

## Extractos de Semilla de *Swietenia humilis* Zucc. con Actividad Antifúngica en *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.:Fr.) Vuill.

## Extracts of *Swietenia humilis* Zucc. Seed with Antifungal Activity in *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.:Fr.) Vuill.

Miguel Ángel Angulo-Escalante, Evangelina Armenta-Reyes, Raymundo Saúl García-Estrada, José Armando Carrillo-Fasio, Edith Salazar-Villa, y José Benigno Valdéz-Torres, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., Apdo. Postal 32A, Unidad Culiacán, km 5.5 Carr. Culiacán-Eldorado, Culiacán, Sinaloa, México CP 80129.  
Correspondencia: mangulo@ciad.edu.mx

(Recibido: Marzo 22, 2009 Aceptado: Junio 22, 2009)

Angulo-Escalante, M.A., Armenta-Reyes, E., García-Estrada, R.S., Carrillo-Fasio, J.A., Salazar-Villa, E., Valdéz-Torres, J.B. 2009. Extractos de Semilla de *Swietenia humilis* Zucc. con Actividad Antifúngica en *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.:Fr.) Vuill. Revista Mexicana de Fitopatología 27:84-92.

**Resumen.** El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto antifúngico de extractos de semillas de *Swietenia humilis*, planta de la familia meliaceae rica en metabolitos secundarios con actividad fungicida, para el control *in vitro* de *Rhizopus stolonifer*. De las semillas, se obtuvieron extractos diclorometánico, hidroalcohólico y metanólico, los cuales se incorporaron de forma separada al medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA) en concentraciones de 1, 2.5, 5 y 7.5%. Se determinó su efecto en la inhibición del crecimiento micelial, esporulación y alteraciones en las estructuras germinativas del hongo *Rhizopus stolonifer*, causante de la pudrición blanda en hortalizas. La inhibición del crecimiento micelial inducida por el extracto metanólico fue directamente proporcional a la concentración, el cual a 7.5% inhibió el crecimiento micelial en un 70.3%. Los extractos hidroalcohólico y diclorometánico no afectaron de manera significativa este parámetro. La aplicación de extracto metanólico a concentraciones mayores del 5%, no permitió la formación de esporas, mientras que los extractos diclorometánico e hidroalcohólico inhibieron un 85.8 y 97.7% respectivamente, al usarse una concentración de 7.5%. El extracto metanólico disminuyó el tamaño y cambió el color de los esporangios del hongo. El diámetro promedio de los esporangios en el testigo fue de 275 µm y 110 µm para el extracto metanólico al 2.5%. Además, el extracto metanólico al 5% indujo la formación de zigosporas, como un mecanismo de sobrevivencia a condiciones adversas que le

**Abstract.** The present study is aimed to evaluate the antifungal effect of extracts obtained from seeds of *Swietenia humilis*, a tree of the meliaceae family rich in secondary metabolites with *in vitro* antifungal activity for the control of *Rhizopus stolonifer*. Extracts were obtained from the seeds using dichloromethane, methanol and hydro-alcoholic, and incorporated individually on a medium of potato-dextrose-agar (PDA) at 1, 2.5, 5 and 7.5% concentrations. The effect was determined on the mycelia growth inhibition, sporulation, and alteration of the *Rhizopus stolonifer* vegetative and germinative structures. *R. stolonifer* is a causal agent of vegetables soft rot. The mycelia growth inhibition induced by the methanol extract, was directly proportional to the concentration at 7.5%, and inhibited the mycelia growth about 70.3%. The hydro-alcoholic and dichloromethane extracts did not significantly affect this parameter. Applications over 5% of methanol extract did not allow fungi spore formation, whereas the hydro-alcoholic and dichloromethane about extracts inhibited 85.8 and 97.7% respectively at a concentration of 7.5%. The methanol extract decreased size and changed color of the fungi sporangium. The sporangium diameter in the control was 275 µm and 110 µm exposed with the methanol extract at 2.5%. Furthermore, zygosporangia formation was induced by this extract at 5%, as a result of a reproduction mechanism in adverse conditions that do not allow an asexual reproduction. The effect of the methanol extract in mycelia growth inhibition, sporulation, and alteration of the germination structures observed in this study can be attributed to the presence of compounds related with terpenoids. Their presence was demonstrated with characterization reactions and thin layer chromatography. Therefore, *Swietenia humilis* can be a source of secondary metabolites for new fungicides development.

impiden al hongo reproducirse en forma asexual. El efecto del extracto metanólico en la inhibición del crecimiento micelial, esporulación y alteraciones de las estructuras germinativas observado en este estudio, puede atribuirse a la presencia de compuestos relacionados estructuralmente a terpenoides. Su presencia se demostró con reacciones de caracterización y su cromatograma correspondiente en capa fina. Por lo que *Swietenia humilis* podría ser una fuente de metabolitos para el desarrollo de fungicidas.

Palabras clave adicionales: Esporulación, crecimiento micelial, extracto metanólico.

### INTRODUCCIÓN

La pudrición blanda ocasionada por *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.:Fr.) Vuill es una enfermedad poscosecha altamente destructiva, que ataca una gran variedad de frutas y hortalizas a nivel mundial (Qing y Shiping, 2000). Las esporas del hongo presentes en el medio ambiente se depositan en las heridas de los frutos maduros y producen infecciones que generan pérdidas de los productos entre el 25 al 50%, aún con tratamientos antifúngicos (Hahn, 2004). Los fungicidas sintéticos son el método mas utilizado para el control de hongos poscosecha (Müller, 2002); sin embargo, provocan el desarrollo de mecanismos de resistencia, a la vez que generan residuos tóxicos en alimentos y medio ambiente poniendo en riesgo la salud del hombre. Esto ha inducido a la búsqueda de nuevos fungicidas que seguramente se encuentran en los vegetales (biofungicidas) y especialmente los que pertenecen a la familia Meliaceae. Estas plantas contienen tetranortriterpenoides, conocidos como limonoides con diversas actividades biológicas, incluyendo la antifúngica (Roy y Saraf, 2006). Investigaciones realizadas en las últimas dos décadas han permitido identificar plantas de esta familia con actividad antifúngica. Entre ellas destacan *Azadirachta indica* A. Juss, que contiene limonoides antifúngicos (Govindachari *et al.*, 1998) y *Khaya ivorensis* A. Chevallier, de la que se han aislado 10 limonoides con acción fungicida a *Botrytis cinerea* Pears (Abdelgaleil *et al.*, 2005). En México se encuentra el árbol *Swietenia humilis* Zucc (Pennington, 1981), comúnmente conocido en el estado de Sinaloa como “venadillo” y en otras regiones del país como “zopilote” y “caobilla” o “cubano” (Martínez, 1979). Se le localiza en los bosques secos y húmedos tropicales de las costas del Pacífico de los estados de Sinaloa, Colima, Michoacán, Guerrero y Chiapas, México; hasta la provincia de Gunacaste, en Costa Rica (Standley, 1920-1926). Este árbol es una fuente de madera para la construcción de muebles y en ciertas regiones de México es utilizado como árbol medicinal para eliminar parásitos intestinales (Niembro-Rocas, 1990). Estudios fitoquímicos muestran que las semillas de venadillo contienen, al menos 11 humilinoles (Jiménez *et al.*, 1998) y por su semejanza en sus estructuras químicas se incluyen en el grupo de los mexicanolides. Los extractos metanólicos de semillas secas de *Swietenia humilis* mostraron actividad insecticida en el gorgojo harinero (*Tenebrio monitor* Linnaeus.) en estado de larva (Segura-Correa *et al.*, 1993). Los humilinoles B y C aislados del extracto metanólico poseen actividad

