

Efectos de extractos de hojas de *Citrus latifolia* (Tanaka ex Yu. Tanaka) Tanaka y *Citrus aurantiifolia* (Christm.) Swingle sobre la membrana y la respiración celular de *Alternaria solani* Sor.

Effects of leaf extracts of *Citrus latifolia* (Tanaka ex Yu. Tanaka) Tanaka and *Citrus aurantiifolia* (Christm.) Swingle on cellular membrane and respiration of *Alternaria solani* Sor.

Katia Ojito-Ramos, Daykenis González-Hernández, Dianella Iglesias, Orelvis Portal[✉]

Departamento de Biología. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas, Cuba.

RESUMEN: El tizón temprano constituye uno de los principales problemas fitosanitarios que afectan el cultivo del tomate (*Solanum lycopersicum* L.) y la papa (*Solanum tuberosum* L.). Esta enfermedad es provocada por *Alternaria solani* Sor., cuyo control es, básicamente, mediante el uso de fungicidas sintéticos. En este sentido, las plantas constituyen una alternativa en la búsqueda de nuevas fuentes de compuestos antifúngicos menos agresivos para el ambiente. Los extractos de hojas de *Citrus latifolia* en etanol 70 % y *Citrus aurantiifolia* en metanol 70 % han mostrado actividad antifúngica frente a *A. solani*. El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de estos extractos sobre la membrana y la respiración celular de *A. solani*. Los extractos se obtuvieron mediante extracción asistida por ultrasonido y se cuantificó el contenido de fenoles totales. El efecto de los extractos sobre la membrana y la respiración celular se evaluó mediante la determinación de las concentraciones de fósforo y potasio en el medio extracelular y la actividad de la enzima succinato deshidrogenasa, respectivamente. Las elevadas concentraciones de fósforo y potasio encontradas en el medio extracelular sugieren daños en la permeabilidad de la membrana celular de *A. solani*. De igual forma, la inactividad de la enzima succinato deshidrogenasa indicó inhibición de la respiración celular por parte de los extractos de cítricos evaluados. Los resultados alcanzados confirman las propiedades antifúngicas de extractos de hojas de *C. latifolia* y *C. aurantiifolia* y sugieren su posible uso en el manejo agroecológico del agente causal del tizón temprano del tomate y de la papa.

Palabras clave: cítricos, modo de acción, tizón temprano.

ABSTRACT: Early blight is one of the main phytosanitary problems affecting the cultivation of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) and potato (*Solanum tuberosum* L.). This disease is caused by *Alternaria solani*, whose control is basically by using synthetic fungicides. In this sense, plants are an alternative in the search for new sources of less aggressive antifungal compounds to the environment. Leaf extracts of *Citrus latifolia* in ethanol 70 % and *Citrus aurantiifolia* in methanol 70 % have proven antifungal activity against *A. solani*. The aim of this study was to determine the effect of these extracts on the cellular membrane and respiration of *A. solani*. The extracts were obtained by ultrasound-assisted extraction, and the total phenolic content was measured. The effect of the extracts on the cellular membrane and respiration was evaluated by determining the concentrations of phosphorus and potassium in the extracellular medium and the activity of the

✉ Autor para correspondencia: Orelvis Portal. E-mail: orelvispv@uclv.cu

Recibido: 15/1/2016

Aceptado: 1/6/2016

succinate dehydrogenase enzyme. The high concentrations of phosphorus and potassium found in the extracellular medium suggest damages in the permeability of the cellular membrane of *A. solani*. Similarly, the inactivity of the succinate dehydrogenase enzyme pointed to an inhibition of the cellular respiration of *A. solani* by the evaluated citrus extracts. The results obtained in this study confirmed the antifungal properties of leaf extracts of *C. latifolia* and *C. aurantiifolia* and suggested its possible use in the agro-ecological management of the causal agent of the early blight disease of tomato and potato.

Key words: citrus, action mode, early blight.

