

Compuesto antifúngico en pared celular de crisantemo (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev.)

LUIS MIGUEL VÁZQUEZ GARCÍA,* EDMUNDO LOZOYA GLORIA** Y MERCEDES LÓPEZ PÉREZ**

Antifungal Compound in *Chrysanthemum's* Wall Cellular (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev.)

Abstract. It deals with three experiments: in the first one, 36 plants were inoculated for aspersion (of 40 days, after the transplant) of the varieties *Super White* (susceptible) and *White Marble* (resistant) with 10^6 teliospores of *Puccinia horiana*/ml of water; in the second one, the same varieties were cultivated in vitro and plants at three months had dealings with celulasa (0.26 mg/ml); and in the third one were injected with celulasa (to the same concentration) 8 leave of the half stratum of 50 plants (in conditions of greenhouse) of the varieties *Super White* (susceptible), *White Marble* (resistant) and *Fred Shoemith* (immune), covering all the sheet foliate.

The extractions gotten in the three cases were utilized in order to carry out the gases chromatography and masses spectrometry studies and the corresponding bioassays with the indicative fungus *Alternaria solani*. This revealed that identified compound was diphenil-metano diisocianato, it was considered like a factor of resistance in *chrysanthemum*.

Introducción

En la interacción planta-parásito, el hospedante puede responder de varias formas, entre ellas se encuentran las fitoanticipinas y la producción de fitoalexinas (Van Etten *et al.*, 1994). En la relación crisantemo (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev.) y roya blanca (*Puccinia horiana* Henn.), se desconoce el tipo de respuesta que la planta tiene hacia el hongo; sin embargo, dentro de la familia Asteraceae (= Compositae) se han identificado una gran cantidad de metabolitos de tipo poliacetilénico e isoprenoide (Christensen y Lam, 1991; Christensen, 1992 y Maciver, *op. cit.*). A los compuestos poliacetilénicos se les han encontrado propiedades de: a) fitoalexinas (Thomas y Allen, 1970; Allen y Thomas, 1971; De Wit y Kodde, 1981;

Mercier *et al.*, 1993; Heywood *et al.*, 1977 y Stoessl, 1982); b) compuestos alelopáticos (Stevens, 1986 y Menelaou *et al.*, 1992); c) estimulantes de la germinación de hongos (Binder *et al.*, 1977); d) nematocidas (Kogiso *et al.*, 1976); e) citotóxicos (Fujimoto *et al.*, 1994) y f) anti-inflamatorios (Redl *et al.*, 1994).

El otro tipo de compuestos, los isoprenoides, se han identificado en *Pyrethrum*, *Tanacetum* y *Parthenium*, géneros muy relacionados con el crisantemo. Entre dichos compuestos se encuentran el farneseno, sesquiterpenos y esteroides (Bohlmann y Zdero, 1982; Maatooq y Hoffmann, 1996; Maciver, *op. cit.* y Wilkomirski y Dubielcka, 1996). Gershenzon y Croteau (1993) encontraron que a partir del crisantemil pirofosfato se derivan monoterpenos con actividad insecticida; Maatooq y Hoffmann (*op. cit.*) detectaron que las plantas de *Parthenium* (Asteraceae) tenían presentes sesquiterpenos fungitóxicos.

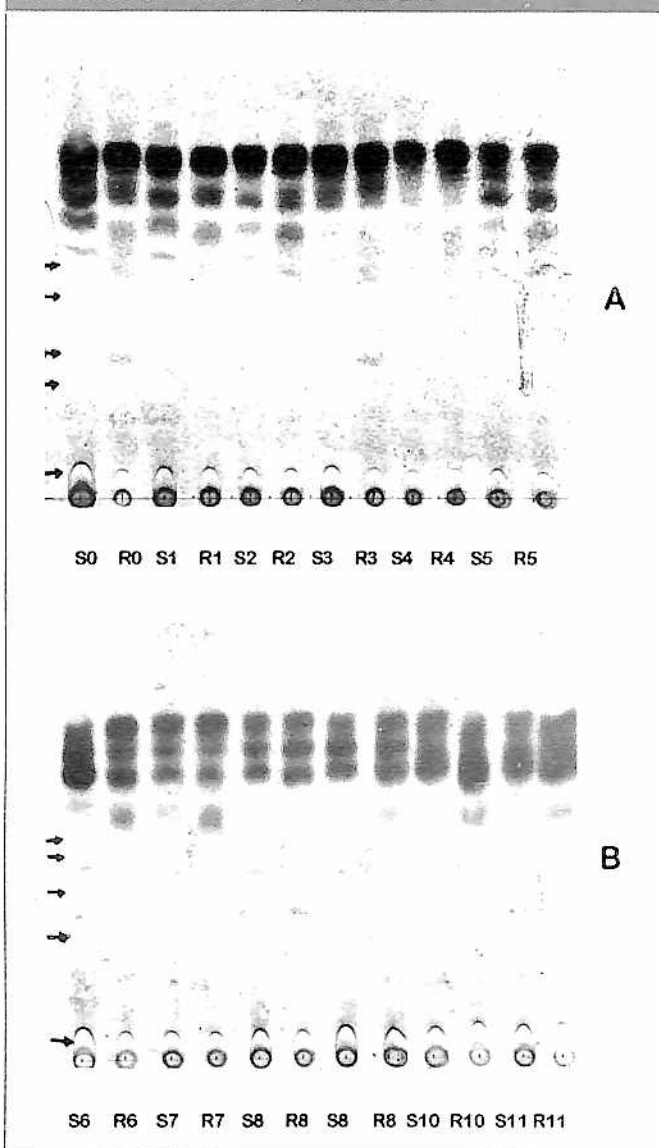
Debido a que el crisantemo pertenece a la familia Asteraceae y que en este grupo de plantas se han encontrado compuestos isoprenoides y poliacetilénicos con propiedades fungitóxicas, no se descarta la posibilidad de que pueda existir un grupo de compuestos diferentes pertenecientes a alguna otra ruta metabólica. Con la investigación, que consistió en tres experimentos, se propuso identificar fitoalexinas y fitoanticipinas de crisantemo susceptible, resistente e inmune al ser infectado con *P. horiana* o al estar en presencia de celulasa.