Additional keywords: Sporulation, mycelia growth, methanol extract.

### INTRODUCTION

Soft rot caused by *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.:Fr.) Vuill is a highly destructive postharvest disease, affecting a wide variety of fruits and vegetables worldwide (Qing and Shiping, 2000). These fungi spores, environmentally present, are deposited in the wounds of the mature fruit, producing 25 to 50% profit loss, even after fungicide treatments application (Hahn, 2004). Synthetic fungicides are the most commonly used method for postharvest fungi control (Müller, 2002). Nevertheless, they cause the development of resistance mechanisms, which also generate toxic residue in both food -and environment, turning into a risk for human health. This has caused the search of new fungicides that are certainly found in vegetables (bio-fungicides), especially the vegetables that belong to the Meliaceae family. These plants have tetranortriterpenoides, known as limonoids with diverse biological activities, including antifungal (Roy and Saraf, 2006). Research performed over the last two decades have identified plants from this family with antifungal activity. Some of the plants identified that stand out from this particular family are the *Azadirachta indica* A. Juss, which contains antifungal limonoids (Govindachari *et al.*, 1998), and the *Khaya ivorensis* A. Chevallier, which has provided 10 limonoids with fungicide action to *Botrytis cinerea* Pears (Abdelgaleil *et al.*, 2005). The *Swietenia humilis* Zucc tree (Pennington, 1981), commonly known in the state of Sinaloa, Mexico, as the “venadillo” and in other regions country wide identified as the “zopilote” and “caobilla” or “Cuban” (Martínez, 1979), is found in the dry and humid tropical forest of the Pacific coast in the states of Sinaloa, Colima, Michoacan, Guerrero and Chiapas in Mexico, and also in the province of Gunacaste, in Costa Rica (Standley, 1920-1926). Such a tree is a source of wood for furniture making, and it is even used in some areas in Mexico as a medicine tree to eliminate intestinal parasites (Niembro-Rocas, 1990). Phytochemical studies reveal that the venadillo seeds have at least 11 humilinoles (Jiménez *et al.*, 1998), and due to the resemblance of its chemical structures, they are included in the group of the mexicanolides. The methanol extracts from *Swietenia humilis* dried seeds revealed an insecticide activity in floury gurgle (*Tenebrio monitor* Linnaeus.) at a larvae stage (Segura-Correa *et al.*, 1993). The humilinoles B and C isolated from the methanol extract have an anticancer gene *in vitro* (Jiménez *et al.*, 1997) and the humilinoles C and E have an insecticide activity against the European drill (*Ostrinia nubilalis* Hübner) (Jiménez *et al.*, 1997; Jiménez *et al.*, 1998). However, no studies have been performed to demonstrate antifungal activity from methanol extracts and isolated mexicanolides. The present research was performed looking forward to determine the antifungal effect of the extracts obtained from *Swietenia humilis* in *Rhizopus stolonifer* seeds.

### MATERIALS AND METHODS

**Venadillo seeds germ preparation.** Ripe fruit were collected from trees located in the city of Culiacan, Sinaloa, Mexico, in April, 2004, and further translated to the Toxicology Laboratory at the Centro de Investigación en Alimentación y

anticancerígena *in vitro* (Jiménez *et al.*, 1997) y los humilinoideos C y E actividad insecticida contra el barrenador europeo del maíz (*Ostrinia nubilalis* Hübner) (Jiménez *et al.*, 1997; Jiménez *et al.*, 1998). Sin embargo, no se han realizado estudios que demuestren la actividad antifúngica tanto de los extractos metanólicos como de los mexicanolides aislados. La presente investigación se realizó con el objetivo de determinar el efecto antifúngico de los extractos obtenidos de semillas de *Swietenia humilis* en *Rhizopus stolonifer*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Preparación del germen de semillas de venadillo.** Durante el mes de abril de 2004, se colectaron los frutos en estado maduro de árboles localizados en la ciudad de Culiacán, Sinaloa, México y se trasladaron al Laboratorio de Toxicología del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., Unidad Culiacán. Las semillas fueron liberadas de la cápsula y secadas bajo sombra durante 15 días (Dai *et al.*, 1999). Las semillas sin testa se almacenaron en bolsas de polietileno a 4°C.

**Molienda y obtención de extractos.** Se molió 1 kg de germen de semilla de venadillo en una licuadora comercial y se pasaron por un tamiz No. 40 (diámetro de partícula 425 µm). La muestra se dividió en dos secciones para realizar los procesos de extracción.

**Extracto hidroalcohólico (HA).** Se pesaron 150 g de germen de semillas molidas y se colocaron en un matraz Erlenmeyer de 2 L. Se adicionaron 1.5 L de etanol/agua (7:3, v:v) y se mantuvieron en reposo, en ausencia de luz y a temperatura ambiente por una semana. El macerado se filtró con tela de organza y papel filtro Whatman No. 5 y el filtrado se evaporó en un rotavapor (Buchi R-205, Suiza) a presión reducida y temperatura controlada, no mayor a 50°C (Cáceres *et al.*, 1991). Finalmente, el extracto se colocó en viales ámbar de 50 mL y almacenado a 4°C.