INTRODUCCIÓN

Alternaria solani Sor. es un hongo necrotrófico que causa el tizón temprano del tomate (*Solanum lycopersicum* L.) y de la papa (*Solanum tuberosum* L.) (1). Esta enfermedad reduce el área fotosintética de la planta y, en casos extremos, puede conducir a la total defoliación (2). En Cuba, *A. solani* se encuentra ampliamente distribuido y causa importantes daños económicos (3). El control fitosanitario del tizón temprano se realiza, mayormente, mediante fungicidas sintéticos (4), pero su uso indiscriminado en la agricultura, además de incrementar los costos de producción en forma significativa, causan contaminación ambiental y daños a la salud humana (5).

En el marco de una agricultura sostenible y en la búsqueda de nuevas fuentes de compuestos antifúngicos menos agresivos para el ambiente, las plantas constituyen una alternativa como fuente de metabolitos secundarios con esta función (6,7). En este sentido, el género *Citrus* constituye una importante fuente de compuestos con actividad antimicrobiana, dentro de los que se destacan los compuestos fenólicos (8,9). Recientemente se informó que los extractos alcohólicos de hojas de *Citrus latifolia* y *Citrus aurantiifolia* son ricos en compuestos fenólicos (10) y presentan actividad antifúngica frente a *A. solani* (11).

Los antifúngicos comerciales difieren ampliamente en su naturaleza química, propiedades y modo de acción. Entre sus principales efectos se encuentran la inhibición de la biosíntesis de macromoléculas, como son ADN, ARN y proteínas, inhibición de la

biosíntesis del epóxido de escualeno, ergosterol y ácido fólico, así como la inhibición de la función de la membrana celular (8). La demostración de la bioactividad de un extracto es solamente el primer paso en el desarrollo de un producto comercial de origen natural y se requiere de la determinación del modo de acción del mismo (12,13). Por consiguiente, este trabajo tiene como objetivo determinar el efecto de los extractos de *C. latifolia* y *C. aurantiifolia* sobre la membrana y la respiración celular de *A. solani*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolecta de las hojas y obtención de los extractos

Las hojas de *C. latifolia* y *C. aurantiifolia* se recolectaron en áreas del Centro de Estudios Jardín Botánico de la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas, Santa Clara, Cuba (22N25'55”, 79W53'44”). Las plantas se identificaron taxonómicamente y una muestra de cada especie se depositó en el herbario de dicha institución (O. Méndez No. 9885 y 9884 (ULV), respectivamente). Los extractos de *C. latifolia* en etanol 70 % (UniChem, China) y *C. aurantiifolia* en metanol 70 % (UniChem, China) se obtuvieron por ultrasonido, según Ojito-Ramos *et al.* (10).

Crecimiento de *A. solani*

Los discos de micelio de 0,6 cm de diámetro de *A. solani* se cultivaron en medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (Difco, Alemania) durante siete días a 27°C en la oscuridad. Posteriormente, se transfirieron a medio de cultivo Caldo Papa Dextrosa (Difco,

Alemania) y se dejaron crecer en constante movimiento en una zaranda (Gerhardt, Alemania) durante 72 h, a 120 rpm y 27°C.

Determinación de la concentración de P⁺ y K⁺ en el medio extracelular

Se trituró 0,5 g de micelio de *A. solani* que creció en las condiciones mencionadas anteriormente en un homogenizador Ultra-Turrax T25 (Rose Scientific Ltd., Canadá) en tampón Tris-HCl 5 mmol.l⁻¹ (UniChem, China) (pH 7,0). Luego, el micelio triturado se ajustó a una concentración aproximada de 5 x 10⁵ propágulos.ml⁻¹ en cámara de Neubauer (Brand, Alemania). Seguidamente, se incubó durante 24 y 48 h a 27°C en la oscuridad en tampón Tris-HCl 5 mmol.l⁻¹ (pH 7,0) con el extracto a evaluar a una concentración de fenoles totales de 20 mg EAG.ml⁻¹, según la concentración inhibitoria mínima frente a *A. solani* (11), o el solvente (etanol o metanol 70 %) diluido en agua destilada estéril a la misma dilución en que se prepararon los extractos (control). La concentración de los fenoles totales se determinó por el método de Folin-Ciocalteu descrito por Silva-Espinoza *et al.* (14), mediante extrapolación en una curva de calibración con ácido gálico (Sigma-Aldrich, Alemania) como patrón. La misma se expresó en mg de equivalentes de ácido gálico.ml⁻¹ de extracto (mg EAG.ml⁻¹). Las determinaciones se hicieron por triplicado para cada uno de los extractos.

