

ALELOPATÍA Y SUSTANCIAS BIOACTIVAS

Efecto de los extractos de hojas y flores de *Wedelia trilobata* L. en el control de *Alternaria solani* (E&M) J. & G. y *Alternaria porri* Ell. y Cif. en condiciones *in vitro*

Effect of leaf and flower extracts from *Wedelia trilobata* L. *in vitro* control of *Alternaria solani* (E&M) J. & G. and *Alternaria porri* Ell.

Yoannia G. Pupo Blanco¹, Lidcay Herrera Isla², Belyanis Vargas Batis¹, Yaidelín Marrero Aliaga¹, Raquel Arévalo Arévalo³ y María C. Jiménez Arteaga¹

(1) Universidad de Granma, provincia de Granma.

(2) Centro de Estudios de Alelopatía. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, Santa Clara, Villa Clara.

(3) Laboratorio Provincial de Sanidad Vegetal, provincia de Granma.

E-mail: yonni@udg.co.cu

RESUMEN. Debido a que la calidad y volumen de producción de los cultivos hortícolas se ven severamente afectados por diferentes hongos, la utilización de productos fitosanitarios constituye una necesidad. Dentro del manejo integrado de plagas, la utilización de productos de origen botánico con propiedades biocidas resulta un instrumento tecnológico importante a tener en cuenta. En este trabajo se evaluó el efecto de extractos crudos de hojas y flores de *Wedelia trilobata* L. en el crecimiento y esporulación de los hongos *Alternaria solani* (Ell y Mart) y *Alternaria porri* (Ell y Cif). Se emplearon diferentes dosis de los extractos y como método de bioensayo se utilizó la dilución en agar. El experimento fue montado mediante un diseño completamente aleatorizado. Ambos extractos inhibieron el crecimiento y disminuyeron la esporulación de los hongos evaluados con diferencias altamente significativas lo que permite concluir que poseen propiedades antifúngicas promisorias. El tamizaje fitoquímico reveló la presencia de alcaloides, saponinas, taninos, estructuras triperpénicas, entre otros. Se recomienda para el estudio de nuevos extractos crudos el empleo de dosis superiores a 1g L⁻¹ para esta primera fase *in vitro*.

Palabras clave: Actividad antifúngica, *Alternaria porri*, *Alternaria solani*, *Wedelia trilobata*.

ABSTRACT. The use of plant protection products in the agriculture is a necessity because the losses caused by many pathogens; nevertheless, continuous use of synthetic pesticides of wide spectrum rebounds negatively in the environment so; the biological methods, and the employment of vegetable extracts play an important roll inside the ecological handling of plagues. In this work was carried out a study to evaluate the effect of extracts prepared at different doses from leaves and flowers of *Wedelia trilobata* L. against the fungi *Alternaria solani* (Ell and Mart) and *Alternaria porri* (Ell and Cif). The experiments were arranged in a totally randomized design and, the bioassay method was agar dilution. All the extracts inhibited the growth and they diminished the esporulation of the fungi evaluated with highly significant differences so; it allows concluding that they possess promissory antifungal properties. Phytochemical study showed the presence of alkaloids, saponins; tannins, triterpenic structures, and so on. It is recommended for the study of new extracts that superior dose is used 1 g.L⁻¹ for the first phase *in vitro*.

Key words: Antifungal activity, *Alternaria porri*, *Alternaria solani*, *Wedelia trilobata*.

INTRODUCCIÓN

La lucha contra los organismos nocivos es necesaria y por ello es importante desarrollar tecnologías apropiadas para regularla (Gomero, 2000). En el

control de las enfermedades foliares de hortalizas los medios culturales resultan mucho menos eficaces en comparación con los hongos del suelo (Belda y Lastres, 2006). El principal medio de lucha es, pues, la utilización de productos químicos que sean activos

contra los agentes causantes de enfermedades. (MINAGRI, 2002)

En la naturaleza las plantas han desarrollado interacciones que pueden ser muy ventajosas, algunas de ellas incluidas ya en el manejo de plagas, como es el caso de productos biocidas de origen botánico (Vázquez, 2003). Según Villalobos (1996) los compuestos naturales pueden servir como base para el desarrollo de nuevos productos fitosanitarios más selectivos y menos contaminantes.

