocillo de una microplaca de 96 pocillos (Eppendorf, Alemania) se colocaron 100 µL de medio de cultivo Mínimo. Al primer pocillo correspondiente a cada uno de los extractos se le adicionó 92 µL del medio de cultivo Mínimo y 8 µL del extracto disuelto en DMSO (del inglés: *Dimethyl sulfoside*) (BDH Prolabo, Francia), a una concentración de 8 000 µg.mL⁻¹. A partir del primer pocillo, se realizaron cuatro diluciones seriadas para evaluar los extractos crudos y sus fracciones a las siguientes concentraciones: 4 000 µg.mL⁻¹, 2 000 µg.mL⁻¹, 1 000 µg.mL⁻¹ y 500 µg.mL⁻¹. A cada pocillo se le adicionaron 100 µL de una suspensión de 5x 10⁵ propágulos de *M. fijiensis*.mL⁻¹ de medio de cultivo Mínimo.

Como control positivo de actividad antifúngica se empleó *M. fijiensis* en medio de cultivo Mínimo en DMSO 40% y como controles negativos *M. fijiensis* en medio de cultivo Mínimo, y en medio de cultivo Mínimo en DMSO 2%. Además, se utilizaron controles de esterilidad que contenían el medio de cultivo Mínimo sin *M. fijiensis*.

Las microplacas se incubaron a 28 °C en la oscuridad por 14 días. La MIC se definió como la menor concentración del extracto crudo o cualquiera de sus fracciones que inhibieran el crecimiento de *M. fijiensis*. Los extractos crudos o sus fracciones y los controles se ensayaron por duplicado, y la MIC se realizó dos veces.

El efecto fungicida o fungistático de los extractos crudos o sus fracciones con actividad sobre el crecimiento micelial de *M. fijiensis*, se determinó mediante la transferencia de fragmentos de micelio del hongo con los extractos que resultaron promisorios en la MIC a pocillos de una microplaca que contenía 100 µL medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (Difco, Alemania). Como control positivo del crecimiento de *M. fijiensis* se utilizó el hongo sin la presencia de los

extractos crudos o sus fracciones. La microplaca se incubó a 28 °C en oscuridad y se evaluó a los 15 días el crecimiento de *M. fijiensis*. Los extractos crudos o sus fracciones se ensayaron por duplicado.

3.2.2. Cuantificación del crecimiento micelial

En una microplaca de 96 pocillos, se colocaron suspensiones miceliales de *M. fijiensis* en medio de cultivo Mínimo y los extractos crudos o sus fracciones a una concentración según la MIC. Como blanco se empleó el extracto crudo o sus fracciones en medio de cultivo Mínimo sin *M. fijiensis* y el medio de cultivo Mínimo con DMSO 2%. Como control negativo de actividad antifúngica se utilizó *M. fijiensis* en medio de cultivo Mínimo y como controles positivos se empleó *M. fijiensis* en medio de cultivo Mínimo con DMSO 40% y con el fungicida Orius 25 EW 0,2% (Tebuconazol 25%) (Milenia Agro Ciencias S.A., Brasil). Se utilizó un control de esterilidad que contenía el medio de cultivo Mínimo sin *M. fijiensis*.

La microplaca se incubó a 28 °C en la oscuridad y a las 72 h se evaluó el crecimiento de *M. fijiensis* mediante la lectura de absorbancia a 595 nm en un lector de microplacas Opsys MR (Thermo LabSystems, EE.UU.). Se realizaron cinco réplicas de los extractos crudos o sus fracciones, los blancos y controles, y la cuantificación se realizó dos veces.

3.3. Efecto de extractos de hojas de especies del orden *Zingiberales* en la germinación de conidios de *Mycosphaerella fijiensis*

Con el objetivo de determinar el efecto de extractos de hojas de especies del orden *Zingiberales* en la germinación de los conidios de *M. fijiensis*, se evaluó el porcentaje de conidios germinados de *M. fijiensis* en contacto con los extractos o sus fracciones que, según la MIC, resultaron promisorios en la inhibición del crecimiento micelial de *M. fijiensis*.

Para la obtención de los conidios de *M. fijiensis* se prepararon tubos de ensayo (150 x 22 mm) con 1 mL del medio de cultivo Agar Papa Zanahoria (papa 200 g.L⁻¹, zanahoria 200 g.L⁻¹, agar 15 g.L⁻¹; pH 5,6±0,2) (Acosta-Suárez *et al.*, 2004) en forma de cuña, los cuales se inocularon con 200 µL de una suspensión micelial de aproximadamente 5 x 10⁵ propágulos de *M. fijiensis*.mL⁻¹ de medio de cultivo Mínimo, obtenida como se describe en el acápite 3.2. Los tubos de ensayo se incubaron a 20 °C en cámara climatizada (Gallenkamp, Reino Unido) con luz blanca continua de 60 µmoles.m⁻².s⁻¹ durante 10 días, según lo descrito por (Carlier *et al.*, 2002).

La inhibición de la germinación de conidios se determinó mediante la técnica de la gota colgante (Kumaresan *et al.*, 2005). La suspensión conidial de *M. fijiensis* se obtuvo a partir de la agitación en vortex de los tubos de ensayo con 1 mL de agua destilada estéril. Una gota de esta suspensión conidial de *M. fijiensis* con los extractos crudos o sus fracciones, a una concentración según la MIC, se aplicó en portaobjetos excavados que se encontraban dentro de placas de Petri (9 cm) para evitar la desecación. Luego, se evaluaron al microscopio óptico (Novel, China) tres campos por cada gota de suspensión conidial de *M. fijiensis*, en los que se contaron el total de conidios. Como control positivo de actividad antifúngica se empleó el fungicida Orius 25 EW 0,2% y como control negativo agua destilada estéril.

Las placas de Petri se incubaron a 28 °C durante 24 h y se evaluó al microscopio óptico la cantidad de conidios germinados. Los extractos o sus fracciones fueron ensayados por triplicado y la gota colgante se realizó dos veces.

El porcentaje de inhibición de la germinación de conidios por los extractos o sus fracciones se calculó empleando la fórmula $[(C-T)/C * 100]$, donde C corresponde al número de conidios germinados en el control negativo de actividad antifúngica y T al número de conidios germinados en presencia de los extractos. Se consideraron promisorios los extractos que mostraron porcentajes de inhibición superiores al 50%.

3.4. Procesamiento estadístico

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

4. Resultados y Discusión

4.1. Caracterización de extractos de hojas de especies del orden *Zingiberales*

4.1.1. Obtención de los extractos

El empleo de extractos de plantas como fungicidas se debe a que están constituidos por mezclas de metabolitos activos que participan en los mecanismos de defensa de la planta frente a microorganismos (Viveros y Castaño, 2006). La composición de los extractos crudos de plantas depende de la muestra botánica, las condiciones experimentales y las propiedades fisicoquímicas de los compuestos. La complejidad del metabolismo de las plantas proporciona un gran número de moléculas, por lo que los extractos obtenidos a partir de ellas no solo son muy complejas, sino que su composición es muy variable de una extracción a otra (Pino *et al.*, 2013). En los estudios de metabolitos secundarios se emplean varias técnicas de separación (extracción, partición y cromatográficas) con el objetivo de disminuir la complejidad de la muestra y mediante bioensayos, tratar de discernir que metabolito presenta la actividad biológica deseada.

La elección de un adecuado método para la extracción de estos compuestos resulta un paso decisivo en la obtención del extracto (Vinatoru, 2001). La extracción asistida por ultrasonido presenta numerosas ventajas, en comparación con otras técnicas tradicionales, entre las que destacan: aumento de la eficiencia de extracción y disminución del consumo de solventes (Bendicho *et al.*, 2012). También, requiere un menor tiempo de extracción y brinda la posibilidad de trabajar a temperatura ambiente, lo cual es indispensable en muchos casos para mantener la funcionalidad del compuesto extraído (Azuola y Vargas, 2007).

En el presente estudio, mediante la extracción asistida por ultrasonido se obtuvieron ocho extractos crudos en metanol 70%: *M. textilis* (Mt-met), *R. madagascariensis* (Rm-met), *H. wagneriana* (Hw-met), *H. rostrata* (Hr-met), *S. reginae* (Sr-met), *M. acuminata* cv. 'Pelipita' (MaP-met), *A. speciosa* (As-met) y *A. purpurata* (Ap-met), en tiempos de extracción de 20 min y con rendimientos superiores al 3,5%. En los extractos de *H. wagneriana* y *S. reginae* se obtuvieron los mayores rendimientos, mientras que los valores más bajos correspondieron a los extractos de *R. madagascariensis*, *A. purpurata* y *H. rostrata* (Tabla I).

Tabla I. Rendimiento de los extractos crudos de *Musa textilis*, *Ravenala madagascariensis*, *Heliconia wagneriana*, *Heliconia rostrata*, *Strelitzia reginae*, *Musa acuminata* cv. 'Pelipita', *Alpinia speciosa* y *Alpinia purpurata*, obtenidos mediante extracción asistida por ultrasonido.

Especies de plantas	Masa seca (mg±EE [‡])	Rendimiento (%)
<i>Musa textilis</i>	291,0±29,9 ^b	5,82
<i>Ravenala madagascariensis</i>	215,8±38,3 ^c	4,32
<i>Heliconia wagneriana</i>	411,7±36,4 ^a	8,21
<i>Heliconia rostrata</i>	187,9±19,9 ^c	3,75
<i>Strelitzia reginae</i>	370,6±9,0 ^a	7,41
<i>Musa acuminata</i> cv. 'Pelipita'	243,5± 45,6 ^{bc}	4,87
<i>Alpinia speciosa</i>	310,1±25,1 ^b	6,20
<i>Alpinia purpurata</i>	213,9±9,4 ^c	4,28

Letras distintas en una misma columna indican que las medias difieren estadísticamente para $p < 0,05$, (Kruskal Wallis/ U de Mann Whitney).

[‡] Error estándar.