La concentración de P⁺ en el medio extracelular se determinó según Vásquez y Torres (15), con modificaciones. A 1 ml del medio extracelular se le adicionaron 2 ml de solución ácida de sulfomolibdato de amonio (Merck, Alemania) para formar el complejo fosfomolibdato. Luego, se añadió 1 ml de solución ácida de hidroquinona 1 % (Merck, Alemania). Después de 5 min, se adicionaron dos gotas de cloruro de estaño (Merck, Alemania). Pasados 5 min, se midió la absorbancia en un espectrofotómetro UV-VIS (Rayleigh 1601, China), a una longitud de onda de 340 nm. La concentración de P⁺ se determinó

por extrapolación en una curva de calibración con KH₂PO₄ (Sigma-Aldrich, Alemania) como patrón, en un rango entre 40-100 mg.l⁻¹. La concentración de K⁺ en el medio extracelular se determinó en un espectrofotómetro de absorción atómica SP9 Pye UNICAM (Philips, Reino Unido). Los resultados se expresaron en mg.l⁻¹. Las determinaciones se hicieron por triplicado y el experimento se repitió una vez.

Determinación de la actividad de la enzima succinato deshidrogenasa (EC 1.3.5.1)

Las mitocondrias de *A. solani* se aislaron por centrifugación diferencial según Hernández *et al.* (16). Se tomó 1 g de micelio de *A. solani* que creció en las condiciones descritas anteriormente y se trituró con arena lavada. Luego, se añadió una solución fría de sacarosa 0,25 mol.l⁻¹ (UniChem, China) en tampón Tris-HCl 2,5 mmol.l⁻¹ (pH 7,4) hasta completar un volumen de 20 ml y se centrifugó a 600 g durante 10 min a 0°C. El sobrenadante extraído se centrifugó nuevamente a 10 000 g durante 20 min a 0°C y se recuperó el sobrenadante para su posterior uso (fracción citoplasmática). El precipitado se resuspendió en 20 ml de solución fría de sacarosa 0,25 mol.l⁻¹ en tampón Tris-HCl 2,5 mmol.l⁻¹ (pH 7,4) y se centrifugó a 10 000 g por 20 min a 0°C. El sobrenadante se eliminó por decantación y el precipitado se resuspendió nuevamente en 20 ml de solución fría de sacarosa 0,25 mol.l⁻¹ en tampón Tris-HCl 2,5 mmol.l⁻¹ (pH 7,4) para su posterior uso (fracción mitocondrial).

Se realizaron dos tratamientos y dos controles. En un tubo de ensayo se colocaron 0,5 ml de la fracción mitocondrial, 0,5 ml de tampón Tris-HCl 2,5 mmol.l⁻¹ (pH 7,4), 1 ml de succinato de sodio 1 % (Merck, Alemania), 0,5 ml de azul de metileno 0,01 % (Merck, Alemania) y 1 ml de extracto de *C. latifolia* o *C. aurantiifolia* a una concentración de fenoles totales de 20 mg EAG.ml⁻¹. En los controles positivo y negativo de la respiración celular se adicionó sacarosa 0,25 % en lugar del extracto; además, en este último se sustituyó la fracción mitocondrial por la fracción citoplasmática.