**Extractos diclorometánico y metanólico (DCM y MeOH).** Se pesaron 110 g de germen de semilla molida y se mezclaron con 5 L de diclorometano. El macerado se dejó en reposo durante una semana a temperatura ambiente y en la oscuridad. La obtención del extracto y almacenamiento se realizaron bajo las mismas condiciones que con el extracto hidroalcohólico. De la extracción antes descrita, se recuperó el germen, se mezcló con 3 L de metanol y se maceró durante una semana a temperatura ambiente y en la oscuridad. El macerado se filtró y evaporó a las condiciones mencionadas. Los solventes utilizados en esta investigación fueron marca JT-Baker (en el caso de metanol y etanol) y Fisher (diclorometano), grado HPLC.

**Aislamiento, purificación y mantenimiento del cultivo monospórico de *Rhizopus stolonifer*.** Se colectaron frutos de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) con síntomas de pudrición ocasionada por el hongo *Rhizopus stolonifer*. Los tejidos enfermos seleccionados se colocaron en cajas Petri con medio PDA (200 g de papa, 10 g de dextrosa y 20 g de agar L<sup>-1</sup>), y se incubaron a 28°C por 24 h. La identificación se realizó con base a las características morfológicas del micelio y estructuras germinativas (Alexopoulos y Mims, 1997). Para la obtención del cultivo monospórico, se preparó

Y Desarrollo, A.C., Culiacán unit. Seeds were liberated from the capsule and dried under shadow for 15 days (Dai *et al.*, 1999). Seeds without forehead were stored in polyethylene bags at 4°C.

**Extracts grinding and obtainment.** The grinding of 1kg of germ of venadillo seed was performed in a commercial blender and sifted through a No. 40 sieve (425 µm particle diameter). The sample was divided in two sections in order to perform the extraction process.

**Hydro-alcoholic extract (HA).** After 150 g of germ from the grinded seeds had been weighed, they were placed in a 2 L Erlenmeyer matrass; 1.5 L ethanol/water were added afterwards (7:3, v:v), and kept to rest lightless at environmental temperature for a week. The macerated was then filtered through an organza cloth and Whatman No. 5 filter paper; the filtered material was evaporated in a rotavapor (Buchi R-205, Swedish) at a reduced pressure of 337 mbar and a controlled temperature not higher than 50°C (Cáceres *et al.*, 1991). Finally, the extract was placed in 50 mL Amber vials and stored at 4°C.

**Dichloromethane and Methanol extracts (DCM y MeOH).** After 110 g of germen of grinded seed had been weighed, they were mixed with 5 L of dichloromethane. The macerated was left to rest lightless at environmental temperature for a week. The obtention and storage of the extract were performed under the same conditions as with the hydro-alcoholic extract. Germ was then recovered from the previously described extraction, mixed with 3 L methanol and macerated for a week lightless at environmental temperature. The macerated was filtered and evaporated under the previously mentioned conditions, as well. The solvents utilized in this research were JT-Baker brand (for methanol and ethanol) and Fisher (dichloromethane) HPLC grade.

**Isolation, purification and maintenance of the *Rhizopus stolonifer* monosporic crop.** Fruit of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) with rot symptoms caused by the *Rhizopus stolonifer*, were collected. The selected diseased tissues were placed in Petri dishes with a PDA medium (200 g potato, 10 g dextrose and 20 g agar L<sup>-1</sup>), for their further incubation at 28°C for 24 h. The identification was performed based on mycelia morphologic characteristics and germinative structure (Alexopoulos and Mims, 1997).

A spore suspension (aplanaspores) of 1.5 x 10<sup>2</sup> propagules/mL was prepared for the obtainment of the monosporic crop. Afterwards, 10 µL in a Petri dish were added and dispersed with sterilized pearls of glass. The crop was incubated at 28°C for 6 h and isolated with a germinated spore, with the aid of a Carl Zeiss (100 X) brand stereoscope and a 9 mm drill. The piece of crop mean along with the spore, was transferred to a PDA Petri dish until a pure monosporic colony had been obtained. The stock derived from such procedure was activated in a PDA crop medium every eight days throughout the experiment process and stored in inclined tubes with mineral oil at the stock from CIAD phytopathology laboratory stock.

una suspensión de esporas (aplanosporas) de  $1.5 \times 10^2$  propágulos/mL. Se agregaron 10  $\mu$ L en una caja Petri y se dispersaron con perlas de vidrio esterilizadas. El cultivo se incubó a 28°C por 6 h y se aisló una espора germinada, con ayuda de un esteroscopio marca Carl Zeiss (100 X) y un sacabocado de 9 mm. El trozo de medio de cultivo con la espора se transfirió a una caja Petri con PDA hasta obtener una colonia monospórica pura. La cepa obtenida se activó en medio de cultivo PDA cada ocho días durante el transcurso del experimento y se almacenó en tubos inclinados con aceite mineral en el cepario del laboratorio de Fitopatología del CIAD.

**Inhibición del crecimiento micelial.** El medio de cultivo PDA se esterilizó durante 15 min a 15 lb/plg<sup>2</sup> y se enfrió a 45°C (Misra y Sahu, 1977). Se agregaron los extractos crudos de venadillo: metanólico, diclorometánico e hidroalcohólico a concentraciones de 1, 2.5, 5 y 7.5%. Posteriormente, se vació en cajas Petri, bajo condiciones asépticas. Se utilizaron cinco cajas por tratamiento, incluyendo al testigo que consistió en PDA sin extracto. En la parte central de las cajas Petri se colocó un disco de agar de 0.7 cm de diámetro más *Rhizopus stolonifer* en crecimiento activo (Jasso de Rodríguez *et al.*, 2005; Reddy *et al.*, 1998), incubándose por 24 h a 28°C. El diámetro de crecimiento del micelio se midió cada tres horas, hasta que el testigo llenó por completo la caja. El resultado se expresó en porcentaje de inhibición del crecimiento micelial y se obtuvo a través de la aplicación de la ecuación descrita por Vallejo-Cohen *et al.* (1999).