Al particionar los extractos crudos, para cada especie se obtuvo una fracción clorofórmica, etílica y acuosa: *M. textilis* (Mt-CHCl₃), (Mt-AcEt) y (Mt-a); *R. madagascariensis* (Rm-CHCl₃), (Rm-AcEt) y (Rm-a); *H. wagneriana* (Hw-CHCl₃), (Hw-AcEt) y (Hw-a); *H. rostrata* (Hr-CHCl₃), (Hr-AcEt) y (Hr-a); *S. reginae* (Sr-CHCl₃), (Sr-AcEt) y (Sr-a); *M. acuminata* cv. 'Pelipita' (MaP-CHCl₃), (MaP-AcEt) y (MaP-a); *A. speciosa* (As-CHCl₃) (As-AcEt) y (As-a); *A. purpurata* (Ap-CHCl₃), (Ap-AcEt) y (Ap-a). En las fracciones clorofórmicas se obtuvieron valores de rendimientos que oscilaron entre 3,67-10,27%, en la fracción etílica entre 6,09-12,97% y en la fracción acuosa entre 41,69-83,02% (Tabla II).

Estos resultados indican que la mayoría de los metabolitos presentes en los extractos crudos analizados son de naturaleza polar. Sin embargo, las fenilfenalenonas, presentes en especies del orden *Zingiberales*, las cuales son compuestos fenólicos que pueden actuar como fitoalexinas y fitoanticipinas (Kamo *et al.*, 1998, Otálvaro *et al.*, 2010, Echeverri *et al.*, 2012), presentan baja polaridad. Por tal motivo, generalmente se encuentran en las fracciones clorofórmicas y etílicas (Luis *et al.*, 1993, Luis *et al.*, 1995, Liu *et al.*, 2014a)

Tabla II. Masa seca de las fracciones clorofórmicas, etílicas y acuosas obtenidas a partir de extractos crudos de *Musa textilis*, *Ravenala madagascariensis*, *Heliconia wagneriana*, *Heliconia rostrata*, *Strelitzia reginae*, *Musa acuminata* cv. 'Pelipita', *Alpinia speciosa* y *Alpinia purpurata*.

Especies de plantas	Fracciones mg (%)*		
	Clorofórmica	Etílica	Acuosa
<i>Musa textilis</i>	21,35 (7,34)	20,25 (6,96)	241,6 (83,02)
<i>Ravenala madagascariensis</i>	14,7 (6,81)	28 (12,97)	167,1 (77,42)
<i>Heliconia wagneriana</i>	27,65 (6,72)	32,5 (7,89)	315,1 (76,54)
<i>Heliconia rostrata</i>	19,3 (10,27)	11,45 (6,09)	124,1 (66,02)
<i>Strelitzia reginae</i>	13,6 (3,67)	32,7 (8,82)	154,5 (41,69)
<i>Musa acuminata</i> cv. 'Pelipita'	23,1 (9,49)	20,15 (8,27)	200,6 (82,37)
<i>Alpinia speciosa</i>	25,55 (8,24)	23,55 (7,59)	160,3 (51,69)
<i>Alpinia purpurata</i>	21,9 (10,24)	21,95 (10,26)	174,1 (81,38)

* Porcentaje de rendimientos con respecto a la masa seca en el extracto crudo de cada una de las especies objeto de estudio.

Fenilfenalenonas extraídas de *Musa* spp. con solventes de polaridad baja han mostrado sus propiedades antifúngicas. En este sentido, Otálvaro *et al.* (2007) demostraron la actividad frente a *M. fijiensis* de la 2-hidroxifenalen-1-ona-2-metoxifenalen-1-ona, fenilfenalenonas extraídas de rizomas de *Musa acuminata* var. 'Yangambi km5'.

4.1.2. Cromatografía en placa delgada

En los cromatogramas evaluados bajo luz ultravioleta en todos los extractos crudos, se identificaron flavonoles-3-glicosilados y flavonas (rojos) como se muestra en la Figura 6. Los flavonoles 3,5-metoxilados (azul) se identificaron en todas las fracciones clorofórmicas y etílicas, así como en la fracciones Mt-a y Rm-a. Los flavonoles sin grupo 5-OH y las cumarinas (verde-amarillo) solo se observaron en las fracciones Hr-CHCl₃, MaP-CHCl₃ y Ap-CHCl₃ y en la fracción Hr-AcEt. Sin embargo, las fracciones acuosas mostraron la menor cantidad de metabolitos de esta naturaleza.

La presencia de flavonoides se ha detectado con anterioridad en especies del orden *Zingiberales*. En extractos acuosos de *R. madagascariensis* (Reyad-ul-Ferdous *et al.*, 2014), en extractos etílicos y butanólicos de *A. purpurata* y *A. speciosa* se han identificado otros compuestos de este tipo como la rutina y el kanferol (Victorio *et al.*, 2008). Además, otros

compuestos fenólicos como la cardomonina y alpinietina se han encontrado en los rizomas de *A. speciosa* (Devi y Rao, 2014).

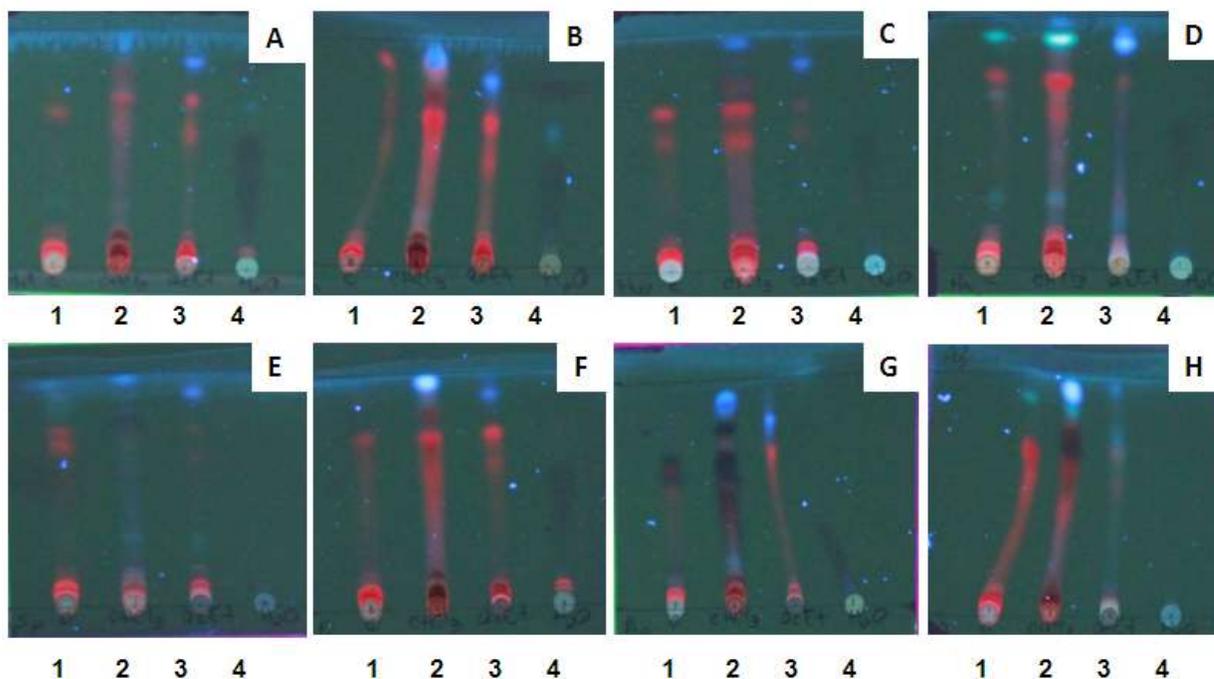


Figura 6. Cromatogramas de los extractos crudos (1) y sus fracciones clorofórmica (2), etílica (3) y acuosa (4) de hojas de especies del orden *Zingiberales*, desarrollados mediante cromatografía en placa delgada con el sistema de solventes n-hexano/éter dietílico (1:7), evaluados a 365 nm. (A) *Musa textilis*, (B) *Ravenala madagascariensis*, (C) *Heliconia wagneriana*, (D) *Heliconia rostrata*, (E) *Strelitzia reginae*, (F) *Musa acuminata* cv. 'Pelipita', (G) *Alpinia speciosa* y (H) *Alpinia purpurata*.

En los cromatogramas revelados con el sistema de solventes ácido sulfúrico/ácido acético (1:9), se identificó la presencia de fenilfenalenonas (manchas coloreadas) tanto en los extractos crudos, como en las fracciones clorofórmicas y etílicas (Figura 7), no así en las fracciones acuosas. En la fracción clorofórmica, de todas las especies estudiadas, se observó una mayor presencia de fenilfenalenonas, en comparación con el resto de las fracciones y de los extractos crudos. Estos resultados deben ser confirmados por técnicas de mayor resolución con el HPLC (del inglés: *High Performance Liquid Chromatographic*) o cromatografía de gases.

En estudios realizados con extractos de *Anigozanthos preissii* Endl. (Hölscher y Schneider, 1997), *Ensete ventricosum* (Welw.) Cheesman (Hölscher y Schneider, 1998) y *S. reginae*

(Hölscher y Schneider, 2000), se identificaron la mayor concentración de fenilfenalenonas en la fracción clorofórmica de los mismos. Esto indica que estos compuestos son de baja polaridad, lo cual coincide con los resultados obtenidos en este estudio.