Posteriormente, se añadió una capa de aceite mineral en cada uno de los tubos de ensayo correspondientes a los tratamientos y controles y se incubó a 37°C en baño termostático (Julabo, Alemania). Se evaluó el cambio de coloración del azul de metileno cada 4 h durante 48 h. Cada tratamiento se realizó por triplicado y el experimento se repitió una vez.

Análisis estadístico

El procesamiento estadístico de los datos se realizó con la ayuda del paquete estadístico computacional SPSS Inc. (del inglés: *Statistic Package for the Social Science*) versión 18 para Windows. En todos los casos se verificaron los supuestos de normalidad (Sapiro Wilk) y homogeneidad de varianza (Levene). Los datos obtenidos se procesaron estadísticamente mediante la prueba de Kruskal Wallis ($p < 0,05$) y Mann Whitney *a posteriori* ($p < 0,01$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este trabajo se determinó la concentración extracelular de iones P^+ y K^+ para investigar posibles cambios en la integridad de la membrana celular de *A. solani*, debido a la acción de extractos de hojas de cítricos.

A las 24 h de incubación de *A. solani* con los extractos de *C. latifolia* y *C. aurantiifolia*, la concentración de P^+ en el medio extracelular fue mayor que en sus respectivos controles (Fig. 1A). Las mismas aumentaron en 49,31 y 51,82 %, respectivamente, sin mostrar diferencias significativas entre los extractos evaluados. Del mismo modo, a las 48 h de incubación, la concentración de P^+ en el medio extracelular fue mayor que en sus respectivos controles. Las mismas aumentaron en 19,82 y 27,21 %, respectivamente, con diferencias significativas entre los extractos.

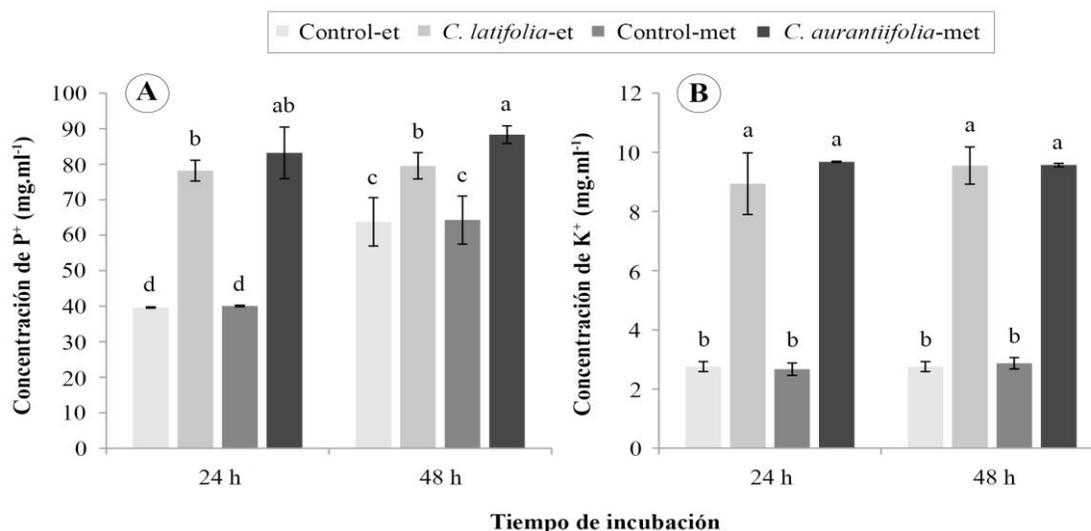


FIGURA 1. Concentración de iones P^+ (A) y K^+ (B) en el medio extracelular a las 24 h y 48 h de incubación de *Alternaria solani* con extractos de *Citrus latifolia* en etanol 70 % (-et) y *Citrus aurantiifolia* en metanol 70 % (-met), y sus respectivos controles. Cada barra representa la media de tres réplicas independientes \pm error estándar. Letras distintas en las barras indican que las medias de los diferentes tratamientos difieren estadísticamente ($p < 0,05$) (Kruskal Wallis/Mann Whitney). / Concentration of P^+ (A) and K^+ (B) ions in the extracellular medium at 24 and 48 h of incubation of *Alternaria solani* with leaf extracts of *Citrus latifolia* in 70 % ethanol (-et) and *Citrus aurantiifolia* in 70 % methanol (-met) and their respective controls. Each bar represents the mean of three independent replicates \pm standard error. Means with different letters differ statistically ($p < 0.05$) (Kruskal Wallis/Mann Whitney).