La familia Asteraceae comprende cerca de 25 000 especies distribuidas en aproximadamente 1100 géneros. Esta familia aparece reportada en un gran número de referencias como poseedora de propiedades medicinales (Carvalho *et al.*, 2001). El género *Wedelia*, dentro de esta familia, consta de 65 especies aproximadamente, distribuidas en el trópico y regiones de temperaturas cálidas (Sohel *et al.*, 2003). La especie *Wedelia trilobata*, según Csurhes y Edwards (1998), crece en áreas abiertas con el suelo bien drenado y húmedo. Esta planta se ha utilizado tradicionalmente para tratar hepatitis, la indigestión e infecciones (Hernández, 2006). Informa Ferreira (2001) que en especies del género *Wedelia* se ha verificado actividad antibiótica e insecticida. Según encuestas realizadas por los autores en la ciudad de Bayamo, es una especie ornamental muy apreciada por los jardineros pues evita en gran medida la presencia de malezas.

Teniendo en cuenta la riqueza de sustancias bioactivas que poseen muchas de las especies de la familia *Asteraceae*, en este trabajo se evalúa el efecto de los extractos de hojas y flores de *W. trilobata* en el control *in vitro* de *Alternaria solani* (Ell y Mart) y *Alternaria porri* (Ell y Cif) y se realizan ensayos cualitativos para determinar la presencia de diferentes metabolitos en los extractos.

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se realizó en el período comprendido de enero a julio de 2006. El material vegetal fue colectado en horas de la mañana en los alrededores de la Universidad de Granma, Bayamo. Se herborizaron tres ejemplares, los cuales fueron depositados en la

colección del laboratorio de Botánica de este centro de estudios. El secado de las hojas se efectuó en estufa a 35 °C, luego se molió de forma manual y se tamizó el tamaño de las partículas a 2,5 mm. El extracto se obtuvo por el método de percolación con etanol al 70 % durante siete días; la eliminación del solvente se realizó por rotoevaporación a 40 °C y 150 rpm.

Se obtuvieron cultivos monospóricos a partir de los siguientes materiales colectados en el organopónico Hogar de ancianos de la ciudad de Bayamo: *A. solani* de *Lycopersicum esculentum* L. var. Vita y *A. porri* de *Allium cepa* L. var Yellow Granex. El método de bioensayo fue el de dilución en agar (Rahmann *et al.*, 2001). Los tratamientos consistieron en la utilización de tres dosis del extracto: 0,1; 0,3 y 0,5 g.L⁻¹ para el extracto de hojas y 1, 2, 3 g.L⁻¹ para el extracto de flores de la planta. En las tablas de resultados se presentan como dosis 1, 2 y 3, respectivamente. Se empleó un control positivo (Zineb, 0,1 g.L⁻¹) y un control negativo (medio de cultivo sin productos). La solución madre de cada extracto se esterilizó por filtración a través de filtro bacteriológico de membrana, de tamaño de poro de 0,1 µ. El medio PDA, luego de ser ajustado su pH a 5,4 fue esterilizado en autoclave a 121 °C y 1,2 atmósferas durante 20 minutos. En el flujo laminar se le adicionaron las alícuotas correspondientes del extracto para obtener las disoluciones deseadas ajustadas a un volumen final de 50 mL, el cual fue vertido a razón de 10 mL por placa.

Los bioensayos se montaron sobre un diseño completamente aleatorizado. Se utilizaron discos de 5 mm de diámetro obtenidos del cultivo del hongo crecido en placas con 7 días de edad. Cada 24 horas, durante 7 días, se realizó la medición del crecimiento en diámetro del micelio con un pie de rey.