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{\text{Crecimiento micelial testigo} - \text{Crecimiento micelial tratamiento}}{\text{Crecimiento micelial testigo}} \times 100$$

**Inhibición de la esporulación.** El conteo de esporas se realizó a partir de las cajas Petri utilizadas en el experimento de la actividad biológica de los extractos. Se les agregaron 10 mL de agua destilada esterilizada, se raspó la superficie con un portaobjetos y se filtró la suspensión con una malla de organza. La concentración de esporas por mililitro se determinó con una cámara de Neubauer y con el apoyo de un microscopio compuesto (Carl Zeiss) a 40 X de aumento (Bautista-Baños *et al.*, 2003). El porcentaje de inhibición de la esporulación se determinó de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{\text{Número de esporas testigo} - \text{Número de esporas tratamiento}}{\text{Número de esporas testigo}} \times 100$$

**Identificación y evaluación de esporangios alterados.** Se seleccionaron muestras de estructuras vegetativas y germinativas, del hongo en estudio, de los tratamientos del ensayo de inhibición del crecimiento micelial con 72 h de incubación y se fijaron con lactofenol en porta objetos. Se observaron y analizaron en un microscopio óptico marca Carl

**Mycelia growth inhibition.** The PDA crop medium was sterilized for 15 min at 15 lb/plg<sup>2</sup> and cooled off at 45°C (Misra and Sahu, 1977). The raw venadillo extracts were further added: methanol, dichloromethane and hydro-alcoholic at 1, 2.5, 5 and 7.5% concentrations. Afterwards, they were poured into Petri dishes under aseptic conditions. Five dishes per treatment were used, included the witness, consisting of a PDA without extract. A 0.7 cm diameter disc plus *Rhizopus stolonifer* in active growth (Jasso de Rodríguez *et al.*, 2005; Reddy *et al.*, 1998), was placed in the center of the dishes, incubating for 24 h at 28°C. Mycelia growth diameter was measured every three hours, until the witness completely filled up the dish. The result was measured as mycelia growth inhibition percentage, and obtained throughout the application of the equation described by Vallejo-Cohen *et al.* (1999).

$$\% \text{ inhibition} = \frac{\text{Mycelial growth control} - \text{Mycelial growth treatment}}{\text{Mycelial growth control}} \times 100$$

**Sporulation inhibition.** The spore counting was performed from the Petri dishes used for the extract biological activity experiments. A portion of 10m L of distilled water was added, the surface was scraped off with a slide and the suspension filtered with an organza mesh. The spore concentration per millimeter was measured with a Neubauer chamber and the help of a compound microscope (Carl Zeiss) at an increase of 40 X (Bautista-Baños *et al.*, 2003). The sporulation inhibition percentage was determined in accordance to the following equation:

$$\% \text{ inhibition} = \frac{\text{Number of spores control} - \text{Number of spores treatment}}{\text{Number of spores control}} \times 100$$

**Altered sporangium identification and evaluation.** Vegetative and germinative structure samples of the fungi under study were selected from the mycelia growth inhibition essays that had been in incubation for 72 h, and fixed with lactophenol on a slide. They were observed and analyzed in an optic microscope Carl Zeiss (100X) brand, set with a digital camera (Moticam 480), having their diameter determined by a Motic Images 2000 software version 1.3.

**Active component groups identification.** The methodology described by Mareggiani *et al.* (1998) was used, which consisted on glass chromatoplates covered with 60 F<sub>254</sub> Camag silica gel of 20 x 20 cm. Aliquots of 10  $\mu$ L from the methanol extract were poured in with a glass capillary 3cm away from the lower edge of the chromatoplate; likewise, they were set at 3cm from each sample. Samples were chloroform eluded: ethyl acetate (95:5), chloroform: methanol (90:10), chloroform: methanol (80:20). Components mobility was observed under an ultraviolet light (Camag) at 254 and 366 nm wave longitude, respectively. The Liebermann-Burchard

Zeiss (100X) equipado con una cámara digital (Moticam 480) y con el uso del software Motic Images 2000 versión 1.3, se les determinó el diámetro.

**Identificación de los grupos de componentes activos.** Se utilizó la metodología descrita por Mareggiani *et al.* (1998), que consistió en el uso de cromatoplasmas de vidrio recubiertas con gel de sílice 60 F<sub>254</sub> Camag de 20 x 20 cm. Alícuotas de 10 µL del extracto metanólico se vertieron con un capilar de vidrio a tres cm del borde inferior de la cromatoplasma; así mismo, se dejaron tres cm de separación entre cada muestra. Las muestras se eluyeron con cloroformo:acetato de etilo (95:5), cloroformo:metanol (90:10), cloroformo:metanol (80:20). La movilidad de los componentes se observó bajo una lámpara de luz ultravioleta (Camag) a longitudes de onda de 254 y 366 nm, respectivamente. Para la detección de estructuras esteroideas y de glicósidos esteroideas y triterpénicos, se utilizó el método de Liebermann-Burchard (Stadtman, 1967); así como, el método de Mayer y Dragendorf, para la detección de alcaloides (Trease y Evans, 1987). Se utilizó el reactivo citrobórico para determinar la presencia de flavonoides.

**Diseño estadístico.** La evaluación para inhibición del crecimiento micelial y la inhibición de la esporulación se analizó mediante un diseño de 2 factores totalmente al azar: extracto, concentración. El factor extracto tuvo tres niveles: diclorometano, metanol y etanol; la concentración, cuatro niveles, 1, 2.5, 5 y 7.5%. En la evaluación de germinación de esporas se tuvieron los factores anteriores, pero el factor concentración tuvo tres niveles, 0, 5 y 7.5%. Los datos de cada experimento se analizaron mediante el paquete estadístico Minitab versión 14.0. Se llevaron a cabo análisis de varianza y de comparación múltiple de medias, estas últimas mediante pruebas de Tukey, para determinar diferencias entre tratamientos ( $p < 0.05$ ).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Inhibición del crecimiento micelial.** Según el modelo establecido en este ensayo, el análisis de varianza de los resultados para la inhibición de crecimiento radial de micelio, arroja diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) para los extractos y las concentraciones; así como, en su interacción doble. En los datos promedio de la inhibición del crecimiento micelial de *Rhizopus stolonifer* ocasionados por la exposición (24 h) a los extractos obtenidos de la semilla de *Swietenia humilis* (Cuadro 1 y 2), se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en las concentraciones de los extractos. La mayor inhibición del crecimiento micelial (51.0%) se observó en cultivos de *Rhizopus stolonifer* expuestos a las distintas concentraciones del extracto metanólico. El tratamiento del hongo con el extracto hidroalcohólico ocasionó una inhibición promedio de 24.8% y para el extracto diclorometánico 19.5% (Cuadro 1). El extracto metanólico aplicado a una concentración del 7.5% inhibió en un 70.3% el crecimiento micelial a las 24 h de exposición, donde se observó que la inhibición del crecimiento micelial es proporcional a la concentración del extracto metanólico utilizado (Cuadro 2). Los resultados obtenidos con el extracto metanólico a la concentración de 7.5% supera el 70% de

(Stadtman, 1967) methodology was used for steroidal, glycoside steroidal, and triterpenic structure identification, as well as the Mayer and Dragendorf method for alkaloid detection (Trease y Evans, 1987). The cytoboric reactive was used to determine flavonoids presence.