A las 24 y 48 h de incubación de *A. solani* con los extractos de *C. latifolia* y *C. aurantiifolia*, la concentración de K^+ en el medio extracelular se mostró de manera similar (Fig. 1B). Esta fue mayor en 69,13 y 72,42 % a las 24 h y en 71,10 y 70,01 % a las 48 h, en comparación con sus respectivos controles. Entre los extractos no hubo diferencias significativas.

De forma general, la salida de iones intracelulares al medio extracelular constituye una medida indirecta del efecto de ciertos metabolitos secundarios de plantas sobre la integridad de la membrana celular de los hongos (8,17). La lisis de la membrana celular provoca una alteración enzimática, lo que ocasiona la degradación de numerosos sustratos. Bajo estas condiciones, las fosfatasa separan el grupo fosfato de diferentes moléculas, lo que conlleva al aumento de concentraciones de P^+ inorgánico en el medio extracelular (18). Este mecanismo pudiera estar relacionado con los altos valores de P^+ encontrados en el medio extracelular del cultivo de *A. solani* ante la presencia de extractos de cítricos. Algunos compuestos antifúngicos obtenidos a partir de las plantas afectan la integridad de la membrana celular (8,17,18). En este sentido, los cultivos de *Botrytis cinerea* Pers., en presencia de diterpenos, produjeron un incremento significativo en la concentración de P^+ en el medio extracelular (17). Del mismo modo, los flavonoides aislados de *Terminalia catappa* L. afectaron la permeabilidad de la membrana de *Rhizoctonia solani* Kühn y *Sclerotium rolfsii* Sacc., lo cual provocó la salida de P^+ al medio extracelular (19).

Además, la presencia de compuestos antifúngicos puede afectar el equilibrio osmótico dentro de la célula debido a la pérdida de iones K^+ (20). En este trabajo se constató un aumento de estos iones en el medio extracelular. En este sentido, flavonas polimetoxiladas aisladas de *Citrus reticulata* Blanco aumentaron las concentraciones extracelulares de este ion en cultivos de *Aspergillus niger* Tiegh. No obstante, se

evidenciaron variaciones de este ion debido, probablemente, a la activación de la bomba Na^+-K^+ en los momentos iniciales de contacto entre el hongo y las flavonas polimetoxiladas (8). Por otra parte, los flavonoides como la quercetina, naringenina y umbeliferona inhiben la producción de ATP (22) y algunas flavonas sintéticas inducen la muerte de hongos mediante la inhibición de la cadena de transporte de electrones en la mitocondria (23).

El aumento de las concentraciones de P^+ y K^+ en el medio extracelular, determinado en este trabajo, puede deberse a la acción sobre *A. solani*, independiente o combinada, de diferentes compuestos fenólicos presentes en los extractos de hojas de *C. latifolia* y *C. aurantiifolia* (10).

En este trabajo, además, se investigó la posible inhibición de la respiración celular de *A. solani* debido a la acción de extractos de hojas de cítricos mediante la actividad de la enzima succinato deshidrogenasa (SDH). Al inicio (0 h), el azul de metileno se encontraba en su forma oxidada (Fig. 2A). A las 48 h no se observó un cambio de coloración en el azul de metileno en los tubos donde se encontraba la fracción mitocondrial de *A. solani* con los extractos evaluados, similar a lo observado en el control negativo de la respiración celular (Fig. 2B). Esto evidenció una posible afectación en la actividad de la enzima SDH provocada por los extractos. Sin embargo, en el control positivo de la respiración celular, que solo contenía la fracción mitocondrial sin extracto, se apreció la decoloración total del azul de metileno (Fig. 2B).