Se calculó el porcentaje de inhibición micelial mediante la fórmula siguiente:

$$\text{Inhibición micelial (\%)} = [(dc - dt)/dc] \times 100$$

donde:

dc = diámetro del micelio del control

dt = diámetro del micelio del tratamiento

Se realizó un análisis de varianza de clasificación

simple con el Programa Statistica versión 5 del año 1997. Los datos en las tablas se expresan como la media $\pm$ desviación estándar de la media. Se consideraron diferencias significativas para $\alpha < 0,05$ y altamente significativas para $\alpha < 0,01$. Como prueba de comparación de medias se emplea el Método de Scheffé. Los gráficos se realizaron con el programa Excel del Office de Windows 2000.

La esporulación se midió a los 8 días mediante cámara de Neubauer (Neubauer hemocytometer (Boeco)) bajo el microscopio. Por cada placa se tomaron discos del centro, medio y periferia de la colonia y se determinó la media. Luego se calculó el estimado de esporas mediante la fórmula:

$$\text{Esporas} = K \times N \times D$$

Siendo:

K: constante de la cámara utilizada ($= 6,3 \times 10^4$),

N: media de la cantidad de esporas contadas y

D: dilución empleada.

Se realizó tamizaje fitoquímico según Richard y Cannell (1998) y Peña *et al.* (2002). Se utilizó la simbología descrita por el último para referir los resultados.

El pH fue medido en Microprocesador pH meter Hanna pH-211 y el índice de refracción en un

refractómetro AB. Se realizó, además, un análisis físico de los extractos para describir sus características más representativas en cuanto a color, olor y sabor.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la tabla 1 se aprecia que con el fungicida comercial empleado se obtuvo el 100 % de inhibición del crecimiento de *A. porri*, pero una baja efectividad del producto frente a *A. solani*. Mesiaen y Lafon (1967) señalan que este hongo es muy resistente a los fungicidas y dentro de estos, los que ofrecen mejores resultados en su control son los ditiocarbamatos. En cada columna se observa que existen diferencias altamente significativas entre todos los tratamientos, lo que indica que de forma general con cada dosis se obtiene una respuesta diferente que a su vez difiere de los resultados obtenidos con el fungicida comercial. Se evidencia además como regularidad que con el incremento de la dosis del extracto se obtienen porcentajes de inhibición superiores. No obstante, sólo con el extracto de flores de la planta frente al hongo *A. porri* se obtiene un porcentaje de inhibición superior al 50 %. Rivera *et al.* (2004), al probar diferentes extractos vegetales contra *Alternaria* sp. y *Fusarium* sp., también encontraron que la capacidad de inhibición de los mismos se incrementaba con el aumento de las dosis.

Tabla 1. Efecto del extracto de hojas de *W. trilobata* en el crecimiento de los hongos al séptimo día. Significación ($\alpha < 0,01$)

Tratamientos	Extracto de hojas Inhibición (Media $\pm$ S)		Extracto de flores Inhibición (Media $\pm$ S)	
	<i>A. porri</i>	<i>A. solani</i>	<i>A. porri</i>	<i>A. solani</i>
F. Comercial	100 $\pm$ 0,0 a	27,4 $\pm$ 0,54 b	100 $\pm$ 0 a	27,4 $\pm$ 0,54 d
Dosis 1	3,82 $\pm$ 1,1 d	0,00 $\pm$ 0,00 c	26 $\pm$ 2,23 c	39,6 $\pm$ 0,54 c
Dosis 2	20,2 $\pm$ 1,3 c	25,6 $\pm$ 1,67 b	39,8 $\pm$ 1,78 b	47,8 $\pm$ 1,64 b
Dosis 3	25,1 $\pm$ 1,0 b	35,8 $\pm$ 2,86 a	43,2 $\pm$ 3,7 b	58,2 $\pm$ 0,44 a
ES	0,24	0,67	0,92	0,41

El crecimiento de los hongos frente a los extractos durante el período evaluado no fue constante. En la tabla 2 se aprecia que *A. porri* cuando crece en un medio libre de factores limitantes adquiere la mayor velocidad de crecimiento durante los tres primeros días,

disminuyendo luego de forma progresiva esta variable en relación directa con la disminución de los recursos disponibles del medio y el espacio para el crecimiento Sin embargo, frente al extracto de hojas de *W. trilobata* resulta inestable la respuesta, lo que puede deberse a

al estar a baja concentración permiten que el hongo pueda adaptarse y recuperar su capacidad de crecer.

