

Actividad antifúngica *in vitro* e *in vivo* del extracto acuoso de hojas de *Parthenium hysterophorus* L. sobre *Pyricularia grisea* Sacc.

in vitro and *in vivo* antifungal activity of the aqueous extract of *Parthenium hysterophorus* L. against *Pyricularia grisea* Sacc.

Aida Tania RODRÍGUEZ PEDROSO ¹✉, Miguel Ángel RAMÍREZ ARREBATO ¹, Regla María CÁRDENAS TRAVIESO ², Deyanira RIVERO GONZÁLEZ ¹, Ariel Cruz TRIANA ¹ y Silvia BAUTISTA BAÑOS ³.

¹Unidad Científico Tecnológica de Base Los Palacios (UCTB Los Palacios), Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA). Km 1½ Carretera La Francia, Los Palacios, Pinar del Río, Cuba, ² Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. Km 3½ Carretera Tapaste, San José de Las Lajas, Mayabeque, Cuba y ³Centro de Productos Bióticos, Instituto Nacional Politécnico (IPN), Yautepec, Estado de Morelos, México.
E-mail: atania@inca.edu.cu, ataniar73@yahoo.es ✉ Autor para correspondencia

Recibido: 15/06/2012 Fin de arbitraje: 31/07/2012 Revisión recibida: 12/12/2012 Aceptado: 17/12/2012

RESUMEN

Las plantas sintetizan metabolitos o compuestos químicos con actividad antimicrobiana, los cuales le confieren una protección natural contra hongos, bacterias e insectos. En este trabajo se obtuvo el extracto acuoso de hojas de *Parthenium hysterophorus* L. con el objetivo de evaluar su actividad antifúngica *in vitro* contra el hongo *Pyricularia grisea* Sacc, responsable de la enfermedad más importante en el arroz (*Oryza sativa*, L.), evaluando el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial en el tiempo. Además se evaluó *in vivo* el efecto protector del extracto contra *P. grisea* Sacc. en plántulas de arroz. Se realizó el análisis químico cualitativo del extracto. Se encontró que el extracto tenía elevada actividad antifúngica sobre el aislamiento PGS-05. Con una concentración de 10% de extracto la inhibición del hongo fue total, además de tener actividad biocida. En el ensayo *in vivo* se observó que los diferentes cultivares de arroz a las cuales se aplicó el extracto mostraron menor afectación por *P. grisea* Sacc. comparado con los tratamientos testigos. Se determinó que el extracto contiene metabolitos con efecto antimicrobiano como: taninos, fenoles, flavonoides y triterpenos. Por lo que, el extracto acuoso de *P. hysterophorus* L. podría ser utilizado en el control de la piriculariosis en el cultivo del arroz.

Palabras clave: *Pyricularia grisea*, taninos, metabolitos secundarios, *Parthenium hysterophorus*, piriculariosis

ABSTRACT

Plants synthesize metabolites or chemical compound with antimicrobial activity, which give them natural protection against fungus, bacteria and insects. In this work, an aqueous extract from *Parthenium hysterophorus* L. leaves was obtained with the objective of testing its *in vitro* antifungal activity against the fungus *Pyricularia grisea* Sacc. which cause the most important disease of rice (*Oryza sativa* L.) evaluating the inhibition percent of mycelial growth through time. Also, the protective effect of the extract was evaluated *in vivo* against *P. grisea* Sacc. in rice seedlings. A qualitative chemical analysis of the extract was carried out. It was found that the extract had high antifungal activity against the isolate PGS-05. A concentration of 10% of the extract, the inhibition of fungus was complete, besides it had biocidal activity. It was observed in *in vivo* test that the rice cultivars which received the extract showed less damage by *P. grisea* Sacc. as compared with control treatments. It was found that the extract contained antimicrobial metabolites such as tannins, phenols, flavonoids and triterpenes. Therefore, the aqueous extract of *P. hysterophorus* L. leaves could be used in piriculariosis control in rice cultivation.