* Facultad de Ciencias Agrícolas, UAEM. Teléfono: (729) 6 55 31 y 6 55 29. Correo electrónico: lmg@coatepec.uaemex.mx

** CINVESTAV-Unidad Irapuato. Correo electrónico: elozoya@irapuato.ira.cinvestav.mx



FIGURA 1. PRODUCCIÓN DE ANTIMICROBIANOS EN PLANTAS DE CRISANTEMO ESTABLECIDAS EN INVERNADERO Y EN PRESENCIA DE *P. HORIANA*, DE 0 A 11 DÍAS (A DE 0 A 5 Y B DE 6 A 11 DÍAS). LAS FLECHAS INDICAN EL NIVEL EN QUE SE LOCALIZAN LAS ZONAS DE INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO DEL HONGO INDICADOR (*ALTERNARIA SOLANI*). BE = BIENSAYO DEL EAC SOBRE LA PLACA DE CCF, S = SUSCEPTIBLE, R = RESISTENTE.



I. Metodología

a) Producción de antimicrobianos en plantas de crisantemo inoculadas con *P. horiana*

Un mes después de establecidas 36 plantas de cada una de las variedades Super White (susceptible) y White Marble (resistente) en macetas de 15 cm de diámetro y en condiciones de invernadero (28°C y 70% de humedad relativa), se inocularon con una suspensión de 10^6 teliosporas de *P. horiana*/ml de agua y se mantuvieron durante 24 h bajo condiciones de alta humedad relativa (100%) y temperatura de 17 a 20°C para favorecer la penetración e infección por el patógeno. Ya en condiciones normales, se pesaron y maceraron diariamente 10 g de tejido vegetal por variedad desde los 0 hasta los 11 días después de la inoculación (tratamientos) haciéndose las extracciones correspondientes para la detección de antimicrobianos (véase el inciso d).

b) Producción de antimicrobianos en plantas de crisantemo *in vitro* inducidas con celulosa

Se utilizaron 25 plántulas de tres meses de establecidas *in vitro*, de 10 a 15 cm de longitud de las variedades Super White (susceptible) y White Marble (resistente), respectivamente. Se probaron cinco tratamientos que consistieron en realizar extracciones a 0, 12, 24, 36 y 48 h después de la inducción por celulosa. Cada tratamiento estuvo formado por cinco plántulas que se colocaron en un tubo de Falcon con 40 ml de una solución de celulosa (0.26 mg/ml de agua). De cada tratamiento se analizó el tejido vegetal y la fase líquida para la detección de antimicrobianos según la siguiente metodología: se adicionaron 20 ml de acetato de etilo a 2 g de tejido vegetal previamente macerado con mortero y después se filtró a través de papel ahlstrom-601. El filtrado se dejó evaporar hasta sequedad y el residuo se resuspendió en 100 ul de éter etílico. Se tomaron dos muestras de 20 ul de esta suspensión para la Cromatografía de Capa Fina (CCF), F 254, en la que se empleó como eluyentes ciclohexano:acetato de etilo (50:50) y placas de 0.25 mm de grosor de G 60.

En relación con la fase líquida, los 40 ml de la solución de celulosa se diluyeron en un volumen igual de éter etílico, se agitó durante 30 s y se dejó en reposo hasta el momento de separación de la fase orgánica. Ésta se retiró con pipeta y se dejó evaporar hasta sequedad; el residuo se resuspendió en 100 ul de éter etílico. Como en el caso anterior, también se tomaron dos muestras de 20 ul de esta suspensión para la CCF y se emplearon los mismos compuestos como eluyentes.