Tabla 2. Velocidad de crecimiento (*Alternaria porri*)

Tratamientos	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7
Control	3,4	4,7	4,8	3,2	2,08	1,83	0,97
Fungicida. Com.	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Dosis 1(ext. hojas)	2,0	6,1	3,0	2,85	2,09	2,33	0,80
Dosis 2(ext. hojas)	0,8	5,1	1,26	1,8	2,52	1,9	1,05
Dosis 3(ext. hojas)	0,5	3,8	2,33	1,75	1,84	1,23	1,54

También en *Alternaria solani* resulta muy activo el crecimiento en todos los tratamientos durante los primeros tres días sin diferencias apreciables entre ellos como muestra la Figura 1. La inhibición del crecimiento frente al extracto de hojas (solo en las dosis 2 y 3) y el fungicida comercial se hace patente entre el cuarto y sexto días. Al séptimo día se observa una ligera tendencia del hongo a incrementar nuevamente el crecimiento, lo cual pudiera estar relacionado con la pérdida de efectividad de las sustancias inhibitorias en función del tiempo o con la capacidad adaptativa del hongo.

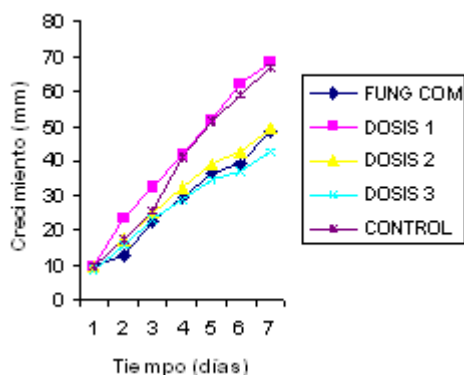


Figura 1. Dinámica de crecimiento de *Alternaria solani* vs Extracto de hojas

Resultados similares a los mostrados obtuvieron Alcalá *et al.* (2005) al ensayar varios extractos vegetales y fungicidas sintéticos *in vitro* contra *Sclerotium rolfsii*. El autor destaca que los extractos probados habían inhibido el crecimiento o lo habían retrasado. Sin embargo, señala que la inhibición del crecimiento del hongo había sido muy variable en el tiempo reduciéndose con el incremento del período

de incubación la capacidad inhibitoria de los extractos, lo cual podría sugerir la necesidad de aumentar las concentraciones a fin de prolongar su efecto. También este autor refiere que se evidenció un crecimiento aún mayor que el testigo, cuando el extracto disminuía su capacidad inhibitoria. Se desea destacar que Alcalá *et al.* (2005) consideran a 5 g.L⁻¹, una dosis baja; la cual resulta extremadamente superior a las empleadas de este extracto, (0,1; 0,3 y 0,5 g.L⁻¹) lo

cual refuerza la idea de que el mismo mostró resultados promisorios. Según López (2004) uno de los problemas principales que se encuentra en la producción de metabolitos para la obtención de nuevos compuestos es precisamente la baja concentración a la que se encuentran los mismos en las células y que su síntesis se realiza en estructuras especializadas de la planta.

El crecimiento de *A. porri* frente al extracto de flores de la planta (figura 2) es limitado, con valores que fluctúan entre el 30 % y el 47 % por las diferentes dosis del extracto durante los tres primeros días y luego se mantiene estable alrededor de estos números con una tendencia al decrecimiento hacia el séptimo día. Una respuesta similar se obtiene con *A. solani* (figura 3) donde se observa un incremento en el poder de inhibición del extracto que alcanza valores máximos al quinto día con una tendencia posterior al decrecimiento al séptimo día.