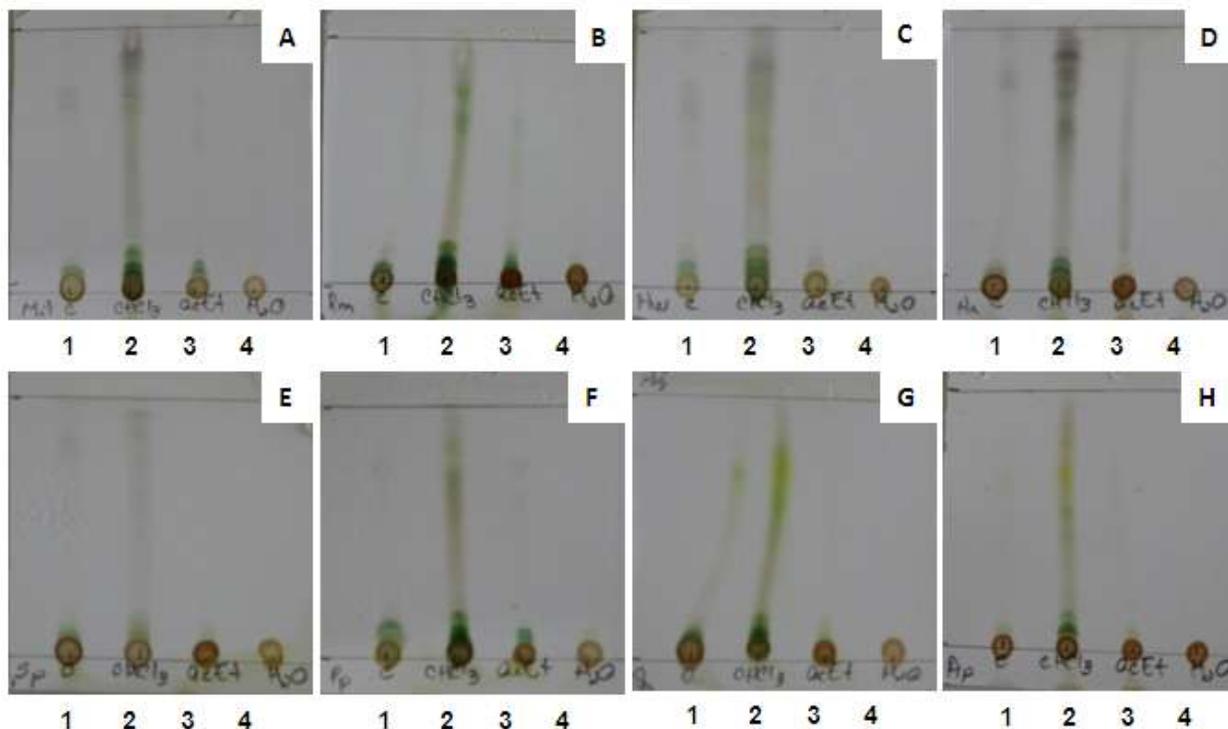


Figura 7. Cromatogramas de los extractos crudos (1) y sus fracciones clorofórmica (2), etílica (3) y acuosa (4) de hojas de especies del orden *Zingiberales*, desarrollados mediante cromatografía en placa delgada con el sistema de solventes n-hexano/éter dietílico (1:7), revelados con el sistema de solventes ácido sulfúrico/ácido acético (1:9). (A) *Musa textilis*, (B) *Ravenala madagascariensis*, (C) *Heliconia wagneriana*, (D) *Heliconia rostrata*, (E) *Strelitzia reginae*, (F) *Musa acuminata* cv. 'Pelipita', (G) *Alpinia speciosa* y (H) *Alpinia purpurata*.

4.1.3. Contenido de fenoles totales

La cuantificación del contenido de metabolitos bioactivos presentes en las plantas, constituye una herramienta eficaz para realizar ensayos *in vitro*, orientados a determinar actividades biológicas (Mujica *et al.*, 2009). Específicamente, en la cuantificación de fenoles totales, uno de los ensayos fotométricos más universales, es el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu basado en la reducción del ácido fosfomolibdico hasta óxidos azules de molibdeno (Ajila *et al.*, 2011).

En todos los extractos crudos se determinaron concentraciones de fenoles totales iguales o superiores a los 0,84 mg EAG.mL⁻¹ de extracto, como se muestra en la Tabla III. En los extractos de *A. speciosa*, *A. purpurata* y *S. reginae* se determinaron las mayores concentraciones, mientras que los extractos de *M. acuminata* cv. 'Pelipita', *M. textilis* y *H. rostrata* mostraron las concentraciones más bajas.

Tabla III. Concentración de fenoles totales en extractos crudos de hojas de *Musa textilis*, *Ravenala madagascariensis*, *Heliconia wagneriana*, *Heliconia rostrata*, *Strelitzia reginae*, *Musa acuminata* cv. 'Pelipita', *Alpinia speciosa* y *Alpinia purpurata*.

Especies de plantas	Fenoles totales (mg EAG.mL ⁻¹ ±EE)
<i>Musa textilis</i>	0,89±0,04 ^d
<i>Ravenala madagascariensis</i>	1,11±0,01 ^c
<i>Heliconia wagneriana</i>	1,36±0,01 ^b
<i>Heliconia rostrata</i>	0,84±0,03 ^d
<i>Strelitzia reginae</i>	1,82±0,07 ^a
<i>Musa acuminata</i> cv 'Pelipita'	0,92±0,04 ^d
<i>Alpinia speciosa</i>	1,93±0,01 ^a
<i>Alpinia purpurata</i>	1,87±0,22 ^a

Letras distintas en una misma columna indican que las medias difieren estadísticamente para $p < 0,05$, (Kruskal Wallis/ U de Mann Whitney).

Según la bibliografía consultada, existen pocos estudios sobre la cuantificación de fenoles totales en las especies evaluadas. En este sentido, (Victorio *et al.*, 2008) obtuvieron resultados similares a los mostrados en este estudio en *A. purpurata* y *A. speciosa*.

4.2. Efecto de extractos de hojas de especies del orden *Zingiberales* en el crecimiento micelial de *Mycosphaerella fijiensis*

Las necesidades actuales del uso de fungicidas ambientalmente seguros y más específicos en su actividad, así como el desarrollo de una cultura agroecológica, han motivado el avance de investigaciones orientadas a proporcionar estrategias de control sostenibles y seguras, entre las cuales se encuentra, el uso de extractos de plantas como fuente de metabolitos secundarios con propiedades antifúngicas.

4.2.1. Concentración mínima inhibitoria

La menor concentración a la cual un producto puede inhibir el crecimiento de un microorganismo, ha sido determinada en trabajos que involucran extractos de plantas frente a microorganismos. El estudio de este parámetro resulta provechoso para determinar la cantidad exacta a aplicar de un producto antimicrobiano frente a cualquier microorganismo, así como para confirmar su resistencia. La comparación de los resultados de la MIC de diferentes extractos de plantas es limitada por el uso de diferentes metodologías y definiciones de este parámetro (Klančnik *et al.*, 2010).

Las fracciones clorofórmicas de todas las especies y las fracciones Mt-AcEt, Sr-AcEt y Ap-AcEt mostraron actividad frente a *M. fijiensis* a concentraciones iguales o inferiores a 4000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Tabla III). Sin embargo, las fracciones acuosas y los extractos crudos de todas las especies no mostraron actividad antifúngica. Las fracciones Mt- CHCl_3 , Hw- CHCl_3 , Sr- CHCl_3 y Ap- CHCl_3 mostraron las menores valores de MIC frente a *M. fijiensis*, 2 000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Las demás fracciones activas mostraron una MIC de 4000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Tabla IV. Concentración mínima inhibitoria frente a *Mycosphaerella fijiensis* de los extractos crudo y sus fracciones clorofórmicas, etílicas y acuosas de hojas de *Musa textilis*, *Ravenala madagascariensis*, *Heliconia wagneriana*, *Heliconia rostrata*, *Strelitzia reginae*, *Musa acuminata* cv. 'Pelipita', *Alpinia speciosa* y *Alpinia purpurata* disueltos en dimetil sulfóxido.

Especies de plantas	Concentración mínima inhibitoria ($\mu\text{g}/\text{mL}$)			
	Extracto crudo	Fracciones		
		Clorofórmica	Etílica	Acuosa
<i>Musa textilis</i>	-	2 000	4 000	-
<i>Ravenala madagascariensis</i>	-	4 000	-	-
<i>Heliconia wagneriana</i>	-	2 000	-	-
<i>Heliconia rostrata</i>	-	4 000	-	-
<i>Strelitzia reginae</i>	-	2 000	-	-
<i>Musa acuminata</i> cv. 'Pelipita'	-	4 000	-	-
<i>Alpinia speciosa</i>	-	4 000	-	-
<i>Alpinia purpurata</i>	-	2 000	4 000	-

El hecho de que las fracciones clorofórmicas resultaran las más activas puede deberse a la presencia de fenilfenalenonas, compuestos con actividad antifúngica demostrada frente a *M. fijiensis* (Otálvaro *et al.*, 2007, Hidalgo *et al.*, 2009).

Varios extractos de plantas han sido evaluados frente a *M. fijiensis*. Extractos en diclorometano de *Piper pessaesatum* L., mediante difusión en agar, presentaron una MIC de 1 mg EAG.mL⁻¹ (Niño *et al.*, 2013) y de 1 000 mg.L⁻¹ (Giraldo, 2012). En aceites esenciales de *Monodora myristica* Dunal, *Eucalyptus citriodora* Hook., *Ocimum gratissimum* Forssk. y *Eucalyptus torelliana* Muell., se obtuvieron valores de MIC entre 1-5 mg.mL⁻¹ (Daouda *et al.*, 2010). Extractos etanólicos de *Zanthoxylum nannophyllum* (Urb.) Alain, *Zanthoxylum pseudodumosum* Beurton y *Amyris balsamífera* L., y acuosos de *Swinglea glutinosa* Merr. presentaron una MIC de 0,0119 mg EAG.mL⁻¹ (Álamo, 2014).

Las diferencias existentes entre estos resultados y los obtenidos en el presente estudio pueden deberse al uso de diferentes técnicas de determinación de la MIC y a las magnitudes empleadas. Teniendo en cuenta que en la microdilución el medio de cultivo es líquido, la difusión de los componentes que tendrá lugar en el mismo será mayor que la que tendrá lugar en el medio de cultivo semisólido empleado en la dilución (Hadasek y Greger, 2000).

Teniendo en cuenta estos resultados, se empleó para el resto de los ensayos de determinación de actividad antifúngica las fracciones que resultaron activas frente a *M. fijiensis* a una concentración de 4 000 µg.mL⁻¹.

La determinación del efecto fungicida o fungistático de un producto sobre un microorganismo es importante como criterio de selección para el empleo del mismo. Las infecciones recurrentes son más frecuentes al emplear productos con efecto fungistático (de Araújo *et al.*, 2013), ya que estos detienen el crecimiento del hongo pero no causan su muerte (Agrios, 2005). Todas las fracciones activas mostraron un efecto fungicida sobre *M. fijiensis*, lo cual estuvo reflejado por la ausencia de crecimiento durante el periodo de incubación en comparación con el control positivo, (acápite 3.2.1).