Las placas de CCF del tejido vegetal y la fase líquida, se sometieron a bioensayos con propágulos de *Alternaria solani* para aislar e identificar posteriormente aquellos compuestos que resultaron ser inhibitorios del crecimiento del hongo (véase el inciso f).

c) Producción de antimicrobianos en plantas de crisantemo en invernadero, inducidas con celulosa

Se utilizaron 100 plantas de crisantemo de 40 días de edad de cada una de las siguientes variedades: Super White (susceptible), White Marble (resistente) y Fred Schoesmith (inmune). Cincuenta de ellas se inyectaron con una solución de celulosa (0.26 mg/ml de agua), 25 con agua solamente y las plantas restantes sin ninguna aplicación (testigos). Para esta operación se utilizaron ocho hojas del estrato medio a las que se les cubrió todo el interior de la lámina foliar en cada aplicación. Todas las plantas se colocaron en condiciones de invernadero (28°C y 70% de humedad relativa) y 48 h después se pesaron y maceraron las hojas por variedad para la extracción de antimicrobianos (véanse los incisos d y e).

d) Extracción de antimicrobianos de crisantemo (EAC)

Para la extracción de antimicrobianos las plantas utilizadas en los experimentos descritos en los incisos a y c, a cada gramo de tejido macerado se le adicionaron 3 ml de acetato de etilo, 2 ml de etanol y 5 ml de acetona. Posteriormente, el extracto se filtró para limpiarlo de residuos (paredes celulares) y se dejó evaporar a sequedad. El residuo resultante se resuspendió en 100 ul de éter etílico (por gramo de tejido), tomándose dos muestras de 20 ul para la realización de la CCF y empleándose como eluyentes al ciclohexano:acetato de etilo:etanol (49:49:2).

e) Hidrólisis alcalina (HA)

Las paredes celulares residuales del proceso anterior (5 g), correspondientes a las variedades susceptible, resistente e inmune, se colocaron en matraces de un litro (tres por cada tratamiento: con celulasa, agua y sin aplicación). En cada matraz se adicionaron 200 ml de NaOH 1 N dejándose en ebullición durante 2 h. Después de enfriarse se ajustó el pH a 3 con HCl 1 N y se filtró lavando los residuos del papel filtro con metanol y acetato de etilo en volúmenes equivalentes al obtenido en el filtrado. Éste se dejó evaporar a sequedad y se resuspendió en 1.5 ml de etanol, tomándose dos muestras de 20 ul para la realización de la CCF y con los mismos eluyentes del inciso anterior.

f) Bioensayos

Las placas de CCF obtenidas de los procesos anteriores se asperjaron con 10⁶ propágulos de *Alternaria solani*/ml de papa dextrosa, colocándose en cámara húmeda durante 72 h para identificar después los halos de inhibición del crecimiento del hongo.

g) Separación de compuestos antimicrobianos

A partir de los resultados de los bioensayos, se hicieron placas semipreparativas de 0.5 mm de grosor de G 60 y se separaron los compuestos de los extractos EAC y HA (incisos d y e), usándose 300 ul de cada uno por placa y como eluyentes tolueno:ciclohexano:acetona (80:10:10). Paralelamente se realizó una CCF en placas de 0.25 mm de G 60, con 20 ul por muestra de los extractos anteriores, con la finalidad de llevar a cabo un bioensayo y después por comparación raspar las zonas con productos antimicrobianos en las placas semipreparativas. La separación de los compuestos fungitóxicos en la sílica gel de las porciones raspadas se realizó mediante el uso de etanol: ácido acético (10:1). Se adicionaron 90 ml de estos solventes por cada gramo de sílica filtrándose después. El filtrado con los antimicrobianos se evaporó a sequedad y se resuspendió en un volumen mínimo de etanol.

h) Identificación de compuestos antimicrobianos

La identificación se realizó a partir de la HA de los tratamientos con celulasa, en agua y sin aplicación (control) de las tres variedades. En la fracción 2 del tratamiento con celulasa de la variedad White Marble (resistente), se pudieron identificar cinco compuestos con características fisicoquímicas muy similares en cuanto a color, solubilidad y absorción de UV (véase más abajo). La identificación química de éstos se hizo por cromatografía de gases, acoplada a un espectrómetro de masas (5890 serie II, Gas Chromathograph, BK).

III. Resultados y discusión

a) Producción de antimicrobianos en plantas de crisantemo inoculadas con *P. horiana*

Los extractos obtenidos de los 0 a los 11 días posteriores a la inoculación en las variedades susceptible y resistente, sometidos a CCF y bioensayo, presentaron ligeras zonas de inhibición ambas variedades (figura 1). Las plantas en este ensayo fueron inoculadas con el patógeno *P. horiana*, y se esperaba que generaran antimicrobianos del tipo fitoalexinas; no obstante, los

FIGURA 2. PRODUCCIÓN DE ANTIMICROBIANOS EN PLANTAS DE CRISANTEMO IN VITRO EN PRESENCIA DE CELULASA DE 0 A 48 HORAS. BC = BIOENSAYO SOBRE LA CCF, S = SUSCEPTIBLE, R = RESISTENTE, C = SUSPENSIÓN DE CELULASA DONDE ESTUVO PRESENTE LA PLANTA TRATADA. LAS FLECHAS INDICAN EL NIVEL EN QUE SE LOCALIZAN LAS ZONAS DE INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO DEL HONGO INDICADOR (*ALTERNARIA SOLANI*).