**Statistical design.** The evaluation for the inhibition of mycelia growth and sporulation was analyzed throughout the design of two factor complete randomly design: The extract factor revealed three levels: dichloromethane, methanol and ethanol; the concentration had four levels, 1, 2.5, 5 y 7.5%. These factors were also used for spore germination evaluation, but the concentration factor had three levels, 0, 5 y 7.5%. Data from each experiment were analyzed by the Minitab statistical package version 14.0. Analysis of Variance and multiple mean comparisons were performed, using the Tukey test to determine differences among treatments ( $p < 0.05$ ).

## RESULTS AND DISCUSSION

**Mycelia growth inhibition.** The results analysis of variance for the inhibition of the mycelia radial growth, in accordance with the model set for this essay, revealed significant differences ( $p < 0.05$ ), for both, extracts and concentrations, as well as in their double interaction. Significant differences ( $p < 0.05$ ) were also obtained in extract concentrations on the data concerning inhibition for the *Rhizopus stolonifer* mycelia growth caused by exposition (24 h) to the extracts obtained from *Swietenia humilis* seeds (Tables 1 and 2). The highest mycelia growth inhibition (51.0%) was observed on *Rhizopus stolonifer* crops exposed to the different concentrations of methanol extract. The fungi treatment with hydro-alcoholic extract caused a 24.8% average inhibition and a 19.5% average for the dichloromethane extract. The methanol extract applied to a 7.5% concentration inhibited 70.3% of the mycelia growth after a 24 h exposition, where it was observed that the inhibition of the mycelia growth is proportional to the extract concentration used (Table 2). Results obtained from the methanol extract at a 7.5 concentration level exceeded the 70% reported by Dooley (1978), which is acceptable in the biological effectiveness tests for any fungicide.

Cuadro 1. Inhibición del crecimiento micelial y esporulación de *Rhizopus stolonifer* por extractos de *Swietenia humilis*.

Table 1. Inhibition of *Rhizopus stolonifer* mycelia growth and sporulation by *Swietenia humilis*.

| Extractos       | Crecimiento Micelial (% Inhibición) | Esporulación (% Inhibición) |
|-----------------|-------------------------------------|-----------------------------|
| Hidroalcohólico | 24.8 c *                            | 95.7 a                      |
| Diclorometánico | 19.5 b                              | 88.3 b                      |
| Metanólico      | 51.0 a                              | 97.4 a                      |

\* Valores con distinta letra indican diferencia significativa entre los tratamientos (Tukey,  $p < 0.05$ ).

Cuadro 2. Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de *Rhizopus stolonifer* alas 24 h de incubación con los diferentes extractos crudos.

Table 2. Inhibition percentage of *Rhizopus stolonifer* mycelia growth after 24h incubation with different raw extracts.

| Extractos       | Concentración |        |        |        |
|-----------------|---------------|--------|--------|--------|
|                 | 1%            | 2.5%   | 5%     | 7.5%   |
| Hidroalcohólico | 13.8 a*       | 15.1 a | 6.2 b  | 7.1 b  |
| Diclorometánico | 1.3 b         | 1.3 b  | 4.0 b  | 8.0 b  |
| Metanólico      | 1.8 b         | 14.9 a | 44.6 a | 70.3 a |

Cuadro 3. Porcentaje de inhibición de la esporulación de *Rhizopus stolonifer* por el efecto de los extractos obtenidos de semilla de *Swietenia humilis*.

Table 3. Inhibition percentage of *Rhizopus stolonifer* sporulation by the effect delivered by the extracts obtained from *Swietenia humilis* seeds.

| Extracto        | Concentración (%) |        |         |         |
|-----------------|-------------------|--------|---------|---------|
|                 | 1.0               | 2.5    | 5.0     | 7.5     |
| Hidroalcohólico | 92.1 a*           | 96.7 a | 96.2 c  | 97.7 a  |
| Diclorometánico | 91.0 a            | 88.7 b | 90.5 b  | 85.8 b  |
| Metanólico      | 92.9 a            | 96.6 a | 100.0 a | 100.0 a |

\*Valores con distinta letra indican diferencia significativa entre los tratamientos (Tukey,  $p < 0.05$ ).

inhibición que Dooley (1978) reporta como aceptable en las pruebas de efectividad biológica para cualquier fungicida.

**Inhibición de la esporulación.** A las 24 horas de exposición, se presentaron valores promedio altos en la inhibición de estructuras de reproducción de *Rhizopus stolonifer* en todos los extractos y en las cuatro concentraciones evaluadas. El extracto metanólico mostró una inhibición proporcional a su concentración y la inhibición total de la esporulación se observó a partir de la concentración del 5 y 7.5% (Cuadro 3). Los extractos hidroalcohólico y diclorometánico mostraron variaciones en su comportamiento y no lograron inhibir completamente la formación de esporas, a pesar de presentar valores por arriba del 88% (Cuadro 3). El extracto metanólico de las semillas de *Swietenia humilis* contiene diversos limonoides conocidos como humilinoles (Segura-Correa *et al.*, 1993), a los que se les puede atribuir el efecto fungicida (esporocida). Esto debido a que limonoides con estructura similar obtenidos de las semillas de *Swietenia mahogany* (L.) Jacq. mostraron actividad antifúngica en la roya del cacahuate causada por el hongo *Puccinia arachidis* Speg. (Govindachari *et al.*, 1998).

**Efecto sobre estructuras vegetativas y germinativas.** La exposición de *Rhizopus stolonifer* a las distintas concentraciones de los extractos en estudio ocasionó alteraciones en sus estructuras vegetativas y germinativas en las cuales el efecto de los tres tipos de extractos presentaron diferente grado de efecto; dichas alteraciones se observaron con mayor intensidad cuando el hongo fue expuesto al extracto metanólico. Las alteraciones que se observaron en el hongo

**Sporulation inhibition.** High average values were revealed after a 24 h exposition in the inhibition of *Rhizopus stolonifer* reproduction structures in the three extracts and in the four concentrations under evaluation. The methanol extract revealed a proportional inhibition to its concentration, and the sporulation total inhibition was observed in at 5 and 7% concentration (Table 3). The hydro-alcoholic and dichloromethane extracts revealed behavioral variations and were unable to completely inhibit spores formation despite presenting values over 88% (Table 3). The *Swietenia humilis* seeds methanol extract contains several limonoids known as humillinoles (Segura-Correa *et al.*, 1993), to which the fungicide effect shall be attributed to (sporocide). This is possible by the fact that the limonoids with a similar structure obtained from *Swietenia mahogany* seeds (L.) Jacq., revealed anti-fungi activity in rust on peanut caused by *Puccinia arachidis* Speg. (Govindachari *et al.*, 1998).