La enzima SDH está unida a la membrana interna de la mitocondria, cataliza la oxidación del ácido succínico a ácido fumárico a expensas de la reducción del FAD a $FADH_2$ y, además, forma parte del complejo II de la cadena de transporte de electrones (21). Para demostrar la reacción de oxidación-reducción se empleó el azul de metileno, el cual es capaz de aceptar protones H^+ y se transforma en su forma reducida o incolora (16). La no decoloración del azul de metileno observada en este trabajo

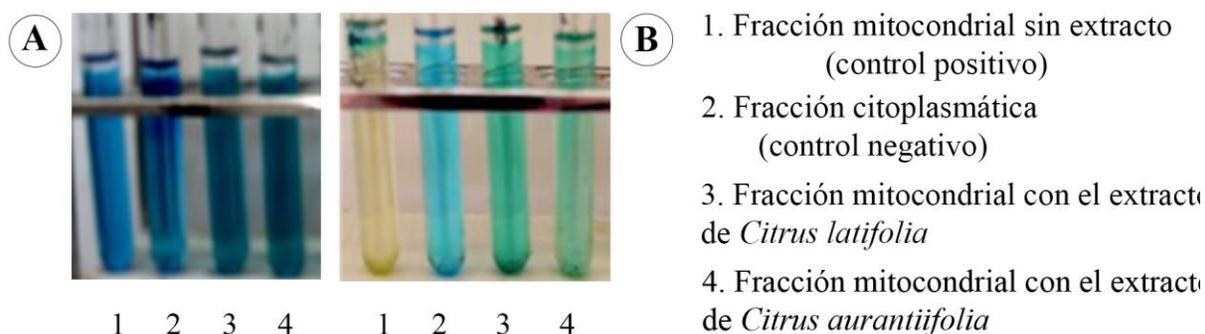


FIGURA 2. Efecto de los extractos de hojas de *Citrus latifolia* en etanol 70 % y *Citrus aurantiifolia* en metanol 70 % sobre la actividad de la enzima succinato deshidrogenasa en fracciones mitocondriales de *Alternaria solani*, en presencia de azul de metileno en su forma oxidada a 0 h (A) y luego de 48 h de incubación (B)./ *Effect of leaf extracts of Citrus latifolia in 70 % ethanol and Citrus aurantiifolia in 70 % methanol on the activity of succinate dehydrogenase enzyme in mitochondrial fractions of Alternaria solani, in the presence of methylene blue in its oxidized form at 0 h (A) and after 48 h of incubation (B).*

indica que este no se utilizó como agente reductor en la reacción catalizada por la enzima SDH. Esto pudiera deberse a la inhibición de la actividad de la enzima por parte de la acción de los metabolitos presentes en los extractos de cítricos evaluados.

Varios fungicidas sintéticos de amplio uso comercial presentan, como modo de acción, la inhibición de la actividad de la enzima SDH (22-24). Además, metabolitos secundarios como los flavonoides pueden afectar diferentes componentes de la cadena transportadora de electrones, donde el complejo II (succinato deshidrogenada) es uno de los más sensibles a la acción de los mismos (25). También se ha demostrado que las fitoalexinas, tipo flavononas, inducen la muerte de *Magnaporthe oryzae* Couch por inhibición de la cadena respiratoria mitocondrial (26).

Además, al encontrarse las mitocondrias de *A. solani* aisladas y expuestas a los extractos de cítricos, pudo haber ocurrido un desacople de la enzima SDH, lo cual debió afectar la actividad de la misma. Tal es el caso de los aceites esenciales de *Anethum graveolens* L., que afectaron la integridad de la membrana mitocondrial de *Aspergillus flavus* Link. y, como consecuencia, una disminución de la

actividad de esta enzima (27). La alteración de la membrana mitocondrial también puede afectar el potencial de membrana mitocondrial, la producción de ATP y generar estrés oxidativo, entre otros, lo que pudiera conducir a la muerte celular (18).