4.2.2. Cuantificación del crecimiento micelial

M. fijiensis presenta un crecimiento lento en medios de cultivo sintéticos y semi-sintéticos (requiere entre 15 y 20 días). Además, las colonias son compactas, elevadas y pequeñas (Manzo, 2001), por lo que la medición del diámetro de las colonias para evaluar la inhibición del crecimiento fúngico se dificulta.

Mediante lecturas de absorbancias es posible cuantificar el crecimiento de suspensiones miceliales de hongos filamentosos, pues existe una relación lineal entre la absorbancia a 595 nm de suspensiones miceliales con respecto a la masa seca (Broekearte *et al.*, 1990). (Peláez *et al.*, 2006) determinaron la sensibilidad de aislados de *M. fijiensis* frente a varios fungicidas, sin embargo los resultados fueron obtenidos a partir de los 12 días de incubación. En este sentido, (Cruz-Martín *et al.*, 2013) determinaron una relación lineal entre los valores de absorbancia y la masa seca de *M. fijiensis* durante la inhibición del crecimiento de suspensiones miceliales del hongo por extractos bacterianos. A partir de las 48 h se observaron diferencias significativas con respecto al control. Teniendo en cuenta estos resultados, las fracciones promisorias obtenidas en este estudio en la inhibición del crecimiento de *M. fijiensis* se ensayaron a las 72 h de incubación.

A pesar de que todas las fracciones promisorias, según la MIC, mostraron un efecto fungicida frente a *M. fijiensis* a los 15 días de incubación a 28 °C, a las 72 h solamente inhiben el crecimiento del hongo las fracciones Sr-CHCl₃, As-CHCl₃ y Ap-CHCl₃ (Figura 8). En la fracción As-CHCl₃ se observó una mayor inhibición del crecimiento de *M. fijiensis* que en los fungicidas empleados como controles.

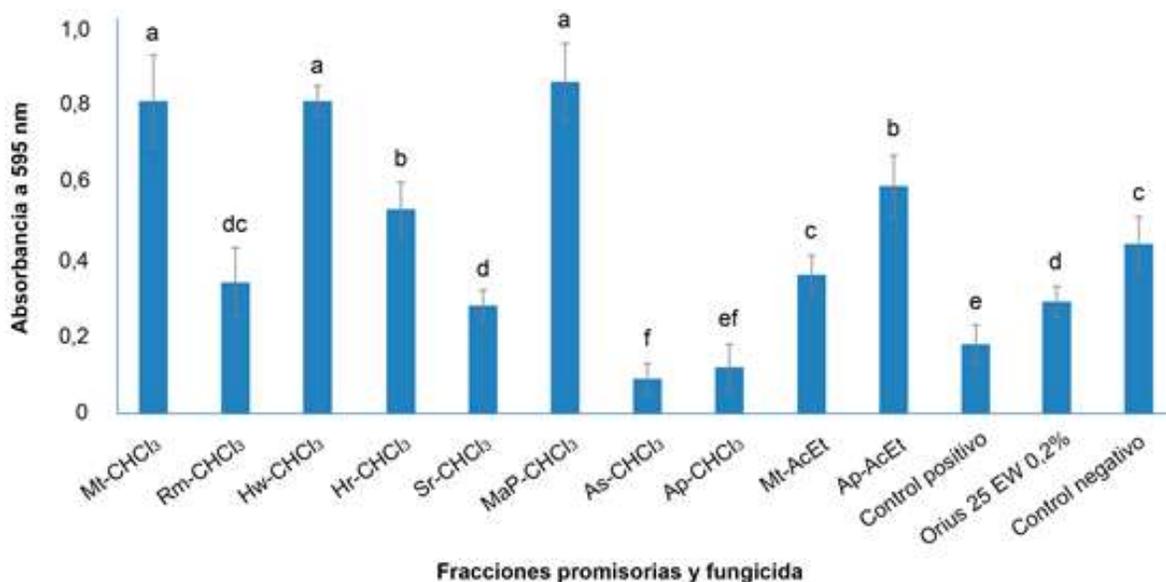


Figura 8. Inhibición del crecimiento *in vitro* de *Mycosphaerella fijiensis* por las fracciones clorofórmicas (CHCl₃) de *Musa textilis* (Mt), *Ravenala madagascariensis* (Rm), *Heliconia wagneriana* (Hw), *Heliconia rostrata* (Hr), *Strelitzia reginae* (Sr), *Musa acuminata* cv. 'Pelipita' (MaP), *Alpinia speciosa* (As) y *Alpinia purpurata* (Ap) y las fracciones etílicas (AcEt) de *M. textilis* y *A. purpurata* medido mediante la lectura de absorbancias a 595 nm, a las 72 h de incubación a 28 °C. Control negativo de actividad

antifúngica: *Mycospaherella fijiensis* en medio de cultivo Mínimo; controles positivos: *Mycospaherella fijiensis* en medio de cultivo Mínimo con DMSO 40% y con el fungicida Orius 25 EW 0,2% (Tebuconazol 25%). Cada barra representa la media de 12 réplicas independientes (n=12) ± error estándar. Letras distintas en una misma columna indican que las medias difieren estadísticamente para $p < 0,05$, (Kruskal Wallis/ U de Mann Whitney).

El hecho de que estas fracciones mostraran una actividad antifúngica temprana, puede ser un criterio de selección para su utilización como alternativa en el manejo agroecológico de la *Sigatoka* negra.

Está bien documentada la importancia de la luz en la acción de las fenilfenalenonas (Lazzaro *et al.*, 2004, Flors y Nonell, 2006, Flors *et al.*, 2006). Sin embargo, los resultados se obtuvieron a partir de experimentos llevados a cabo en la oscuridad, lo cual sugiere otro modo de acción, en caso de que la actividad observada por las fracciones Sr-CHCl₃, As-CHCl₃ y Ap-CHCl₃ frente a *M. fijiensis*, esté relacionada con la presencia de fenilfenalenonas. Otálvaro *et al.* (2007) demostró la actividad frente a *M. fijiensis* de dos fenilfenalenonas en la oscuridad, las cuales, no cambiaron significativamente su actividad bajo la influencia de la luz.

4.3. Efecto de extractos de hojas de especies del orden *Zingiberales* en la germinación de conidios de *Mycosphaerella fijiensis*

El estudio *in vitro* de la inhibición de la germinación de los conidios permite la comprobación de un antimicrobiano de carácter preventivo, que detenga la formación de nuevos microorganismos a partir de otro ya existente (Deepak *et al.*, 2007).

Todas las fracciones evaluadas mostraron valores de inhibición de la germinación de conidios superiores al 85%, por lo cual fueron consideradas como promisorias. No se observaron diferencias significativas entre los valores de las fracciones evaluadas, ni con el fungicida empleado como control (Figura 9).

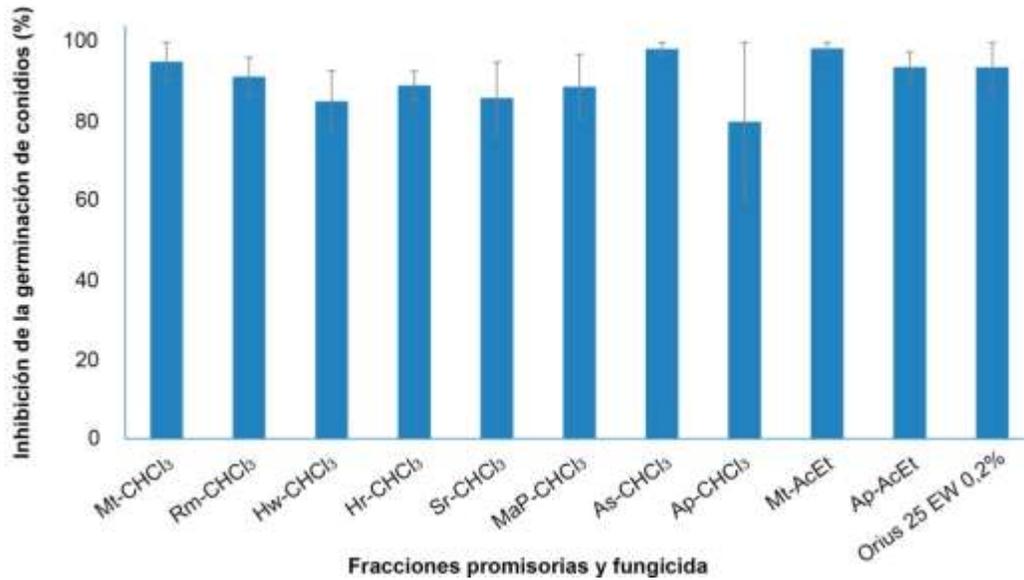


Figura 9. Porcentaje de la inhibición de la germinación de conidios de *Mycosphaerella fijiensis* por las fracciones clorofórmicas (CHCl₃) de *Musa textilis* (Mt), *Ravenala madagascariensis* (Rm), *Heliconia wagneriana* (Hw), *Heliconia rostrata* (Hr), *Strelitzia reginae* (Sr), *Musa acuminata* cv. 'Pelipita' (MaP), *Alpinia speciosa* (As) y *Alpinia purpurata* (Ap) y las fracciones etílicas (AcEt) de *M. textilis*, *S. reginae* y *A. purpurata* calculado a las 24 h de incubación a 28 °C. Control positivo: *Mycosphaerella fijiensis* en medio de cultivo Mínimo con el fungicida Orius 25 EW 0,2% (Tebuconazol 25%). Cada barra representa la media de seis réplicas independientes (n=6) ± error estándar.

De forma general, no se detectaron deformaciones apreciables en los conidios durante las evaluaciones de las fracciones realizadas. En su lugar, se apreció una inhibición total del tubo germinativo de *M. fijiensis* (Figura 10).