Key words: *Pyricularia grisea*, tannins, secondary metabolites, *Parthenium hysterophorus*, piriculariosis

INTRODUCCIÓN

El uso indiscriminado de los fungicidas sintéticos ha originado problemas como toxicidad al hombre y daños al medio ambiente (Hernández *et al.*, 2000 y Soto *et al.*, 2000). Ante esta situación, una alternativa para controlar hongos fitopatógenos es

usar productos naturales. Por lo tanto, actualmente se investiga en la obtención de pesticidas derivados de plantas, que no produzcan daños al hombre y además sean biodegradables (Diop *et al.*, 1999).

El añublo del arroz, causado por el hongo *Pyricularia grisea* Sacc., estado asexual de

Magnaporthe grisea (Hebert) Barr, es la enfermedad más distribuida y dañina de este cultivo, en zonas tropicales y templadas. El hongo ataca prácticamente a todas las partes de la planta, pero los daños más frecuentes ocurren en las hojas y las panícula (Correa *et al.*, 2002).

Para el control de la piriculariosis se necesita la combinación de métodos de prevención genéticos (plantas resistentes y/o tolerantes), químicos (aplicación de fungicidas) y físicos (prácticas culturales), de los cuales los más usados son los dos primeros. Sin embargo, debido a la alta variabilidad genética de *P. grisea* Sacc. muchos cultivares se vuelven susceptibles en pocos años (Song y Googman, 2001). El uso de productos químicos sintéticos es uno de los métodos más utilizados para el control de este hongo pero estos productos pueden producir resistencia, como respuesta a la presión de selección por las altas dosis y aplicaciones continuas, ocasionando grandes pérdidas económicas (Guerrero *et al.*, 2007).

Por tanto, en este estudio se utilizó las hojas de la planta: *Parthenium hysterophorus* L. (Asteraceae), una arvense eliminada de los campos sin ningún provecho para la economía, la cual ha mostrado anteriormente efecto antifúngico sobre algunos hongos fitopatógenos como *Fusarium oxysporium*, *Stemphylium solani* y *Phytophthora parasítica* (Rodríguez *et al.*, 2000). En este trabajo se evaluó la actividad antifúngica del extracto acuoso de *P. hysterophorus* L. sobre el hongo *P. grisea*, Sacc. tanto *in vitro* como *in vivo* y se realizó el análisis químico cualitativo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se utilizaron hojas plenamente desarrolladas de la especie *P. hysterophorus* L., las cuales se recolectaron en la mañana, en áreas de la Unidad Científico Tecnológica de Base Los Palacios, ubicada en Pinar del Río, Cuba donde se identificaron y depositaron en el Herbario EELP, con un registro bajo el No. PH 001. Una vez cosechadas las hojas se eliminaron las dañadas y las enfermas. Las hojas seleccionadas se lavaron con agua corriente, se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 1% durante 10 minutos y después se lavaron con agua destilada para eliminar el exceso de cloro. Posteriormente, se secaron a una temperatura de 30-35°C, en una estufa, hasta la obtención de tres pesos constantes. El

material deshidratado se pulverizó en un molino manual.

Preparación del extracto

El extracto acuoso se obtuvo adicionando 30 mL de agua destilada a 30 g del material vegetal que consistía en hojas secas y dejando reposar durante 72 h a temperatura ambiente (27 ± 1 °C) con 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Después se filtró a través de una membrana de 0,22 µm.

Actividad antifúngica

Condiciones del aislado

Se utilizó el aislamiento monospórico PGS-05 de *P. grisea* Sacc. del cepario del laboratorio de Protección Vegetal de la Unidad Científico Tecnológica de Base de Los Palacios, Pinar del Río perteneciente al Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA) ubicada en San José de las Lajas, Cuba.

El hongo se hizo crecer en el medio de cultivo que contiene principalmente: agar, pseudotallo de plátano y hojas de arroz (ASHA) (Fabregat, 1984) en Placas Petri a pH 5,5-5,6, entre 26-28 °C con alternancia de luz y oscuridad de 16 y 8 horas, respectivamente.

Ensayo de la actividad antifúngica

Para evaluar el efecto del extracto acuoso de *P. hysterophorus* L. sobre el crecimiento micelial de *P. grisea* Sacc., se realizó el experimento en Placas Petri con 20 mL del medio ASHA, el cual fue esterilizado en autoclave (AESA, Mod. CV 250) durante 15 min a una presión de 1,05 kgf/cm² a 121 °C. El extracto se adicionó a las placas que contenían el medio ASHA a las concentraciones de 5 y 10%, distribuido por toda la placa y después se inocularon con un disco de micelio de 0,8 cm de diámetro.