**Effect over germinative and vegetative structures.** The *Rhizopus stolonifer* exposition to the different extract concentrations under study caused alterations in their vegetative and germinative structures, in which the effect derived from the exposition to the three types of extracts revealed a different level of effect. Such alterations were observed with a higher level of intensity when the fungi were exposed to methanol extract. The alterations observed in the *Rhizopus stolonifer* fungi were a decrease in size and sporangium color. Values from the treated samples which were appreciated through a microscope (Fig. 1), are not consistent with Schipper (1984) and Ribes *et al.* (2000) reports, which based the differences among *Rhizopus* genre species in both their dimensions and structural characteristics. They indicate that for *Rhizopus stolonifer*, the regular sporangium diameter differs from 250 to 300  $\mu\text{m}$ . Such data is consistent with the 275  $\mu\text{m}$  average diameter revealed by the witness treatment, whereas the developed sporangium in the methanol extract at 2.5%, decreased 1.5 times their dimensions, since their diameter was 110  $\mu\text{m}$ . The fungi exposition with methanol extract at 5% (Fig. 2) induced sexual spore formation known as zygosporangia. Agrios (2001) indicates that zygosporangia are only present in *Rhizopus stolonifer* when they face adverse conditions, which keep them from reproducing themselves in an asexual manner. Zygosporangia formation, from a fungi multiplication point of view, is more preferable than sporangium formation and their correspondent aplanospores (asexual spores), since within each sporangium 30,000 aplanospores are developed, while the zygosporangium developed only one zygosporangium (Le Bars-Bailly *et al.*, 1999). The structural alterations were more drastic (Fig. 3) when the methanol extract concentration increased. The fungi did not achieve an adequate zygosporangium or sporangium development (Fig. 3C) in the 7.5% concentration. Moreover, a sporangiophores branch was observed (Fig. 3A) which does not belong to a typical *Rhizopus* structure, in accordance to Schipper (1984) and Ribes *et al.* (2000), one to three branchless sporangiophores are developed by this genre from the rhizoid. Finally, some alterations were observed, such as sporangiophores cell wall disorganization, ends without closing with a vacuum of the

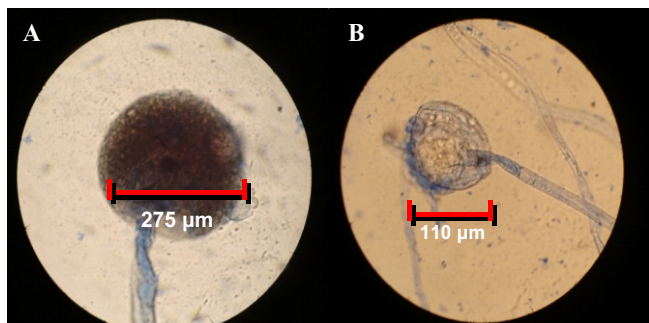


Fig.1. Tamaño y apariencia de esporangios de *Rhizopus stolonifer* expuestos al extracto metanólico de *Swietenia humilis*. A) Testigo (sin extracto); B) Con extracto metanólico al 2.5%.

Fig.1. Size and appearance of *Rhizopus stolonifer* sporangium exposed to *Swietenia humilis* methanol extract: A) control (without extract); B) with methanol extract at 2.5%.



Fig. 2. Zygospore (flecha) presente en *Rhizopus stolonifer* expuesto al extracto metanólico de *Swietenia humilis* al 5%.

Fig. 2. Zygospore (arrow) present in *Rhizopus stolonifer* exposed to *Swietenia humilis* methanol extract at 5%.

*Rhizopus stolonifer* fueron la disminución en el tamaño y color de los esporangios. Los valores de las muestras tratadas apreciados mediante el microscopio (Fig. 1), no coinciden con los reportados por Schipper (1984) y Ribes *et al.* (2000), quienes basan las diferencias entre especies del género *Rhizopus* en sus dimensiones y características estructurales. Ellos indican que para *Rhizopus stolonifer*, el diámetro normal de los esporangios varía entre 250 y 300 µm. Este dato coincide con los 275 µm de diámetro encontrados en promedio para el tratamiento testigo, mientras que los esporangios desarrollados en el extracto metanólico a 2.5% disminuyeron en 1.5 veces sus dimensiones, ya que el diámetro fue de 110 µm. Al exponerse el hongo con extracto metanólico al 5% (Fig. 2) indujo la formación de esporas sexuales conocidas como zigosporas. Agrios (2001) indica

closing with a vacuum of the cytoplasmic liquid (7.5% concentrations) (Fig. 3D), and a lack of pigmentation in the concentrations from 2.5 to 7.5% (Fig. 3B).

**Chemical components group identification.** The active components identification was performed in the methanol extract, since it was the only one to fulfill the mycelia inhibition expectations. Results derived from the characterization essays by specific reactions were positive for alkaloids and terpenoid glycosides. Crystal precipitates with intense orange, pale yellow and brown color were formed in the alkaloid compound characterization, confirming the alkaloid salts formation in the three reactions. The nicotine, as a witness, confirms these results. The characterization for the glycoside terpenoids revealed the pale cream color by the precipitate, as expected, showing the hydroxyl group dehydration in the position three of the terpenoids (Lenz del Rio, 1981).

The identification by a thin layer chromatography revealed an alkaloid group with 0.36 Rf. Such value is very close to the 0.37 reported by Payo *et al.* (2001), which belongs to an alkaloid with a similar structure to n-metil flindersina, an alkaloid present in the Meliaceae family. Furthermore, in line with Lenz del Rio (1981), according to the solvents utilized, this alkaloid group might belong to the oxygenated type, which are alcohol and chloroform soluble, among other solvents. Concerning the terpenoid group, they were found with a 0.87 Rf value. No Rf values reported were available for terpenoids similar to the terpenoids present in the *S. humilis* species. Nevertheless, their presence was indeed expected, because they have been widely reported in literature by Okorie and Taylor (1970); Segura-Correa *et al.* (1993), and Jiménez *et al.* (1997 and 1998). These compounds have been reported in methanol extracts, as well as, in trichloromethane, and they have an insecticide activity against *Ostrinia nubilalis* (Jiménez *et al.*, 1998).

## CONCLUSIONS

The methanol extract from *Swietenia humilis* seeds presented the highest antifungal activity compared to dichloromethane and hydro-alcoholic because it inhibited mycelia growth, sporulation, altered the formation of *Rhizopus stolonifer* reproductive structures, which are determinant for sporulation inhibition. They may even be held responsible for antifungal activity, in accordance with literature, with the demonstration of terpenoid presence. Consequently, *Swietenia humilis* seeds have metabolites with antifungal activity vs. *Rhizopus stolonifer*.