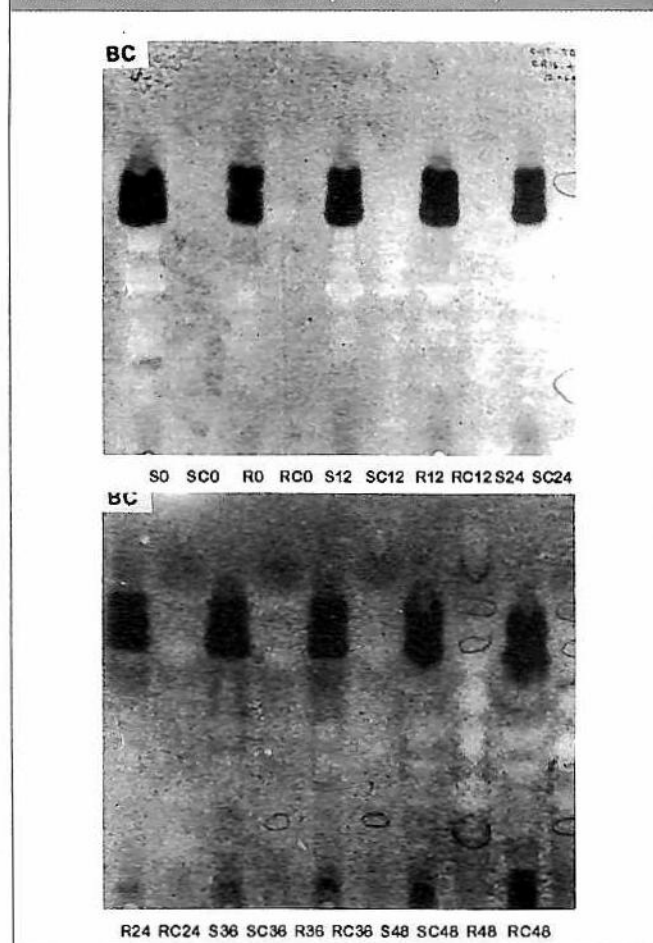


FIGURA 3. PRODUCCIÓN DE ANTIMICROBIANOS EN PLANTAS DE CRISANTEMO EN INVERNADERO INYECTADAS CON CELULOSA PARA SU EXTRACCIÓN A LAS 48 H. BE = BIOENSAYO DEL EXTRACTO CRUDO SOBRE UNA PLACA DE CCF, S = SUSCEPTIBLE, R = RESISTENTE, I = INMUNE. LAS FLECHAS INDICAN LOS NIVELES EN QUE FUERON LOCALIZADAS LAS ZONAS DE INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO DEL HONGO INDICADOR (*ALTERNARIA SOLANI*).