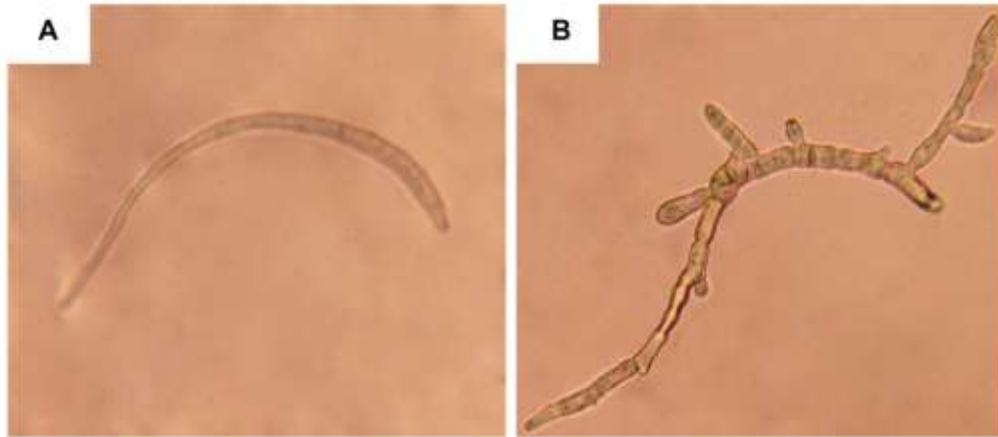


Figura 10. Conidios de *Mycosphaerella fijiensis* observados al microscopio óptico (40X) después de 24 h de incubación a 28 °C. (A) Conidio sin germinar ensayado con la fracción clorofórmica de *Musa textilis*, y (B) Conidio germinado en medio de cultivo Mínimo sin la presencia de ninguna fracción.

Múltiples ensayos se han utilizado en la evaluación de la sensibilidad de *M. fijiensis* a los fungicidas, debido fundamentalmente a la aparición de resistencia (Manzo *et al.*, 2012, Aguilar-Barragan *et al.*, 2014). Fundamentalmente, estos ensayos han estado dirigidos a evaluar la germinación de las ascosporas de *M. fijiensis*, procedimiento reconocido por la FRAC (del inglés: *Fungicide Resistance Action Committee*), lo cual se debe a la importancia de las ascosporas en la diseminación del hongo a largas distancias. Además, mediante este método se han evaluado la actividad de extractos de *Syzygium aromaticum* L. *M. charantia*, *Commelina diffusa* Zoll. ex Clarke (Viveros y Castaño, 2006) y *T. discolor* (Mosquera *et al.*, 2009) frente a *M. fijiensis*. No obstante, el método presenta algunos inconvenientes como es la posible presencia, en una sola lesión, de otras especies de *Mycosphaerella*.

Por tal motivo, ensayos encaminados a evaluar la germinación de los conidios, importantes en la diseminación de *M. fijiensis* a cortas distancias, pudieran ser efectivos en la evaluación de fungicidas, así como de extractos de plantas. Esto contribuiría a realizar una mejor rotación de los fungicidas existentes y poseer mejores criterios de selección en la búsqueda de fungicidas más específicos en su actividad y ambientalmente seguros, para el manejo de la Sigatoka negra.

5. Conclusiones

1. La extracción asistida por ultrasonido en metanol 70%, permitió la obtención de extractos crudos y fracciones clorofórmicas y etílicas de hojas de especies del orden *Zingiberales*, con presencia de fenilfenalenonas.
2. Las fracciones clorofórmicas de todas las especies y las fracciones etílicas de *Musa textilis* y *Alpinia purpurata* mostraron actividad frente a *M. fijiensis* a concentraciones iguales o inferiores a 4 000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.
3. Las fracciones clorofórmicas de *Strelitzia reginae*, *Alpinia speciosa* y *Alpinia purpurata* inhibieron el crecimiento micelial de *M. fijiensis*, en un ensayo de microplacas, a las 72 h de incubación en la oscuridad.
4. Las fracciones clorofórmicas de todas las especies y las fracciones etílicas de *Musa textilis* y *Alpinia purpurata* se consideraron promisorias al inhibir la germinación de conidios de *M. fijiensis* entre un 85%-98%.

6. Recomendaciones

1. Caracterizar, mediante técnicas de mayor resolución y especificidad las fracciones clorofórmicas y etílicas de las especies evaluadas con actividad antifúngica frente a *M. fijiensis*.
2. Determinar el efecto de la luz en la actividad antifúngica de las fracciones clorofórmicas y etílicas de las especies evaluadas frente a *M. fijiensis*.

7. Referencias bibliográficas

- Acosta-Suárez, M., Alvarado, Y., Cruz, M., Leiva, M. y Roque, B. (2004) Evaluación en casa de cultivo de la respuesta a la Sigatoka negra de los cultivares de *Musa* mediante la inoculación artificial de suspensiones conidiales de *Pseudocercospora fijiensis*. *Biotechnología Vegetal*. 4: 77-84.
- Agrios, G. (2005) *Plant Pathology*. 5ta Ed. Amsterdam: Elsevier Academic. 948 pp.
- Aguilar-Barragan, A., García-Torres, A. E., Odriozola-Casas, O., Macedo-Raygoza, G., Ogura, T., Manzo-Sánchez, G., James, A. C., Islas-Flores, I. y Beltrán-García, M. J. (2014) Chemical management in fungicide sensitivity of *Mycosphaerella fijiensis* collected from banana fields in México. *Brazilian Journal of Microbiology*. 45: 359-364.
- Ajila, C. M., Brar, S. K., Verma, M., Tyagi, R. D., Godbout, S. y Valero, J. R. (2011) Extraction and analysis of polyphenols: Recent trends. *Critical Reviews in Biotechnology*. 31: 227-249.
- Álamo, F. E. (2014) Actividad antifúngica *in vitro* de extractos de hojas de especies de la familia *Rutaceae* frente a *Mycosphaerella fijiensis* Morelet y *Alternaria solani* Sor. In: Facultad de Ciencias Agropecuarias. Departamento de Biología. Santa Clara: Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Tesis de Diploma
- Alvindhia, D. G. (2012) Inhibitory influence of biocontrol agents, plant oils and an inorganic salt on *Mycosphaerella fijiensis* and *Cordana musae*, the causal pathogen of black Sigatoka and leaf spot of banana. *African Journal of Microbiology Research*. 6: 4179-4184.
- Amil, A. F., Heaney, S. P., Stanger, C. y Shaw, M. W. (2007) Dynamics of QoI sensitivity in *Mycosphaerella fijiensis* in Costa Rica during 2000 to 2003. *Phytopathology*. 97: 1451-1457.
- Arzanlou, M., Groenewald, J. Z., Fullerton, R. A., Abeln, E. C. A., Carlier, J., Zapater, M. F., Buddenhagen, I. W., Viljoen, A. y Crous, P. W. (2008) Multiple gene genealogies and phenotypic characters differentiate several novel species of *Mycosphaerella* and related anamorphs on banana. *Persoonia*. 20: 19-37.
- Arzate-Vega, J., A.C, M.-A., Domínguez-Márquez, V. M. y Santos-Eméstica, O. A. (2006) Antagonismo de *Trichoderma* spp. sobre *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, agente causal de la Sigatoka Negra del Plátano (*Musa* sp.) *in vitro* e invernadero. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 24: 98-104.

- Augstburger, F., Berger, J., Censkowsky, U., Heid, P., Milz, J. y Streit, C. (2001) Agricultura orgánica en el trópico y subtropical: Banano. Gräffeling Asociación Naturland.
- Azuola, R. y Vargas, P. (2007) Extracción de sustancias asistida por ultrasonido (EUA). *Tecnología en Marcha*. 20: 30-40.
- Barraza, D., Jansen, K., Joode, B. v. W. d. y Wesseling, C. (2011) Pesticide use in banana and plantain production and risk perception among local actors in Talamanca, Costa Rica. *Environmental Research*. 111: 708-717.
- Bayer (2007) Protecting a tropical treasure the Banana. *Courrier*. 1: 2-7.
- Bendicho, C., De La Calle, I., Pena, F., Costas, M., Cabaleiro, N. y Lavilla, I. (2012) Ultrasound-assisted pretreatment of solid samples in the context of green analytical chemistry. *Trends in Analytical Chemistry*. 31: 50-60.
- Bennett, R. S. y Arneson, P. A. (2003) *Black Sigatoka*. *The Plant Health Instructor*. [En línea] Disponible desde: <http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/fungi/ascomycetes/Pages/BlackSigatoka.aspx>. [Consultado: 23 de abril de 2015].
- Binks, R. H., Greenham, J. R., Luis, J. G. y Gowen, S. R. (1997) A phytoalexin from roots of *Musa acuminata* var. 'Pisang sipulu'. *Phytochemistry*. 45: 47-49.
- Brent, K. J. y Hollomon, D. W. (2007) *Fungicide Resistance in Crop Pathogens: How can it be Managed?* 2da Ed. Brussels, Belgium: Fungicide Resistance Action Committee.
- Broeckaert, W., Terras, F., Cammue, B. y Vandeleyden, J. (1990) An automated quantitative assay for fungal growth inhibition. *Microbiology Letters*. 69: 55-60.
- Calier, J., Crous, P. W. y Grenewall, A. (2003) Interanting morphological and molecular data sets on *Mycosphaerella fijiensis* with specific reference to species occurring in *Musa* spp. *Mycosphaerella Leaf Spot Diseases on Bananas*. pp. 1-12: INIBAP.
- Carlier, J., Fouré, E., Gauhl, F., Jones, D. R., Lepoivre, P., Mourichon, X., Pasberg-Gauhl, C. y Romero, R. A. (2000) Black leaf streak. En: Jones, D. R. (ed.). *Diseases of Banana, Abaca and Enset*. New York, USA: CABI.
- Carlier, J., D., D. W. y J.V., E. (2002) Evaluación global de la resistencia de los bananos al marchitamiento por *Fusarium* enfermedades de las manchas foliares causadas por *Mycosphaerella* y nemátodos. En: Vézina, A. y Picq, C. (eds.). *Guías Técnicas INIBAP 6ta Ed*. Montpellier, France: The International Network for the Improvement of Banana and Plantain.