CONCLUSIONES

Los extractos de hojas de *C. latifolia* en etanol 70 % y *C. aurantiifolia* en metanol 70 % afectan la integridad de la membrana celular e inhiben la respiración de *A. solani*. Este efecto puede deberse a la acción, independiente o combinada, de los metabolitos presentes en estos extractos. Según el modo de acción determinado, estos extractos pueden clasificarse como antifúngicos multisitio, debido a que actúan sobre varios componentes o procesos celulares, lo cual dificulta la aparición de resistencia en los microorganismos. Los resultados demuestran el potencial de estos extractos como alternativa en el manejo agroecológico de *A. solani*.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a Ángel Mollineda Trujillo (Centro de Investigaciones Agropecuarias, Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas) por la asistencia técnica

en el uso del espectrofotómetro de absorción atómica.

REFERENCIAS

1. Modolon TA, Boff P, Boff MIC, Miquelluti DJ. Mycelium growth of early tomato blight pathogen, *Alternaria solani*, subjected to high dilution preparations. *Biol Agric Hortic.* 2014;31:28-34.
2. Sathiyabama M, Akila G, Charles RE. Chitosan-induced defence responses in tomato plants against early blight disease caused by *Alternaria solani* (Ellis and Martin) Sorauer. *Arch Phytopathol Plant Prot.* 2014;47:1777-1787.
3. Díaz M, Rodríguez L, Casas G, Castellanos L, Quintín J. Análisis espacial de la intensidad del tizón temprano en tomate en tres municipios de Cienfuegos en la campaña 2012-2013. *Centro Agrícola.* 2014;41:47-51.
4. Ammar MI, Nenaah GE, Mohamed AHH. Antifungal activity of prenylated flavonoids isolated from *Tephrosia apollinea* L. against four phytopathogenic fungi. *Crop Prot.* 2013;49:21-25.
5. Chen J, Zhang S, Yang X. Control of brown rot on nectarines by tea polyphenol combined with tea saponin. *Crop Prot.* 2013;45:29-35.
6. Masih H, Peter JK, Tripathi P. A comparative evaluation of antifungal activity of medicinal plant extracts and chemical fungicides against four plant pathogens. *Int J Curr Microbiol App Sci.* 2014;3:97-109.
7. Pino O, Sánchez Y, Rojas MM. Plant secondary metabolites as an alternative in pest management. I: Background, research approaches and trends. *Rev Protección Veg.* 2013;28:81-94.
8. Wu T, Cheng D, He M, Pan S, Yao X, Xu X. Antifungal action and inhibitory mechanism of polymethoxylated flavones from *Citrus reticulata* Blanco peel against *Aspergillus niger*. *Food Control.* 2014;35:354-359.
9. Duarte Y, Pino O, Infante D, Sánchez Y, Travieso M, Martínez B. Efecto *in vitro* de aceites esenciales sobre *Alternaria solani* Sorauer. *Rev Protección Veg.* 2013;28:54-59.
10. Ojito-Ramos K, Herrera Y, Vega N, Portal O. Actividad antioxidante *in vitro* y toxicidad de extractos hidroalcohólicos de hojas de *Citrus* spp. (Rutaceae). *Rev Cub Plant Med.* 2012;17:368-379.
11. Ojito-Ramos K, Iglesias D, Cupull R. Actividad antifúngica *in vitro* de extractos de hojas de *Citrus* spp. frente a *Alternaria solani* Sor., patógeno de *Solanum tuberosum* L. I Simposio Internacional de Raíces, Rizomas, Tubérculos, Plátanos, Bananos y Papaya; 7 al 10 noviembre; Santa Clara; 2011. p. 56-57.
12. Pino O, Sánchez Y, Rojas MM. Plant secondary metabolites as alternatives in pest management. II: An overview of their potential in Cuba. *Rev Protección Veg.* 2013;28:95-108.
13. Regnault-Roger C. Trends for commercialisation of biocontrol agent (biopesticide) products. En: J Mérillon, K Ramawat, editors. *Plant defence: biological control, progress in biological control.* Netherlands: Springer Netherlands; 2012. p. 139-160.
14. Silva-Espinoza BA, Ortega-Ramírez LA, González-Aguilar GA, Olivas I, Ayala-Zavala JF. Protección antifúngica y enriquecimiento antioxidante de fresa con aceite esencial de hoja de canela. *Rev Fitotec Mex.* 2013;36:217-224.
15. Vásquez E, Torres S. *Manual de Fisiología Vegetal.* Primera ed. Santa Clara, Cuba: Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Ministerio de Educación Superior; 1982. 86 pp.
16. Hernández MR, Huelva A, Ramos EA. *Manual de Bioquímica.* Primera ed. La Habana, Cuba: Instituto Superior de Ciencias Agropecuarias de La Habana. Ministerio de Educación Superior; 1988. p. 154.