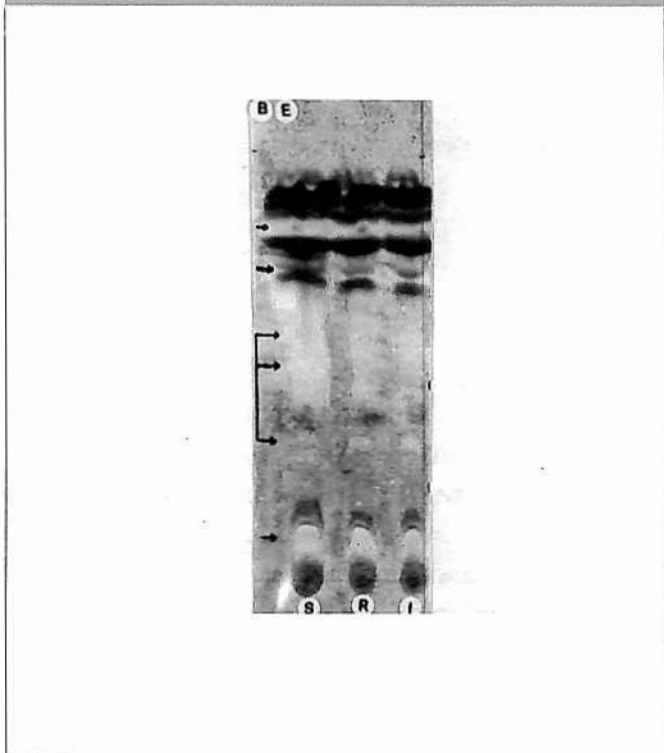
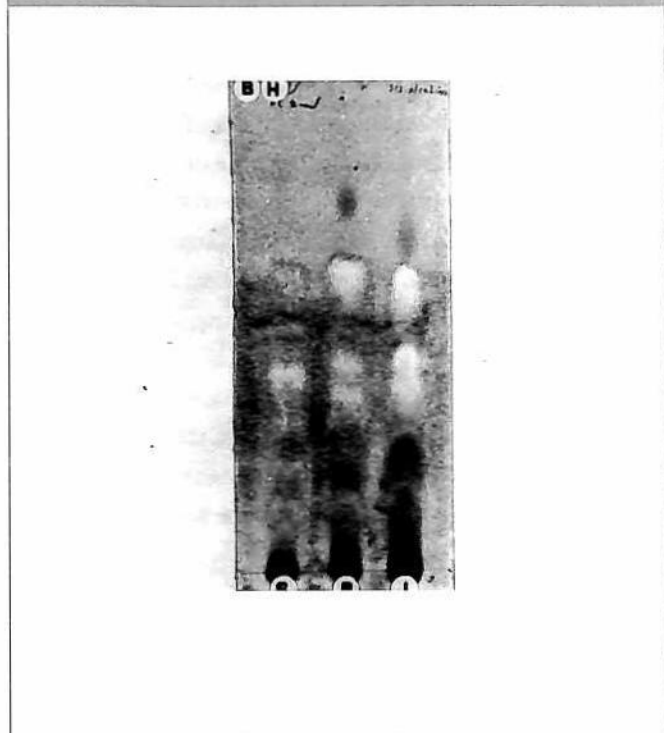
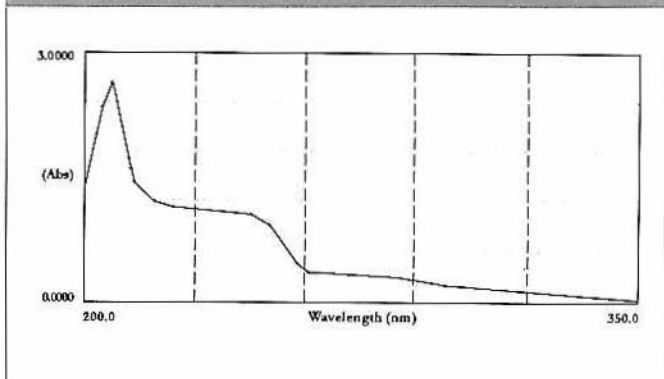


FIGURA 4. PRODUCCIÓN DE ANTIMICROBIANOS EN PLANTAS DE CRISANTEMO EN INVERNADERO INYECTADAS CON CELULOSA Y CON AGUA, PARA SU EXTRACCIÓN A LAS 48 H. BH = BIOENSAYOS DE LA HIDROLISIS ALCALINA SOBRE UNA PLACA DE CCF, S = SUSCEPTIBLE, R = RESISTENTE, I = INMUNE. LAS FLECHAS INDICAN LOS NIVELES EN QUE FUERON LOCALIZADAS LAS ZONAS DE INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO DEL HONGO INDICADOR (*ALTERNARIA SOLANI*).



compuestos detectados ya estaban presentes al momento de poner en contacto la planta con el patógeno, por lo que se consideraron fitoanticipinas como lo señalan Van Etten *et al.* (1994). Una posible explicación fue el hecho de que las teliosporas del inóculo (10^6 teliosporas/ml) tuvieron que pasar a basidiosporas para ser infectivas y penetrar la hoja (Firman y Martin, 1968), a pesar de mantener una alta humedad relativa favorable para la penetración. Norman *et al.* (1996) observaron una baja eficiencia en la infección, medida a través del nivel de daño de 0 a 42 días posteriores a la inoculación; después de este periodo se incrementó en gran medida el nivel de daño. Esto explica la insignificante inducción de antimicrobianos en las plantas por el patógeno de 0 a 11 días posteriores a la inoculación.

FIGURA 5. ESPECTRO DE ABSORCIÓN DE UNO DE LOS CINCO COMPUESTOS ANTIMICROBIANOS EXTRAÍDOS DE LA PARED CELULAR (FRACCIÓN 2) DE CRISANTEMO VARIEDAD WHITE MARBLE (RESISTENTE).



b) Producción de antimicrobianos en plantas de crisantemo *in vitro* inducidas con celulosa

La variedad susceptible presentó fitoanticipinas al momento de ponerse en contacto el tejido vegetal con la celulosa, contrario a lo observado en la variedad resistente. Conforme pasó el tiempo, las fitoanticipinas decrecieron y a las 48 h aparecieron compuestos tanto en la variedad susceptible como en la resistente, aun cuando fue un poco mayor el halo de inhibición en las plantas resistentes y excretaron dichos compuestos al medio donde se encontraba la solución de celulosa (figura 2). Probablemente estos compuestos fueron inducidos por celulosa—considerándose por ello como fitoalexinas—, o bien, ya existían en los tejidos del crisantemo en forma inactiva y la celulosa favoreció algún mecanismo para que se tornaran en forma activa los fungitóxicos, por lo que en este caso se consideran fitoanticipinas.

c) Producción de antimicrobianos en plantas de crisantemo en invernadero inducidas por celulosa

Los extractos base de las variedades susceptible, resistente e inmune, obtenidos a las 48 h posteriores a la inducción con celulosa, presentaron compuestos del tipo fitoanticipinas, pero no fitoalexinas (figura 3). Sin embargo, al tratar los residuos del tejido (paredes celulares) por HA, se desprendieron de las paredes celulares compuestos antimicrobianos de las variedades resistente e inmune y muy poco de las plantas susceptibles (figura 4).