Las placas fueron incubadas según las condiciones descritas anteriormente. Las evaluaciones se realizaron a las 72, 120, 168 y 216 horas después de la inoculación, determinándose el crecimiento micelial midiendo el diámetro de cada colonia con una regla graduada en mm. El experimento se repitió tres veces con cinco réplicas por tratamiento.

Ensayo de actividad biocida

Para determinar la actividad fungicida se tomaron los discos de micelio de las placas donde

hubo total inhibición del crecimiento micelial y se reinocularon en medio de cultivo ASHA realizando cinco repeticiones por tratamiento.

Se realizaron evaluaciones de crecimiento de diámetro de la colonia de *P. grisea* Sacc. a las 72, 120, 168 y 216 horas posterior a la inoculación. El experimento se repitió tres veces.

Análisis estadístico

Se calculó el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial mediante la fórmula:

$$PI = \left[1 - \frac{\varnothing_T}{\varnothing_{NT}} \right] \times 100$$

Donde PI es porcentaje de inhibición del crecimiento micelial y \varnothing_T y \varnothing_{NT} es el diámetro de la colonia tratada y no tratada, respectivamente en mm.

El experimento se realizó tres veces con resultados coincidentes, con cinco repeticiones por tratamiento. Los datos de porcentaje de inhibición (PI) del crecimiento micelial de *P. grisea* Sacc. se transformaron mediante la fórmula $\arcsen \sqrt{PI/100}$ y se realizó el análisis de varianza correspondiente. Las medias se compararon mediante la prueba de Tukey con un nivel de significación de 5%.

Ensayo en condiciones *in vivo*

El trabajo se desarrolló en la Unidad Empresarial Básica "Caribe" perteneciente al Complejo Agroindustrial Arrocerero de "Los Palacios" en Pinar del Río, donde la piriculariosis es uno de los factores limitantes en la producción. El experimento se realizó en el mes de abril del 2006 y 2007, con una temperatura entre 24 y 26 °C y una humedad relativa del 75%.

La siembra de las semillas de arroz de los diferentes cultivares se realizó en condiciones de canteros de infección con una densidad de 6 g/m lineal en surcos de 2 m de largo separados a una distancia de 25 cm, y se reforzaron las condiciones que favorezcan el desarrollo de la piriculariosis como son: presencia del testigo susceptible cada 10 líneas y de surcos esparcidos sembrados también con el testigo susceptible, elevada dosis de fertilizante nitrogenado (170 kg N ha⁻¹) cada 10 días.

En el experimento se evaluaron tres cultivares de arroz: INCA LP 7 e IR-759 (resistentes a la

piriculariosis) e IR-837 (susceptible a la piriculariosis) y a los cuales se le realizó aplicación foliar del extracto acuoso de *P. hysterothorus* L. Los tratamientos fueron: INCA LP 7; IR 759; IR 837; INCA LP 7 + Extracto 10%; IR 759 + Extracto 10% e IR 837 + Extracto 10%.

Se realizó la aplicación foliar del extracto acuoso de *P. hysterothorus* L. al 10 % y asperjándolo con un atomizador manual a razón de 50 mL/surco a los 18 días después de germinada (ddg) la semilla de arroz. Posteriormente, se tomaron 10 plantas de arroz y se analizó la infección en las hojas. La primera evaluación fue a los 25 ddg, la segunda a los 32 ddg. Se empleó la escala estándar de evaluaciones para arroz (IRRI, 2002) de nueve grados, donde para el caso de las hojas 0 corresponde a ninguna lesión y 9 a toda el área foliar muerta, considerándose que una calificación de 0 a 3 es resistente y de 4 o más indica que el material es susceptible.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron procesados usando el programa estadístico SPSS 10.0 para Windows. Se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis para encontrar diferencias entre los tratamientos y la prueba de Mann-Whitney con la corrección de Bonferroni para comparar cada tratamiento de forma independiente y asignar las diferencias entre las medianas para $p < 0,05$ aplicada a la escala de grado de resistencia correspondiente. Este ensayo se repitió dos veces con resultados similares.