- Ceballos, I., Mosquera, S., Angulo, M., Mira, J. J., Argel, L. E., Uribe-Velez, D., Romero-Tabarez, M., Orduz-Peralta, S. y Villegas, V. (2012) Cultivable bacteria populations associated with leaves of banana and plantain Plants and their antagonistic activity against *Mycosphaerella fijiensis*. *Molecular Ecology*. 64: 641-653.
- Cruz-Martín, M., Acosta-Suárez, M., Mena, E., Roque, B., Leiva-Mora, M., Pichardo, T., Castro, R. d. P. y Alvarado-Capó, Y. (2013) Cuantificación del crecimiento *in vitro* de *Mycosphaerella fijiensis* mediante lecturas de absorbancia. *Biotechnología Vegetal*. 13: 219-224.
- Churchill, A. C. L. (2011) *Mycosphaerella fijiensis*, the black leaf streak pathogen of banana: progress towards understanding pathogen biology and detection, disease development, and the challenges of control. *Molecular Plant Pathology*. 12: 307-328.
- Daouda, K. B., C, Odjoutchoni, B., Mohamed, D., Sibirina, S., Aya, N. y Edson, B. (2010) Fungicides and biological products activities towards fungi causing diseases on banana and vegetable in Côte d'Ivoire. *African Journal of Biotechnology*. 9: 40-68.
- de Araújo, R. S. A., Guerra, F. Q. S., Lima, E. d. O., Simone, C. A. d., Tavares, J. F., Scotti, L., Scotti, M. T., Aquino, T. M. d., Moura, R. O. d., Jr., F. J. B. M. y Barbosa-Filho, J. M. (2013) Synthesis, structure-activity relationships (SAR) and *in silico* studies of coumarin derivatives with antifungal activity. *Journal of Molecular Science*. 14: 1293-1309.
- De Bellaire, L. d. L., Foure, E., Abadie, C. y Carlier, J. (2010) Black leaf streak disease is challenging the banana industry. *Fruits*. 65: 327-342.
- De Langhe, E., Vrydaghs, L., Maret, P. d., Perrier, X. y Denham, T. (2009) Why bananas matter: An introduction to the history of banana domestication. *Ethnobotany Research and Applications*. 7: 165-177.
- Deepak, S. A., Oros, G., Sathyanarayana, S. G., Shekar, H. y Sashikanth, S. (2007) Antisporulant activity of watery extracts of plants against *Sclerospora graminicola* causing downy mildew disease of pearl millet. *Journal of Agricultural and Biological Science*. 2: 36-42.
- del Río, J. y Gutiérrez, A. (2006) Chemical composition of abaca (*Musa textilis*) leaf fibers used for manufacturing of high quality paper pulps. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54: 4600-4610.

- del Río, J., Jimenez-Barbero, J., Chávez, M. I., Politi, M. y Gutiérrez, A. (2006) Phenylphenalenone type compounds from the leaf fibers of abaca (*Musa textilis*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54: 8744-8748.
- Delin, W. y Kress, W. J. (2000) *Musaceae*. *Flora of China*. 24: 297-313.
- Della Greca, M., Molinaro, A., Monaco, P. y Previtiera, L. (1993) Degraded phenalene metabolites in *Eichhornia crassipes*. *Natural Product Letters*. 1: 233-238.
- Devi, V. S. y Rao, M. G. (2014) *Alpinia speciosa*: a gold ornamental plant *World Journal of Pharmaceutical Research*. 3: 169-177.
- Dixon, R. A. (2001) Natural products and plant disease resistance. *Nature*. 411: 843-847.
- Echeverri, F., Torres, F., Quiñones, W., Escobar, G. y Archbold, R. (2012) Phenylphenalenone phytoalexins, will they be a new type of fungicide? *Phytochemistry Reviews*. 11: 1-12.
- Echeverri, F. (2013) La protección del banano contra la Sigatoka negra por metodos no biocidas. *Ciencias Naturales*. 37: 519-525.
- Elsen, A., Stoffelen, R., Tuyet, N. T., Baimey, H. y Waele, D. D. (2002) *In vitro* screening for resistance to *Radopholus similis* in *Musa* spp. *Plant Science*. 163: 407-416.
- Etebu, E. y Young-Harry, W. (2011) Control of black Sigatoka disease: Challenges and prospects. *African Journal of Agricultural Research*. 6: 508-514.
- FAOSTAT (2012) *FAO Statistics Division*. [En línea] Disponible desde: <http://faostat.fao.org>. [Consultado: 4 de enero de 2015].
- Flors, C. y Nonell, S. (2006) Light and singlet oxygen in plant defense against pathogens: phototoxic phenalenone phytoalexins. *Accounts of Chemical Research*. 39: 293-300.
- Flors, C., Ogilby, P. R., Luis, J. G., Grillo, T. A., Izquierdo, L. R., Gentili, P.-L., Bussotti, L. y Nonell, S. (2006) Phototoxic phytoalexins. Processes that compete with the photosensitized production of singlet oxygen by 9-phenylphenalenones. *Photochemistry and Photobiology*. 82: 95-103.
- Fourie, G., Steenkamp, E. T., Ploetz, R. C., Gordon, T. R. y Viljoen, A. (2011) Current status of the taxonomic position of *Fusarium oxysporum* formae specialis *cubense* within the *Fusarium oxysporum* complex. *Infection, Genetics and Evolution*. 11: 533-542.
- Fuentes, V. R. F. (2009) Frutales exóticos en Cuba VIII. *Musaceae*. *Revista CitriFrut*. 26: 53-59.

- Gauhl, F., Pasberg-Gauhl, C. y Jones, D. R. (2000) Black leaf streak: disease cycle and epidemiology. En: Jones, D. R. (ed.). *Diseases of Banana, Abacá and Enset*. pp. 56-62. New York, USA: CABI.
- Gilman, E. F. y Watson, D. G. (1994) *Ravenala madagascariensis* Travelers-Tree. *Fact Sheet*.
- Giraldo, A. (2012) Estudio fitoquímico de *Piper pesaresanum* y *Piper crassinervium*. In: *Facultad de Tecnología*. Universidad Tecnológica de Pereira.
- Glare, T., Caradus, J., Gelernter, W., Jackson, T., Keyhani, N., Köhl, J., Marrone, P., Morin, L. y Stewart, A. (2012) Have biopesticides come of age? *Trends Biotechnology*. 30: 250-258.
- González, M. T. y Mogollón, N. J. (2001) Fertilización nitrogenada sobre el crecimiento y desarrollo de la inflorescencia en plantas de *Alpina purpurata* (Vieill.) K. Schum. 'Jungle King' provenientes de cultivo *in vitro* y de sección de rizoma. *Revista Facultad de Agronomía*. 18: 124-134.
- Güerere-Pereira, P., Martínez, L. y Fuenmayor, L. (2008) Efecto del deshoje inducido sobre la productividad del plátano (*Musa* AAB) cv. 'Hartón' y la incidencia de Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet). *Revista Facultad de Agronomía (LUZ)*. 25: 636-648.
- Gutierrez-Monsalve, J. A., Mosquera, S., González-Jaramillo, L. M., Mira, J. J., Villegas- y Escobar, V. (2015) Effective control of black Sigatoka disease using a microbial fungicide based on *Bacillus subtilis* EACB0015 culture *Biological Control*. 87: 39-46.
- Guzmán, M., Murillo, G. y Villalta, R. (2000) Estabilidad de la resistencia a la Sigatoka negra en híbridos de banano (*Musa* AAAA) con un nivel intermedio de resistencia al patógeno. *Corbana Informe Anual*. pp. 31-33. San José, Costa Rica.
- Häkkinen, M. (2013) Reappraisal of sectional taxonomy in *Musa* (*Musaceae*). *Taxon*. 62: 809-8013.
- Heftmann, E. (1967) *Chromatography*. 2da Ed. New York: Van Nostrand Reinhold Company.
- Hermano Leon (1946) *Flora de Cuba*. La Habana.
- Hernández, J. L. V., Rodríguez, D., Sanabria, M. E. y Hernandez, J. (2009) Efecto de tres extractos vegetales sobre la Sigatoka negra del plátano (*Musa* AAB cv. 'Hartón'). *Revista UDO Agrícola*. 9: 182-190.

- Hernández, L. M. y Vit, P. (2009) El plátano: un cultivo tradicional con importancia nutricional. *Fuerza Farmacéutica*. 2: 11-14.
- Heslop-Harrison, J. S. y Schwarzacher, T. (2007) Domestication, genomics and the future for banana. *Annals of Botany*. 100: 1073-1084.
- Hidalgo, W., Duque, L., Saez, J., Arango, R., Gil, J., Rojano, B., Schneider, B. y Otálvaro, F. (2009) Structure-activity relationship in the interaction of substituted perinaphthenones with *Mycosphaerella fijiensis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57: 7417-7421.
- Hölscher, D. y Schneider, B. (1997) Phenylphenalenones from root cultures of *Anigozantos preissii*. *Phytochemistry*. 45: 87-91.
- Hölscher, D. y Schneider, B. (1998) Phenylphenalenones from *Ensete ventricosum*. *Phytochemistry*. 49: 2155-2157.
- Hölscher, D. y Schneider, B. (2000) Phenalenones from *Strelitzia reginae*. *Journal of Natural Products*. 63: 1027-1028.
- Hölscher, D., Dhakshinamoorthy, S., Alexandrov, T., Becker, M., Bretschneider, T., Buerkert, A., Crecelius, A. C., Waele, D. D., Elsen, A., Heckel, D. G., Heklau, H., Hertweck, C., Kai, M., Knop, K., Krafft, C., Maddula, R. K., Matthäus, C., Popp, J., Schneider, B., Schubert, U. S., Sikora, R. A. y Swennen, R. L. (2014) Phenalenone-type phytoalexins mediate resistance of banana plants (*Musa* spp.) to the burrowing nematode *Radopholus similis*. *Proceeding of National Academic Science*. 111: 105-110.
- Hoss, R. y Bochow, H. (2000) Function of host and fungal metabolites in resistance response of banana and plantain in the black Sigatoka disease pathosystem (*Musa* spp.-*Mycosphaerella fijiensis*). *Journal of Phytopathology*. 37: 276-283.
- Hynes, R. K. y Boyetchko, S. M. (2006) Research initiatives in the art and science of biopesticide formulations. *Soil Biology Biochemistry*. 38: 845-849.
- Jones, D. R. (2000) *Diseases of Banana, Abaca and Enset*. Wallingford, Oxon, UK: CABI.
- Kamo, T., Kato, N., Hirai, N., Tsuda, M., Fujioka, D. y Ohigashi, H. (1998) Phenylphenalenone-type phytoalexins from unripe Bungulan banana fruit. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*. 62: 95-101.
- Kamo, T., Hirai, N., Iwami, K., Fujioka, D. y Ohigashi, H. (2001) New phenylphenalenones from banana fruit. *Tetrahedron*. 57: 7649-7665.
- Kema, G. H. J. (2006) The pesticide reduction plan for banana. En: Soprano, E. *et al.* (eds.). *Anais XVII Reunião Internacional ACORBAT*.