FIGURA 6. ESPECTROGRAMA OBTENIDO DEL CROMATOGRÁFO DE GASES DE LA MUESTRA EXTRAÍDA DE LA PARED CELULAR (FRACCIÓN 2) DE PLANTAS DE CRISANTEMO VARIEDAD WHITE MARBLE (RESISTENTE). EL PICO OBTENIDO A LOS 17.70 MIN CORRESPONDE AL COMPUESTO ANTIMICROBIANO DIFENILMETANO-DIISOCIANATO.

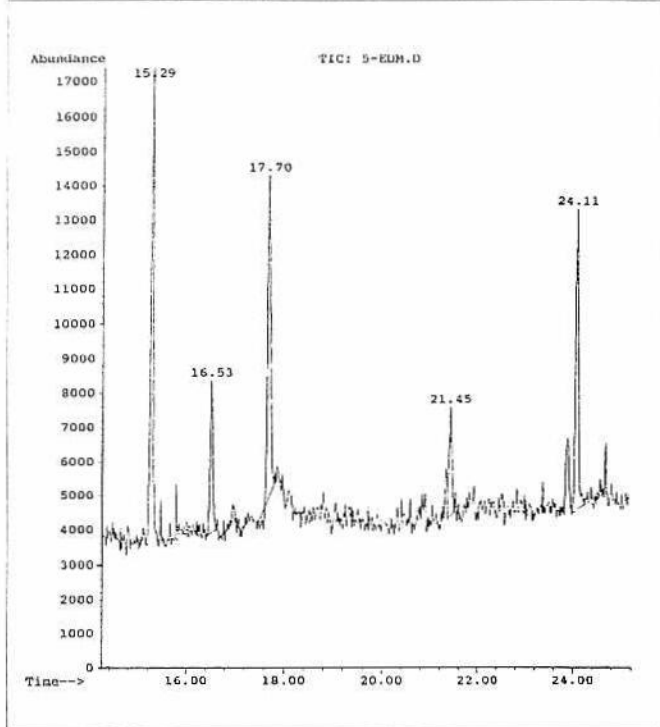


FIGURA 7. ESPECTROGRAMA DE MASAS DEL DIFENILMETANO-DIISOCIANATO OBTENIDO DE LA FRACCIÓN 2 DE LA PARED CELULAR DE PLANTAS DE CRISANTEMO VARIEDAD WHITE MARBLE (RESISTENTE), CORRESPONDIENTE AL PICO 17.70 MIN DEL CROMATOGRÁFO DE GASES.

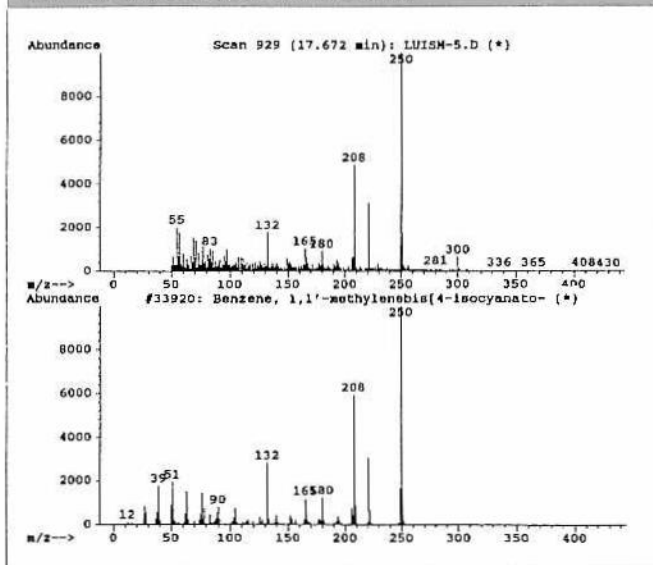
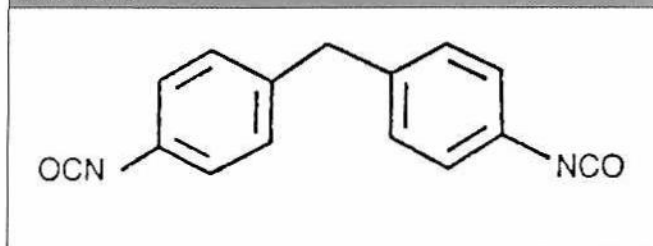


FIGURA 8. ESTRUCTURA QUÍMICA DEL DIFENILMETANO-DIISOCIANATO, COMPUESTO CON PROPIEDADES ANTIFÚNGICAS OBTENIDO DE PAREDES CELULARES DE PLANTAS DE CRISANTEMO VARIEDAD WHITE MARBLE (RESISTENTE).