Análisis químico cualitativo

Al extracto acuoso de *P. hysterothorus* L. se le realizó el análisis fitoquímico para metabolitos secundarios según metodología descrita por Trease y Evans (1989) y Harborne (1998), realizándose tres réplicas para cada ensayo. Se emplearon técnicas simples, rápidas y selectivas para la determinación de los diferentes metabolitos secundarios presentes.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Actividad antifúngica

La actividad antifúngica del extracto acuoso *P. hysterothorus* L. a diferentes concentraciones se observa en el Cuadro 1. Como puede apreciarse el tratamiento donde se aplicó 10 % del extracto por cada placa logró inhibición total del crecimiento del hongo y donde se aplicó el 5 %, hubo inhibición pero menor que donde se adicionó la mayor concentración

del extracto. Todos los tratamientos difirieron entre ellos y con respecto al control. Similar efecto encontró Rodríguez *et al.* (2000) con un extracto hidroalcohólico de la misma planta y sobre otro aislamiento del mismo hongo.

Los resultados obtenidos sugieren que el extracto afectó el crecimiento del hongo, además, la composición química afectó el crecimiento del hongo.

Actividad biocida

En el Cuadro 2 se aprecian los resultados de la actividad biocida del extracto acuoso de *P. hysterophorus* L. a la concentración de 10 % sobre el hongo *Pyricularia grisea* Sacc.

Se puede observar que no hubo crecimiento del micelio del hongo que se encontraba en contacto con el extracto acuoso (10 %), demostrando así el efecto biocida del mismo sobre el patógeno utilizado, en la concentración del extracto y condiciones empleadas.

Ensayo *in vivo*

En el Cuadro 3 se muestra el comportamiento de tres cultivares de arroz ante la infección por *P. grisea* Sacc. en estado de plántula a los 25 ddg y

después de la aplicación del extracto acuoso de *P. hysterophorus* L. a los 32 ddg. Los cultivares INCA LP 7 e IR 837, que no fueron tratadas con el extracto,

Cuadro 3. Comportamiento de las variedades de arroz (*Oriza sativa* L.) tratadas con el extracto acuoso de *Parthenium hysterophorus* L. ante la infección en hojas por el hongo *Pyricularia grisea* Sacc. en la Unidad Empresarial Básica "Caribe", del Complejo Agroindustrial Arrocero de "Los Palacios", Pinar del Río, Cuba.

Variedad	Evaluaciones	
	25 ddg	32 ddg
INCA LP 7	4 ^c †	4 ^c
IR 759	3 ^b	3 ^b
IR 837	6 ^d	7 ^e
INCA LP 7 + extracto (10%)	3 ^b	3 ^b
IR 759 + extracto (10%)	2 ^a	3 ^b
IR 837 + extracto (10%)	4 ^c	4 ^c

ddg = días después de germinada

† Letras diferentes indican promedios estadísticamente diferentes de acuerdo a la Prueba de Mann-Whitney con corrección de Bonferroni ($p < 0,05$)

Escala estándar de evaluaciones para arroz (IRRI, 2002) de nueve grados: 0 hojas corresponde a ninguna lesión y 9 a toda el área foliar muerta. Se considera que una calificación de 0 a 3 es resistente y de 4 o más indica que el material es susceptible.

Cuadro 1. Efecto inhibitorio en el tiempo (horas) del extracto acuoso de *Parthenium hysterophorus* L. sobre el crecimiento micelial del aislamiento monospórico PGS-05 de *Pyricularia grisea* Sacc. proveniente del cepario del Laboratorio de Protección Vegetal de la Unidad Científico Tecnológica de Base de Los Palacios, Pinar del Río, Cuba.

Tratamientos	Inhibición del crecimiento micelial (%)			
	72 h	120 h	168 h	216 h
Control	0 ^c †	0 ^c	0 ^c	0 ^c
Extracto (5%)	60 ^b	62 ^b	77 ^b	83 ^b
Extracto (10%)	100 ^a	100 ^a	100 ^a	100 ^a
Error Estándar	0.02	0.015	0.017	0.019

† Letras diferentes indican promedios estadísticamente diferentes de acuerdo a la prueba de Tukey ($p < 0,05$).