## LITERATURACITADA

- Agrios, G.N. 2001. Fitopatología. Ed. Limusa UTHEA. Noriega Editores. México, D.F. 838 p.
- Abdelgaleil, S.A., Hashinaga, F., and Nakatani, M. 2005. Antifungal activity of limonoids from *Khaya ivorensis*. Pest Management Science 61:186-190.
- Alexopoulos, C.J. y Mims, C.W. 1997. Introducción a la Micología. Ediciones Omega, S.A. Barcelona, España.

que las zigosporas sólo se presentan en *Rhizopus stolonifer* cuando se enfrenta a condiciones adversas que le impiden seguirse reproduciendo de manera asexual. Desde el punto de vista de multiplicación del hongo, la formación de zigosporas es preferible a la formación de esporangios y sus correspondientes aplanosporas (esporas asexuales), ya que en cada esporangio se desarrollan 30,000 aplanosporas, mientras que los zigosporangios sólo desarrollan una zigospora (Le Bars-Bailly *et al.*, 1999). Al aumentar la concentración del extracto metanólico, las alteraciones estructurales fueron más drásticas (Fig. 3). En la concentración al 7.5%, el hongo no logró desarrollar zigosporangios ni esporangios en forma adecuada (Fig. 3C). Además, se observó ramificación del esporangióforo (Fig. 3A), que no corresponde con la estructura típica de *Rhizopus*, ya que según Schipper (1984) y Ribes *et al.* (2000), este género desarrolla de uno a tres esporangióforos sin ramificación a partir del rizoide. Finalmente, también se observaron alteraciones como desorganización de la pared celular en los esporangióforos, puntas sin cerrar con vaciado de líquido citoplasmático (concentración del 7.5%) (Fig. 3D) y falta de pigmentación en las concentraciones del 2.5 al 7.5% (Fig. 3B).

**Identificación de grupos de componentes químicos.** La identificación de componentes activos se realizó en el

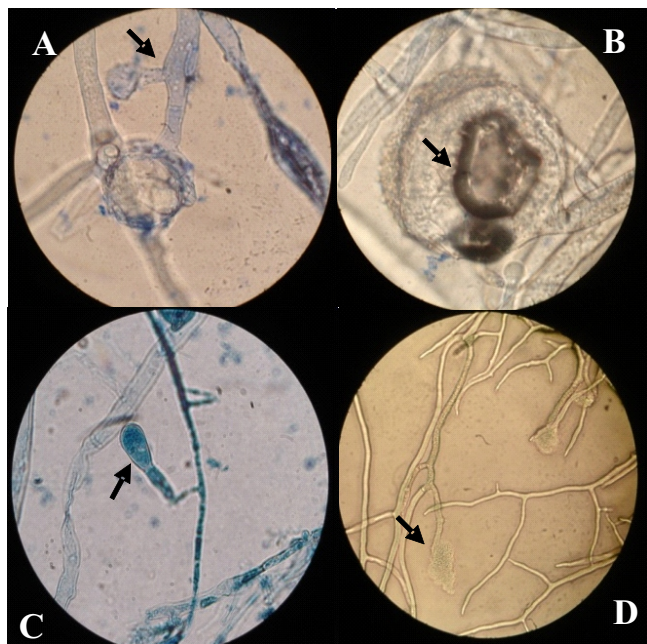


Fig. 3. Alteraciones producidas por el extracto metanólico de *Swietenia humilis* a la concentración de 7.5% sobre *Rhizopus stolonifer*. A) Ramificación del esporangióforo; B) Despigmentación; C) Esporangio sin desarrollar; D) Ruptura de pared del esporangióforo.

Fig. 3. Alterations produced by *Swietenia humilis* methanol extract at a 7.5% concentration over *Rhizopus stolonifer*. A) Sporangiophore branch; B) depigmentation; C) undeveloped sporangium; D) sporangiophore wall rupture.

638 p.

- Bautista-Baños, S., Hernández-López, M., Bosquez-Molina, E., and Wilson, C.L. 2003. Effects of chitosan and plant extracts on growth of *Colletotrichum gloeosporioides*, anthracnose levels and quality of papaya fruit. *Crop Protection* 22:1087-1092.
- Cáceres, A., Cabrera, O., Morales, O., Mollinedo, P., and Mendia, P. 1991. Pharmacological properties of *Moringa oleifera*. 1: Preliminary screening for antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology* 33:213-216.
- Dai, J., Yaylayan, V.A., Raghavan, G.S.V., and Pare, J.R. 1999. Extraction and colorimetric determination of azadirachtin-related limonoids in neem seed kernel. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47:3738-3742.
- Dooley, H.L. 1978. Greenhouse method for screening protective fungicides for apple powdery mildew. pp. 32-33. In: E.I. Zeher, G.W. Bird, K.D. Fisher, K.D. Hickey, F.H. Lewis, R.F. Line, and S.F. Rictcard (eds.). *Methods for Evaluating Plant Fungicides, Nematicides and Bactericides*. The American Psychopathological Society. St. Paul, Minnesota, USA. 140 p.
- Govindachari, G., Suresh, G., Gopalakrishnan, G., Banumathy, B., and Masilamani, S. 1998. Identification of antifungal compounds from the seed oil of *Azadirachta indica*. *Phytoparasitica* 26:1-8.
- Hahn, F. 2004. Spectral bandwidth effect on a *Rhizopus stolonifer* spores detector and its on-line behavior using red tomato fruit. *Canadian Biosystems Engineering* 46:49-54.
- Jasso de Rodríguez, D., Hernández-Castillo, D., Rodríguez-García, R., and Angulo-Sánchez, J.L. 2005. Antifungal activity *in vitro* of *Aloe vera* pulp and liquid fraction against plant pathogenic fungi. *Industrial Crops and Products* 21:81-87.
- Jiménez, A., Mata, R., Pereda-Miranda, R., Calderón, J., Isman, M.B., Nicol, R., and Arnason, J.T. 1997. Insecticidal limonoids from *Swietenia humilis* and *Cedrela salvadorensis*. *Journal of Chemical Ecology* 23:1225-1234.
- Jiménez, A., Villarreal, C., Toscano, R.A., Cook, M., Arnason, J.T., Bye, R., and Mata, R. 1998. Limonoids from *Swietenia humilis* and *Guarea grandiflora* (Meliaceae). *Phytochemistry* 49:1981-1988.
- Le Bars-Bailly, S., Bailly, J.D., and Brugère, H. 1999. Accidents de fabrication dus aux moisissures en fromagerie. *Revue Médecine Veterinaire* 150:413-430.
- Lenz-del-Río, A. 1981. Química orgánica elemental. Editorial Patria. 10a. edición, México. p 552.
- Mareggiani, G., Leicach, S. y Laner, P. 1998. Toxicidad de extractos que contienen metabolitos secundarios de distintos órganos de *Melia azedarach* L. al nematodo del nudo de la raíz. *Fitopatología* 33:122-126.
- Martínez, M. 1979. Catálogo de Nombres Vulgares y Científicos de Plantas Mexicanas. Fondo de Cultura Económica. México, D.F. 941 p.
- Misra, S.K., and Sahu, K.C. 1977. Screening of some indigenous plants for antifungal activity against