Las diferencias observadas en los compuestos antimicrobianos de las plantas de crisantemo tratadas por HA, son suficientes para considerar a estos compuestos como factores de resistencia y diferenciar las variedades en susceptible, resistente e inmune, sin que ello se oponga a la existencia de otros mecanismos de resistencia. Existen varios trabajos donde la resistencia del clavel a varios patógenos está dada por compuestos localizados en la pared celular, los cuales se incrementan notablemente en las variedades resistentes cuando entran en contacto con el patógeno (Niemann y Baayen, 1988; Niemann *et al.*, 1990 y Niemann *et al.*, 1991). Se puede pensar que algo similar ocurre con el crisantemo al entrar en contacto con un factor que someta las plantas a tensión.


d) Identificación de compuestos antimicrobianos

Cada una de las fracciones de inhibición encontradas en los bioensayos correspondientes a la separación de compuestos antimicrobianos, se volvieron a procesar de acuerdo con los pasos descritos en el inciso g de la metodología para su purificación. De cada fracción de inhibición resultaron varios compuestos ya purificados con propiedades antifúngicas. De los compuestos antimicrobianos ya aislados, se seleccionaron uno de la variedad susceptible, dos de la resistente y dos de la inmune; los cinco se sometieron a un rastreo en el espectrofotómetro UV a 200-350 nm, encontrándose que en todos los casos los compuestos absorbieron a una longitud de onda entre 200-220 nm (figura 5). Esto indicó de la presencia de

anillos aromáticos. Por otro lado, se halló que los cinco compuestos se disolvían en ácido acético y en metanol o etanol:ácido acético (9:1) y que en metanol y etanol se precipitaban, lo que indica que los antimicrobianos poseen características polares.

Debido a las similitudes del comportamiento en CCF, absorción en UV y afinidad para disolverse en los mismos compuestos, se seleccionó una sola muestra de la variedad resistente para su identificación en cromatografía de gases (figura 6). Se encontraron cinco picos a los 15.29, 16.53, 17.70, 21.45 y 24.11 minutos. De ellos, el espectrómetro reveló que el pico más prominente (15.29 min) era el dibutil ftalato considerado como contaminante, lo mismo que el pico localizado a 21.45, probablemente contaminantes del material de laboratorio utilizado durante todo el proceso de extracción, separación y purificación. De los picos restantes, el localizado a 17.70 min presentó la probabilidad más alta de ser el compuesto antimicrobiano extraído y purificado de la pared celular de las plantas de crisantemo (98%) y correspondió al 1,1-metilen bis, 4-isocianato benceno o difenilmetano-diisocianato; los picos obtenidos a los 16.53 y 24.11 min probablemente correspondieron al difenil-diisocianato y al bis (2-etilhexil) ftalato respectivamente (con una probabilidad menor a 60%).

El espectrograma de masas del difenil-diisocianato aislado de paredes celulares de plantas de crisantemo variedad resistente con propiedades antifúngicas, se observa en la figura 7. Se concluyó que el crisantemo generó cuando menos un compuesto antimicrobiano que absorbe a una longitud de onda entre 200-220 nm. Este factor de resis-

tencia (figura 8) que se encuentra en la pared celular —en mayor cantidad en la variedad inmune, le sigue la resistente y prácticamente la variedad susceptible no lo tiene—, hasta el momento no se puede determinar si se trata de una fitoanticipina o fitoalexina. Este compuesto se identificó como difenilmetano-diisocianato. 