- Klančnik, A., Piskernik, S., Jeršek, B. y Smole, S. (2010) Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. *Journal of Microbiological Methods*. 81: 121-126.
- Kochuthressia, K. P., Britto, S. J., Jaseentha, M. O., Raj, L. J. M. y Senthilkumar, S. R. (2010) Antimicrobial efficacy of extracts from *Alpinia purpurata* (Vieill.) K. Schum. against human pathogenic bacteria and fungi. *Agriculture and Biology Journal of North America*. 1: 1249-1252.
- Kress, W. J., Prince, L. M., Hahn, W. J. y Zimmer, E. A. (2001) Unraveling the evolutionary radiation of the families of the *Zingiberales* using morphological and molecular evidence. *Systematic Biology*. 50: 926-944.
- Kress, W. J., Prince, L. M. y Hahn, W. J. (2002) The phylogeny and a new classification of the gingers (*Zingiberaceae*): evidence from molecular data. *American Journal of Botany*. 89: 1682-1696.
- Kumaresan, K., Subramanian, M., Vaithyanatan, S., Sevagaperumal, N., Gopal, C. y Dilantha, G. (2005) Broad spectrum action of phenazine against active and dormant structures of fungal pathogens and root knot nematodes. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*. 38: 69-76.
- Lazzaro, A., Corominas, M., Martí, C., Flors, C., Izquierdo, L. R., Grillo, T. A., Luis, J. G. y Nonell, S. (2004) Light - and singlet oxygen mediated antifungal activity of phenylphenalenone phytoalexins. *Photochemistry and Photobiology Sciences*. 3: 706-710.
- Lepoivre, P., Busogoro, J. P., .Etame, J. J., Hadrami, A. E., Carlier, J., Harelimana, G., Mourichon, X., Panis, B., Riveros, A. S., Sallé, G., Strosse, H. y Swennen, R. (2003) Banana–*Mycosphaerella fijiensis* interactions. En: Jacome, L. *et al.* (eds.). *Mycosphaerella Leaf Spot Diseases of Bananas: Present Status and Outlook*. San José, Costa Rica.
- Liu, F., Zhang, Y., Sun, Q.-Y., Yang, F.-M., Gu, W., Yang, J., Niu, H.-M., Wang, Y.-H. y Long, C.-L. (2014a) Diarylheptanoids and phenylphenalenones from *Musa itinerans* fruits. *Phytochemistry*. 103: 171-177.
- Liu, F., Zhang, Y., Sun, Q.-Y., Yang, F.-M., Gu, W., Yang, J., Niu, H.-M., Wang, Y.-H. y Long, C.-L. (2014b) Diarylheptanoids and phenylphenalenones from *Musa itinerans* fruits. *Phytochemistry*. 103: 171-177.

- Luis, J. G., Echeverri, F., Quiñones, W., Brito, I., López, M., Torres, F., Cardona, G., Aguiar, Z., Pelaez, C. y Rojas, M. (1993) Irenolone and emenolone - 2 new types of phytoalexin from *Musa paradisiaca*. *Journal of Organic Chemistry*. 58: 4306-4308.
- Luis, J. G., Fletcher, W. Q., Echeverri, F. y Grillo, T. A. (1994) Phenalenone-type phytoalexins from *Musa acuminata* synthesis of 4-phenylphenalenones. *Tetrahedron*. 50: 10963-10970.
- Luis, J. G., Fletcher, W. Q., Echeverri, F., Grillo, T. A., Perales, A. y Gonzilez, J. A. (1995) Intermediates with biosynthetic implications in de novo production of phenylphenalenone-type phytoalexins by *Musa acuminata*. Revised structure of emenolone *Tetrahedron*. 51: 4117-4130.
- Luis, J. G., Quiñones, W., Echeverri, F., Grillo, T. A., Kishi, M. P., García-García, F., Torres, F. y Cardona, G. (1996) Musanolones: four 9-phenylphenalenones from rhizomes of *Musa acuminata*. *Phytochemistry*. 41: 753-757.
- Luis, J. G., Lahlou, E. H. y Andres, L. S. (1999) 4'-dehydroxy-irenolone. A new phytoanticipin from the resistant *Musa* selected hybrid SH-3481. *Natural Product Letters*. 13: 299-304.
- Manchester, S. R. y Kress, J. W. (1993) Fossil bananas (*Musaceae*): *Ensete oregonense* sp. nov. from the eocene of western North America and its phylogeographic significance. *American Journal of Botany*. 80: 1264-1272.
- Manzo, G. (2001) Diversidad genética de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet en plátano Enano Gigante (*Musa acuminata* AAA) cultivado con diferente manejo. In: *Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias*. Colima: Universidad de Colima.
- Manzo, G., Guzmán, S., Rodríguez, C. M., James, A. y Orozco, M. (2005a) Biología de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet y su interacción con *Musa* spp. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 23: 87-96.
- Manzo, G., Guzmán, S., Rodríguez, C. M., James, A. y Orozco, M. (2005b) Biología de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet y su interacción con *Musa* spp. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 23: 87-96.
- Manzo, G., Carrillo, H., Guzmán, S. y Orozco, M. (2012) Análisis de la sensibilidad *in vitro* de *Mycosphaerella fijiensis*, agente causal de la Sigatoka negra del banano a los fungicidas benomyl, propiconazol y azoxistrobin. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 30: 81-85.

- Marín, D., Sutton, T. y Barker, K. (2002) Diseminación del banano en Latinoamérica y el Caribe y su relación con la presencia de *Radopholus similis*. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología*. 66: 62-75.
- Marín, D. H., Romero, R. A., Guzmán, M. y Sutton, T. B. (2003) Black Sigatoka: an increasing threat to banana cultivation. *Plant Disease*. 87: 2008-2222.
- Marín, O. J., Mass, M. J., Barrera, J. L. y Robles, J. (2008) Evaluación de extractos vegetales para el control de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet en plátano Tierra Alta, Cordoba. *Temas Agrarios*. 13: 25-31.
- Martínez, E. y González, M. (2007) *Instructivo Técnico del Cultivo del Plátano*. 1ra Ed. La Habana.
- Martínez, I., Villalta, R., Soto, E., Murillo, G. y Guzmán, M. (2011) Manejo de la Sigatoka negra en el cultivo del banano.
- Mohapatra, D., Mishra, S. y Suta, N. (2010) Banana and its by-product utilisation: an overview. *Journal of Scientific and Industrial Research*. 69: 323-329.
- Morales, L. M., Ullauri, M. A. y Rojas, X. (2011) Evaluación del efecto de extractos vegetales como alternativa de manejo a la Sigatoka negra en el cultivar Gran Enano (AAA). *Centro Agrícola*. 38: 77-84.
- Morales, L. M. U. y M.A; Dávila, A. M., N (2010) Respuestas de cultivares de *Musa* spp. a *Mycosphaerella fijiensis* Morelet y contribución al manejo de la enfermedad mediante el empleo de extractos vegetales. *Agrociencia*. 16: 36-39.
- Mosquera, M., M., O., Echeverri, F., Marcela, L. y Niño, J. (2009) Evaluación de la actividad antifúngica de extractos vegetales sobre el hongo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. *Scientia Et Technica*. 15: 232-236.
- Mourichon, X., Carlier, J. y Fouré, E. (1997) Enfermedades de Sigatoka *Musa Disease Fact Sheet No. 8. INIBAP: France*. Fact Sheet No. 8. INIBAP: France.
- Mujica, M., Granito, M. y Soto, N. (2009) Importance of the extraction method in the quantification of total phenolic compounds in *Phaseolus vulgaris* L. *Inci*. 34: 650-654.
- Nelson, S. (2008) Black leaf streak of banana. *Plant Disease*.
- Niño, J., Ospina, J., Correa, Y. M. y Mosquera, O. M. (2007) Determinación de la actividad antifúngica de extractos vegetales sobre el hongo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. *Scientia Et Technica*. 13: 425-426.

- Niño, J. O. C., Rios, A. y Mosquera, O. M. (2013) Evaluación de la actividad antifúngica de especies de las familias *Asteraceae*, *Euphorbiaceae*, *Piperaceae* y *Rubiaceae* de zonas de reservas de la ecoregión cafetera colombiana. *Vitae*. 18: 137.
- Ocaña, B. (2008) Aislamiento y caracterización del gen que codifica para la enzima Isocitratoliasa de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. In: *Instituto de Biotecnología de las Plantas*. Santa Clara, Cuba: Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas.
- Ochoa, A. D. (2002) Antagonismo de cepas de *Trichoderma* spp. frente al hongo *Mycosphaerella fijiensis*. *Fitosanidad*. 7: 45.
- Odriozola, J. M. y García, J. A. (1972) El cultivo de la *Strelitzia*. Madrid: Publicaciones de Extencion Agraria.
- Opitz, S. y Schneider, B. (2002) Organ-specific analysis of phenylphenalenone-related compounds in *Xiphidium caeruleum*. *Phytochemistry*. 61: 819-825.
- Otálvaro, F., Echeverri, F., Quiñones, W., Torres, F. y Schneider, B. (2002a) Correlation between phenylphenalenone phytoalexins and phytopathological properties in *Musa* and the role of a dihydrophenylphenalene triol. *Molecules*. 7: 331-340.
- Otálvaro, F., Görls, H., Hölcher, D., Schmitt, B., Echeverri, F., Quiñones, W. y Schneider, B. (2002b) Dimeric phenylphenalenones from *Musa acuminata* and various *Haemodoraceae* species. Crystal structure of anigorootin. *Phytochemistry*. 60: 61-66.
- Otálvaro, F., Nanclares, J., Vásquez, L. E., Quiñones, W., Echeverri, F., Arango, R. y Schneider, B. (2007) Phenalenone-type compounds from *Musa acuminata* var. 'Yangambi km 5' (AAA) and their activity against *Mycosphaerella fijiensis*. *Journal of Natural Products*. 70: 887-890.
- Otálvaro, F., Jitsaeng, K., Munde, T., Echeverri, F., Quiñones, W. y Schneider, B. (2010) O-Methylation of phenylphenalenone phytoalexins in *Musa acuminata* and *Wachendorfia thyrsiflora*. *Phytochemistry*. 71: 206-213.
- Palencia, G. E., Santos, R. G. y Martín, J. E. (2006) Manejo sostenible del cultivo del plátano.
- Pasberg-Gauhl, C., Gauhl, F. y Jones, D. (2000) Fungal disease of foliage. Sigatoka leaf spots. Black leaf streak. Distribution and economic importance. En: Jones, D. R. (ed.). *Diseases of Banana, Abacá and Enset*. pp. 37-44. Wallingford, Oxford, UK: CABI.