extracto metanólico, por ser el único que cumplió las expectativas de inhibición micelial. Los resultados de los ensayos de caracterización por reacciones específicas resultaron positivos para alcaloides y glucósidos terpenoides. En la caracterización de compuestos alcaloides se formaron precipitados de cristales con coloraciones de anaranjado intenso, amarillo pálido y marrón, confirmando la formación de sales de alcaloides en las tres reacciones. El alcaloide nicotina, como testigo, reafirmó los resultados. Para el caso de glucósidos terpenoides, la caracterización mostró el precipitado color crema pálido esperado, que muestra la deshidratación de grupos hidróxilo en posición tres de los terpenoides (Lenz del Río, 1981). La identificación por cromatografía en capa fina mostró un grupo de alcaloides con Rf de 0.36. Este valor es muy cercano al de 0.37 reportado por Payo *et al.* (2001), que corresponde a un alcaloide cuya estructura es similar a la de n-metil flindersina, un alcaloide presente en la familia Meliaceae. Además, según Lenz del Río (1981), de acuerdo a los solventes empleados, este grupo de alcaloides podrían corresponder a los de tipos oxigenados, que son solubles en alcoholes y cloroformo, entre otros solventes. Respecto al grupo de terpenoides, estos se encontraron a un valor de Rf de 0.87. No se encontraron reportes de valores Rf para terpenoides similares a los presentes en la especie *S. humilis*. Sin embargo, se esperaba la presencia de ellos debido que ya están ampliamente reportados en la literatura por Okorie y Taylor (1970); Segura-Correa *et al.* (1993) y Jiménez *et al.* (1997 y 1998). Estos compuestos se reportan tanto en extractos metanólicos como en triclorometánicos y poseen actividad insecticida contra *Ostrinia nubilalis* (Jiménez *et al.*, 1998).

## CONCLUSIONES

El extracto metanólico de la semilla de *Swietenia humilis* presentó la mayor actividad antifúngica en comparación con el extracto diclorometánico e hidroalcohólico. Esto se debió a que inhibió el crecimiento micelial, la esporulación y alteró la formación de las estructuras reproductivas de *Rhizopus stolonifer*, determinante para la inhibición de la esporulación. De acuerdo a la revisión de literatura y a la demostración de la presencia de terpenoides, estos podrían ser los responsables de la actividad antifúngica. Por lo tanto, las semillas de *Swietenia humilis* contienen metabolitos con actividad antifúngica contra *Rhizopus stolonifer*.

**Agradecimientos.** Al personal de los laboratorios de Toxicología y Fitopatología del CIAD-Unidad Culiacán: Yadira López-Pantoja e Isidro Márquez-Zequera por su apoyo en los procesos de extracción y pruebas biológicas; al CECyT y CONACyT por su apoyo económico.

- dermatophytes. Indian Journal of Pharmacology 9:269-272.
- Müller, U. 2002. Chemical crop protection research. Methods and challenges. Pure Applied Chemistry 74:2241-2246.
- Niembro-Rocas, A. 1990. Árboles y Arbustos Útiles de México. Editorial Limusa, México D.F. pp. 172-173.
- Okorie, D.A., and Taylor, D.A.H. 1970. Meliaceae. Limonoids from *Swietenia humilis*. Phytochemistry 10:469-470.
- Payo, H.A., Sandoval, L.D., Vélez, C.H. y Oquendo, M. 2001. Alcaloides en la especie cubana *Croton micradenus* Urb. Revista Cubana Farmacéutica 35:61-5.
- Pennington, T.D. 1981. A monograph of the neotropical Meliaceae. Flora Neotropica. Monograph No. 28. New York. The New York Botanical Gardens, USA, N.Y. 206 p.
- Qing, F., and Shiping, T. 2000. Postharvest biological control of *Rhizopus* rot of nectarine fruits by *Pichia membranefaciens*. Plant Disease 84:1212-1216.
- Reddy, M.V.B., Angers, P., Gosselin, A., and Arul, J. 1998. Characterization and use of essential oil from *Thymus vulgaris* against *Botrytis cinerea* and *Rhizopus stolonifer* in strawberry fruits. Phytochemistry 47:1515-1520.
- Ribes, J.A., Vanover, S.C.L., and Baker, D.J. 2000. Zygomycetes in human disease. Clinical Microbiology Reviews 13:236-301.
- Roy, A., and Saraf, S. 2006. Limonoids: Overview of significant bioactive triterpenes distributed in plant kingdom. Biological and Pharmaceutical Bulletin 29:191-201.
- Segura-Correa, R., Mata, R., Anaya, A.L., Hernández-Bautista, B., Villena, R., Soriano-García, M., Bye, R., and Linares, E. 1993. New tetratanortriterpenoids from *Swietenia humilis*. Journal of Natural Products 56:1567-1574.
- Schipper, A.A. 1984. A revision of the genus *Rhizopus*. I. The *Rhizopus stolonifer* group and *Rhizopus oryzae*. Studies in Mycology 25:1-19.
- Standley, P.C. (1920-1926). Trees and Shrubs of México. United States National Herbarium. Washington, D.C., USA. 560 p.
- Stadtman, T.C. 1957. Preparation and assay of cholesterol and ergosterol. Methods Enzymology 3:392-394.
- Trease, G.E., and Evans, W.C. 1987. Alcaloides. pp. 559-652. En: Tratados de Farmacognosia. 1a Edición. Editorial Interamericana. México D.F. 561 p.
- Vallejo-Cohen, S., Martínez-Téllez, M.A., and Vargas-Arispuro, I.C. 1999. Evaluación *in vitro* del efecto de extractos vegetales sobre el desarrollo micelial de *Tilletia indica*, agente causal del carbón parcial en trigo. Revista Mexicana de Fitopatología 17:128-130.