Cuadro 2. Efecto biocida en el tiempo (horas) del extracto acuoso de *Parthenium hysterophorus* L. sobre el crecimiento micelial del aislamiento monospórico PGS-05 de *Pyricularia grisea* Sacc. proveniente del cepario del Laboratorio de Protección Vegetal de la Unidad Científico Tecnológica de Base de Los Palacios, Pinar del Río, Cuba.

Tratamientos	Inhibición del crecimiento micelial (%)			
	72 h	120 h	168 h	216 h
Control	0 ^b	0 ^b	0 ^b	0 ^b
Extracto acuoso (10%)	100 ^a	100 ^a	100 ^a	100 ^a

† Letras diferentes indican promedios estadísticamente diferentes de acuerdo a la prueba de Tukey ($p < 0,05$).

se comportaron como susceptible en ambas evaluaciones, donde la IR 837 aumentó el grado de susceptibilidad de los 25 a los 32 ddg. Los cultivares INCA LP 7 e IR 759 tratadas con el extracto se comportaron como resistentes según la escala; sin embargo, el cultivar IR 837 mostró susceptibilidad pero de menor grado que cuando no fue tratada.

No obstante, de haberse encontrado diferencia entre los cultivares y los tratamientos, se debe repetir dos o tres campañas en la época lluviosa, para corroborar el comportamiento de los cultivares tratados con el extracto ante la piriculariosis, pues no hubo afectación severa por el patógeno cuando se realizó el experimento. El desarrollo de esta enfermedad está muy relacionado con las condiciones ambientales, de las características genéticas de los cultivares y de la variabilidad del patógeno (Cárdenas *et al.* 2000).

Análisis químico cualitativo

En el Cuadro 4 se muestran los métodos utilizados y los compuestos encontrados en el extracto acuoso de *P. hysterophorus* L., donde se observa la presencia de flavonoides, fenoles, taninos aminoácidos, triterpenos y saponinas y no se encontraron quinonas, ni alcaloides. Similar composición encontró Rodríguez *et al.* (2000) en la misma especie y utilizando la misma metodología.

Algunos autores plantean que la inhibición del crecimiento micelial puede deberse a la presencia de algunos compuestos con actividad antifúngica, antiviral y antibacterial como son los flavonoides

Cuadro 4. Métodos empleados y compuestos químicos determinados en el análisis químico cualitativo en el extracto acuoso de hojas de *Parthenium hysterophorus* L. colectadas en la Unidad Científico Tecnológica de Base Los Palacios, Pinar del Río, Cuba.

Método	Compuesto	Resultado
Shinoda	Flavonoides	+
Cloruro Férrico	Fenoles	+
Gelatina	Taninos	+
Ninhidrina	Aminoácidos	+
Lieberman-Burchard	Triterpenos	+
Bornträger	Quinonas	-
Mayer	Alcaloides	-
Espuma	Saponinas	+

(+) Positivo y (-) Negativo

(Cushnie y Lamb, 2005 y Ahameethunisa y Hooper, 2010). Los taninos y fenoles son metabolitos de reconocida actividad antimicrobiana (Boyraz y Ozcan, 2006; Krist *et al.*, 2007; Ahameethunisa y Hooper, 2010). También los terpenos tienen actividad acaricida, insecticida y fungicida. (Ahameethunisa y Hooper, 2010).

En sentido general, puede plantearse que la actividad antifúngica del extracto acuoso de *P. hysterophorus* L. no solo se debe a la presencia de determinados metabolitos secundarios identificados en el análisis químico cualitativo, sino también a la concentración de éstos. Estos resultados dan la posibilidad que se realice el aislamiento de los componentes del extracto, para demostrar cuál o cuáles de ellos es el responsable de la actividad antimicrobiana. Y posteriormente puedan ser utilizados como principios activos de formulaciones bioplaguicidas para el control de esta enfermedad.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos mostraron que el extracto acuoso de *P. hysterophorus* L. a la concentración de 10 % tiene elevada actividad antifúngica *in vitro* e *in vivo* sobre el hongo *Pyricularia grisea* Sacc. Se comprobó que en el extracto existían metabolitos con reconocida actividad antimicrobiana como: taninos, fenoles, flavonoides, triterpenos.