17. Cotoras M, Folch C, Mendoza L. Characterization of the antifungal activity on *Botrytis cinerea* of the natural diterpenoids kaurenoic acid and 3 β -hydroxy-kaurenoic acid. *J Agric Food Chem.* 2004;52:2821-2826.
18. Nelson DL, Lehninger AL, Cox MM. *Lehninger Principles of Biochemistry.* Sexta ed. New York, EE. UU.: WH Freeman; 2012. 1119 pp.
19. Espinosa R. Efecto alelopático de *Terminalia catappa* L. sobre los hongos fitopatógenos del suelo *Rhizoctonia solani* Kühn y *Sclerotium rolfsii* Sacc. Departamento de Agronomía. Santa Clara: Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas; 2012. 123 pp.
20. Bot CT, Prodan C. Quantifying the membrane potential during *E. coli* growth stages. *Biophys Chem.* 2010;146:133-137.
21. Xekouki P, Stratakis CA. Succinate dehydrogenase (SDHx) mutations in pituitary tumors: could this be a new role for mitochondrial complex II and/or Krebs cycle defects? *Endocr Relat Cancer.* 2012;9:C33-C40.
22. Angelini RMD, Masiello M, Rotolo C, Pollastro S, Faretra F. Molecular characterisation and detection of resistance to succinate dehydrogenase inhibitor fungicides in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*). *Pest Manag Sci.* 2014;70:1884-1893.
23. Miles TD, Miles LA, Fairchild KL, Wharton PS. Screening and characterization of resistance to succinate dehydrogenase inhibitors in *Alternaria solani*. *Plant Pathol.* 2014;63:155-164.
24. Scalliet G, Bowler J, Luksch T, Kirchhofer-Allan L, Steinhauer D, Ward K, et al. Mutagenesis and functional studies with succinate dehydrogenase inhibitors in the wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola*. *PLoS ONE.* 2012;7:e35429.
25. Trassi G, Seiko-Yamamoto N, Bracht A. Efeitos do extrato de folhas e caule de *Arrabidaea chica* sobre o metabolismo hepático. *East Asian Insurance Congress.* 2007;25:345-347.
26. Hasegawa M, Mitsuhashi I, Seo S, Okada K, Yamane H, Iwai T, et al. Analysis on blast fungus-responsive characters of a flavonoid phytoalexin sakuranetin; accumulation in infected rice leaves, antifungal activity and detoxification by fungus. *Molecules.* 2014;19:11404-11418.
27. Tian J, Ban X, Zeng H, He J, Chen Y, Wang Y. The mechanism of antifungal action of essential oil from dill (*Anethum graveolens* L.) on *Aspergillus flavus*. *PLoS ONE.* 2012;7:e30147.