- Patiño, L. F., Bustamante, E. y Salazar, L. M. (2007) Efecto de sustratos foliares sobre la Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) en banano (*Musa x paradisiaca* L.) y plátano (*Musa acuminata* Colla). *Agricultura Técnica*. 67: 437-445.
- Paxton, J. D. (1980) Phytoalexins-A working redefinition. *Journal of Phytopathology*. 101: 106-109.
- Peláez, J. E., Vásquez, L. E., Díaz, T. J., Castañeda, D. A., Rodríguez, E. y Arango, R. E. (2006) Use of a microtitre plate dilution assay to measure activity of antifungal compounds against *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. *Revista Facultad Nacional de Agronomía - Medellín*. 59: 3425-3433.
- Pérez-Vicente, L. (2012) A holistic integrated management approach to control black Sigatoka disease of banana caused by *Mycosphaerella fijiensis*. Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Pérez, L., Alvarez, J. M. y Pérez, M. (2003a) Economic impact and management of black leaf streak disease in Cuba. En: Jacome, L. et al. (eds.). *Mycosphaerella Leaf Spot Diseases of Bananas: Present Status and Outlook*. San Jose, Costa Rica.
- Pérez, L., Álvarez, J. M. y Pérez, M. (2003b) Sigatoka negra causada por *Mycosphaerella fijiensis* Morelet en Cuba: Impacto económico, resistencia de los clones y manejo de la enfermedad. *Fitosanidad*. 7: 31-41.
- Pimentel, C., Machado, R., Soares, R., Luiz, C. y Lage, S. (2009) Vasodilator activity of extracts of field *Alpinia purpurata* (Vieill) K. Schum and *A. zerumbet* (Pers.) Burt et Smith cultured *in vitro*. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 45: 507-514.
- Pino, O., Sánchez, Y. y Rojas, M. M. (2013) Plant secondary metabolites as an alternative in pest management. I: Background, research approaches and trends. *Revista Protección Vegetal*. 28: 81-94.
- Ploetz, R. (2006) Fusarium wilt of banana is caused by several pathogens referred to as *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *Journal of Phytopathology*. 96: 653-656.
- Polidoro, B. A., Dahlquist, R. M., Castillo, L. E., Morra, M. J., Somarriba, E. y Bosque-Pérez, N. A. (2008) Pesticide application practices, pest knowledge, and cost-benefits of plantain production in the Bribri-Cabécar Indigenous Territories, Costa Rica. *Environmental Research*. 108: 98-106.
- Pons, N. (1987) Notes on *Mycosphaerella fijiensis* var. *difformis*. *Transactions of the British Mycological Society*. 89: 120-124.

- Prince, L. M. y Kress, W. J. (2002) *Zingiberales* (Gingers and Bananas). In: *Encyclopedia of Life Sciences*. Macmillan Publishers Ltd, Nature Publishing Group.
- Priyadarsini, S. S., Vadivu, R. y Jayshree, N. (2010) *In vitro* and *In vivo* antidiabetic activity of the leaves of *Ravenala madagascariensis* Sonn., on alloxan induced diabetic rats *Journal of Pharmaceutical Science and Technology*. 2: 312-317.
- Quiñones, W., Escobar, G., Echeverri, F., Torres, F., Rosero, Y., Arango, V., Cardona, G. y Gallego, A. (2000) Synthesis and antifungal activity of *Musa* phytoalexins and structural analogs. *Molecules*. 5: 974-980.
- Rawal, R. D. (1996) Fungal disease of banana: Current scenario in India. En: Singh, H. P. y Chadha, K. L. (eds.). *Banana, Improvement, Production and Utilization*. Gurgaon: AIPUB NHB.
- Reyad-ul-Ferdous, M., Uddin, N., Shahjahan, D. M. S., Hossen, M., Arman, M. S. I. y Islam, A. (2014) Preliminary *in vitro* potential phytochemicals investigation of barks of *Ravenala madagascariensis*. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 3: 1418-1423.
- Rhodes, P. L. (1964) A new banana disease in Fiji. *Commonwealth Phytopathological News*. 10: 38-41.
- Rieux, A., F. Halkett, de Bellaire, I. D. I., Zapater, M. F., Rousset, F., Ravigne, V. y Carlier, J. (2011) Inferences on pathogenic fungus population structures from microsatellite data: new insights from spatial genetics approaches. *Molecular Ecology*. 20: 1661-1674.
- Robert, S., Ravigne, V., Zapater, M.-F., Abadie, C. y Carlier, J. (2012) Contrasting introduction scenarios among continents in the worldwide invasion of the banana fungalpathogen *Mycosphaerella fijiensis*. *Molecular Ecology*. 21: 1098-1114.
- Roux, N., Baurens, F.-C., Heslop-Harrison, P., Town, C., Sasaki, T., Matsumoto, T., Aert, R., Remy, S., Souza, M. y Lagoda, P. (2008) Genomics of banana and plantain (*Musa* spp.), major staple crops in the tropics. En: Moore, P. H. y Ming, R. (eds.). *Genomics of Tropical Crop Plants*.
- Sáez-Sáez, V. y Puche, M. (2003) Uso de índices climáticos para el estudio del hongo *Micosphaerella fijiensis* Morelet en cultivos de plátanos. *Terra*. 19: 11-33.
- Serrano, L., Manker, D., Brandi, F. y Cali, T. (2013) The use of *Bacillus subtilis* QST 713 and *Bacillus pumilus* QST 2808 as protectant fungicides in conventional application programs for black leaf streak control. *International Ishts-Promusa Symposium on*

- Bananas and Plantains: Towards Sustainable Global Production and Improved Use*. 986: 149-155.
- Silva-Espinoza, B. A., Ortega-Ramírez, L. A., González-Aguilar, G. A., Olivas, I. y Ayala-Zavala, J. F. (2013) Protección antifúngica y enriquecimiento antioxidante de fresa con aceite esencial de hoja de canela. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 36: 217-224.
- Singh, H. P., Uma, S., Selvarajan, R. y Karihaloo, J. L. (2011) *Micropropagation for production of quality banana planting material in Asia-Pacific*. New Delhi, India: Asia-Pacific Consortium on Agricultural Biotechnology (APCoAB).
- Stansbury, C., McKirdy, S. y Power, G. (2000) Black sigatoka *Mycosphaerella fijiensis*. Exotic threat to Western Australia.
- Stover, R. H. y Simmonds, N. W. (1987) *Bananas*. Harlow, UK: Longman Scientific and Technical.
- SuSu, H.-J., Tsao, L.-Y. T., Wu, M.-L. W. y Hung, T.-H. (2003) Biological and molecular categorization of strains of banana bunchy top virus. *Journal of Phytopathology*. 151: 290-296.
- Torres, J., Rodríguez, H. A., Rodríguez, E. y Arango, R. (2009) Aspectos bioquímicos de la resistencia del banano (*Musa acuminata*) al ataque del hongo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. *Tumbaga*. 4: 85-96.
- Trigos, Á. y Ortega-Regules, A. (2002) Selective destruction of microscopic fungi through photo-oxidation of ergosterol. *Mycologia*. 94: 563-568.
- Tropical Biology (2010) *Rainbow Heliconia*. [En línea] Disponible desde: <http://tropicalbiology2010.providence.wikispaces.net/Rainbow+Heliconia>. [Consultado: 04 de mayo 2015].
- Tushemereirwe, W. K., Kangire, A., Smith, J., Ssekiwoko, F., Nakyanzi, M., Kataama, D., Musiitwa, C. y Karyaija, R. (2003) An outbreak of bacterial wilt on banana in Uganda. *Infomusa*. 12: 6-8.
- VanEtten, H. D., J.W., M., J.A., B. y E.E., F. (1994) Two classes of plant antibiotics: phytoalexins versus phytoanticipins. *The Plant Cell*. 6: 1191-1192.
- Vargas, J. y Carvalho, J. (2010) Study of the efficacy and clinical safety of *Alpina speciosa* (Wendl.) K. Schum crude extract on arterial hypertension. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*. 4: 27-33.
- Verpoorte, R. (2000) Secondary Metabolism. En: Verpoorte, R. y Alfermann, A. W. (eds.). *Metabolic Engineering of Plant Secondary Metabolism*. pp. 1-29. Dordrecht, the Netherlands: Kluwer Academic Publishers.

- Victorio, C. P., Kuster, R. M. y Lage, C. L. S. (2008) Detection of flavonoids in *Alpinia purpurata* (Vieill.) K. Schum. leaves using highperformance liquid chromatography. *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s. 11: 147-153.
- Vidal, A. (1992) Sigatoka negra en Cuba. En nuevos focos de plagas y enfermedades. *Boletín Fitosanitario de la FAO*. pp. 1-2.
- Vinatoru, M. (2001) An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrasonics Sonochemistry*. 8: 303-313.
- Viveros, J. y Castaño, J. (2006) Evaluación *in vitro* de extractos vegetales sobre *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. *Agron*. 14: 37-50.
- Vuylsteke, D., Ortiz, R., Ferris, R. S. B. y Crouch, J. H. (1997) Plantain improvement. *Plant Breeding Reviews*. 14: 267-320.
- Wilson, C. L., Solar, J. M., Ghaouth, A. E. y Wisniewski, M. E. (1997) Rapid evaluation of plant extracts and essential oils for antifungal activity against *Botrytis cinerea*. *Plant Disease*. 81: 204-210.
- Zandjanakou-Tachinab, M., Ojiamboac, P. S., Vroh-Bid, I., Tenkouanoe, A., Gumedzoeb, Y. M. y Bandyopadhyay, R. (2013) Pathogenic variation of *Mycosphaerella* species infecting banana and plantain in Nigeria. *Plant Pathology*. 62: 298-308.