LITERATURA CITADA

- Ahameethunisa, A. R. and W. Hooper. 2010. Antibacterial activity of *Artemisia nilagirica* leaf extracts against clinical and phytopathogenic bacteria. BMC Complementary and Alternative Medicine 10 (6). Documento en línea <http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1472-6882-10-6.pdf>. Visita 12/04/2012.
- Boyraz, N. and M. Ozcan. 2006 Inhibition of phytopathogenic fungi by essential oil, hydrosol, ground material and extract of summer savory (*Satureja hortensis* L.) growing wild in Turkey. Int. J. of Food Microbiol. 107: 238-242.
- Cárdenas, R. M.; V. Cordero, N. Pérez, E. Cristo e I. Gell. 2000. Utilización de una nueva metodología para la evaluación de arroz (*Oryza sativa*, L.) ante la infección producida por el hongo *Pyricularia grisea*. Cultivos Tropicales 21 (1): 63-66.

- Correa, F.; D. Tharreau, C. Martínez, M. Vales, F. Escobar, G. Prado y G. Aricapa. 2002. Combinaciones de genes en arroz para el desarrollo de resistencia durable a *Pyricularia grisea* en Colombia. *Fitopatología Colombiana* 26 (1-2): 47-54.
- Cushnie, T. P. and A. J. Lamb. 2005. Antimicrobial activity of flavonoids. *Int. Journal Antimicrob. Agents* 26 (5): 343-56.
- Diop, Y.; M. Diuf, A. Fall, B. Thiam, M. Ndiaye and D. Ciss. 1999. Pesticide bioaccumulation: measurement and levels of organochloride residues in products of vegetables origin. *Dakar Med.* 44 (2): 153-157.
- Fabregat, M. 1984. Aspectos bioecológicos y control de *Pyricularia oryzae* Cav. en el arroz. Tesis para optar por el Grado Científico de Candidato a Doctor en Ciencias Agrícolas. Inst. Sup. Cienc. Agrop. de La Habana, Cuba. 100 pp.
- Guerrero, E.; S. Solís, F. Hernández, A. Flores, V. Sandoval y D. Jasso. 2007 Actividad biológica *in vitro* de extracto de *Fluorensia cernua*, D.C. en patógeno de postcosecha: *Alternaria alternata* (Fr.:Fr.) Keissel., *Colletotrichum gloesporioides* (Penz) Penz y Sacc. y *Penicillium digitatum* (Pers.:Fr.) Sacc. *Revista Mexicana de Fitopatología* 25: 48-53.
- Harborne, J. B. 1998. Phytochemical methods. A guide to modern techniques of plants analysis. Chapman and Hall, London, U. K. p. 182-190.
- Hernández, F. A.; P. Jasso, O. Cárdenas, O. Juárez y M. Fortanelli. 2000. Actividad de *Chrysactinia mexicana* Gray y *Tagetes lucida* Cav. sobre *Sitophilus zeamais*. Memorias del VI Simposio Nacional sobre Sustancias Vegetales y Minerales en el Combate de Plagas. Acapulco, Guerrero, México. 80 pp.
- International Rice Research Institute (IRRI). 2002. Standard Evaluation System for Rice. International Rice Research Institute. 56 p.
- Krist, S.; L. Halwachs, G. Sallaberger and P. Buchbauer. 2007. Effects of scents on airborne microbes, part I: thymol, eugenol, trans-cinnamaldehyde and linalool. *Flavour and Fragrance Journal* 22 (1): 44-48.
- Rodríguez, A. T.; D. Morales y M. A. Ramírez. 2000. Efecto de extractos vegetales sobre el crecimiento *in vitro* de hongos fitopatógenos. *Cultivos Tropicales* 21 (2): 79-82.
- Song, F. and R. Goodman. 2001. Molecular biology of disease resistance in rice. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 59: 1-11.
- Soto, R. M.; F. Juárez y P. Jasso. 2000. Evaluación insecticida de *Parthenium incanum* y de *Zinnia* spp. en *Sitophilus zeamais*. Memorias del VI Simposio Nacional sobre Sustancias Vegetales y Minerales en el Combate de Plagas. Acapulco, Guerrero, México. 80 pp.
- Trease, G. and W. Evans. 1989. Textbook of pharmacognosy. 12th ed. Balliere, Tinadl. London. United Kingdom. 500 pp.