BIBLIOGRAFÍA

- Allen, E. M. y Thomas, C. A. (1971). "A Second Antifungal Polyacetylene Compound from *Phytophthora*-Infected Safflower", en *Phytopathology*, (60): 261-263.
- Binder, R. G.; Klisiewicz, J. M. y Waiss, A. J. Jr. (1977). "Stimulation of Germination of *Puccinia carthami* Teliospores by Polyacetylenes From Safflower", en *Phytopathology*, (67): 472-474.
- Bohlmann, F. y Zdero, Ch. (1982). "Sesquiterpene Lactones and Other Constituents from *Tanacetum parthenium*", en *Phytochemistry*, (21): 2543-2549.
- Christensen, L. P.
 _____ (1992). "Acetylenes and Related Compounds in Anthemideae", en *Phytochemistry*, (31): 7-49.
 _____ y Lam, J. (1991). "Acetylenes and Related Compounds in Heliantheae", en *Phytochemistry*, (30): 11-49.
- De Wit, P. J. y Kodde, E. (1981). "Induction of Polyacetylenic Phytoalexins in *Lycopersicon esculentum* after Inoculation with *Cladosporium fulvum* (Syn. *Fulvia fulva*)", en *Physiol. Pl. Pathol.* (18): 143-148.
- Firman, I. D. y Martin, P. H. (1968). "White Rust of Chrysanthemum", en *Ann. Appl. Biol.* (62): 429-442.
- Fujimoto, Y.; Wang, H.; Satoh, M. y Takeuchi, N. (1994). "Polyacetylenes from *Panax quinquefolium*", en *Phytochemistry*, (35): 1255-1257.
- Gershenzon, J. y Croteau, R. B. (1993). "Terpenoid Biosynthesis: The Basic Pathway and Formation of Monoterpenes, Sesquiterpenes, and Diterpenes", en Moore, T. S. (ed.) *Lipid Metabolism in Plants*. CRS Press, Fl. pp. 339-388.
- Heywood, V. H.; Harborne, J. B. y Turner, B. L. (1977). *Biology and Chemistry the Compositae*. Academic Press. Austin, Tx. pp. 1-20.
- Kogiso, S.; Wada, K. y Munakata, K. (1976). "Isolation of Nematicidal Polyacetylenes from *Carthamus tinctorius* L.", en *Agric. Biol. Chem.* (40): 2085-2089.
- Maatoq, G. T. y Hoffmann, J. J. (1996). "Fungistatic Sesquiterpenoids From *Parthenium*", en *Phytochemistry*, (43): 67-69.
- Maciver, D. R. (1995). "Constituents of Pyrethrum Extracts", en Casida, J. E. y Quistad, G. B. (eds.) *Pyrethrum Flowers. Productions, Chemistry, Toxicology and Uses*. Oxford University Press, N. Y. pp. 108-122.
- Menelaou, M. A.; Foroozesh, M.; Williamson, G. B.; Fronczek, F. R.; Fisher, H. D. y Fisher, N. H. (1992). "Polyacetylenes from *Chrysoma pauciflorum* Effects on Florida Sunhill Species", en *Phytochemistry*, (31): 3769-3771.
- Mercier, J.; Pannampalam, R.; Bernard, L. S. y Arul, J. (1993). "Polyacetylene Content and uv-induced 6-Methoxymellein Accumulation in Carrot Cultivars", en *J. Sci. Food Agric.* (63): 313-317.
- Niemann, G. J.
 _____ y Baayen, R. P. (1988). "Involvement of Phenol Metabolism in Resistance of *Dianthus caryophyllus* to *Fusarium oxysporum* f. sp. *Dianthi*", en *Neth. J. Pl. Pathol.* (94): 289-301.
 _____, Baayen, R. P. y Boon, J. J. (1990). "Localization of Phytoalexin Accumulation and Determination of Changes in Lignin and Carbohydrate Composition in Carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) Xylem as a Consequence of Infection With *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*, by Pyrolysis-mass Spectrometry", en *Neth. J. Pl. Pathol.* (96): 133-153.
 _____; Van der Bij, A.; Brandt-de, B.; Boon, J. J. y Baayen, R. P. (1991). "Differential Response of Four Carnation Cultivars to Races 1 and 2 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* and *Phialophora cinerescens*", en *Physiol. Mol. Pl. Pathol.* (38): 117-136.
- Norman, M. T.; García, F. A.; Sandoval, R. F. R.; Vázquez, G. L. M.; Aquino, M. J.; Corona, R. M. C. y Pedral, M. E. (1996). "Valoración del nivel de daño por *Puccinia horiana* Henn. en 18 variedades de crisantemo (*Dendranthema grandiflora* Anderson)", en *Rev. Lat. Fitopat.*
- Redl, K.; Breu, W.; Davis, B. y Bauer, R. (1994). "Anti-inflammatory Active Polyacetylenes Form *Bidens campylothea*", en *Pl. Med.* (60): 58-62.
- Stevens, K. L. 1986. Allelopathic Polyacetylenes from *Centaurea repens* (Russians knapweed). *J. Chem. Ecol.* (12): 1205-1211.
- Stoessel, A. (1982). "Biosynthesis of Phytoalexins", en Bailey, J. A. y Mansfield (eds.) *Phytoalexins*. John Wiley, N. Y. Toronto. pp. 133-180.
- Thomas, C. A. y Allen, E. H. (1970). "An Antifungal Polyacetylene Compound from *Phytophthora*-Infected Safflower", en *Phytopathology*, (60): 261-263.
- Van Etton, H. D.; Mansfield, J. W.; Bailey, J. A. y Farmer, E. E. (1994). "Two Classes of Plant Antibiotics: Phytoalexins versus «Phytoanticipins»", en *Pl. Cell*, (6): 1191-1192.
- Wilkomirski, B. y Dubielcka, B. (1996). "Sterol Content as a Similarity Marker of Different Organs of Two Varietas of *Chrysanthemum parthenium*", en *Phytochemistry*, (42): 1603-1604.