Stauffer *et al.* (2000) obtienen una disminución del diámetro de la colonia de especies del género *Alternaria* de unos 20mm (similares a los obtenidos en este experimento) con extracto de cebolla; los mismos fueron preparados a una concentración del 50 % en masa (150 g del vegetal en 300 ml de solvente). Resulta interesante destacar como la dosis 2, para el caso de *A. solani*, se comportó similar al fungicida comercial y la dosis fue superior a este. Resultados similares han sido informados por otros autores. Bonilla *et al.* (1993), citado por Mesén (2005), reporta que el extracto de *Equisetum giganteum* es capaz de mostrar un control efectivo del tizón tardío de la papa con un porcentaje final de 55 % a diferencia del control (fungicida comercial) que fue de un 40 %

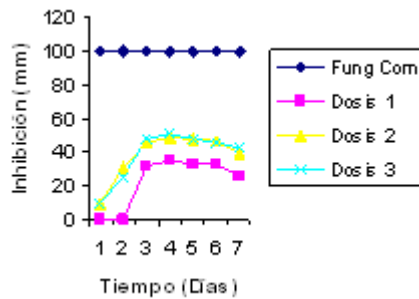


Figura 2. Dinámica de inhibición del hongo *A. porri* vs. extracto de flores

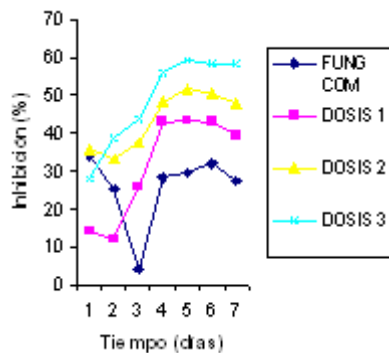


Figura 3. Dinámica de inhibición del hongo *A. solani* vs. extracto de flores

La esporulación de *A. porri* frente a las diferentes dosis del extracto de hojas se comporta en un rango comprendido entre $1,1 \times 10^4$ y $2,14 \times 10^4$ siendo menores donde en el control que fue de $3,3 \times 10^4$. En el fungicida comercial no se observó presencia de esporas, lo cual guarda relación con la limitación del crecimiento, que en este tratamiento tuvo la máxima expresión. Con este mismo extracto la esporulación de *A. solani* en el control ($4,7 \times 10^3$) resulta alrededor de tres veces superior a la reportada en los tratamientos: $0,99 \times 10^3$ (fungicida comercial) y $0,15$; $0,15$ y $0,13 \times 10^3$ (dosis 1, 2 y 3, respectivamente).

La respuesta de la esporulación de los hongos frente al extracto de flores de *W. trilobata* fue como sigue: En *A. porri* se observó una media de $1,1 \times 10^4$ en todas las dosis, siendo este valor tres veces menor que el observado en el control ($3,3 \times 10^4$). La media de esporulación en el control de *A. solani* fue $4,7 \times 10^3$ mientras que en los tratamientos fue: $0,99 \times 10^3$ (fungicida comercial) y $0,11$; $0,21$ y $0,11 \times 10^3$ (dosis 1, 2 y 3, respectivamente). Estos resulta-

dos indican que este extracto posee la propiedad de disminuir la producción de inóculo del hongo. Hernández (1982) señala que la tasa de esporulación es el factor más importante de un hongo para su disseminación.

Para ambos hongos el zineb se comporta como un buen agente de control, citado por Huerres y Caraballo (1996). También este resultado reafirma lo señalado por Benloch (1983) acerca de que en la acción protectora de los fungicidas químicos se encuentra su poder para impedir la esporulación del parásito, matar sus elementos reproductivos (esporas y otros), matar la totalidad de sus órganos o inhibir su desarrollo.

El extracto de flores de *Wedelia trilobata* fue preparado a una concentración mayor que el de hojas; con el mismo se obtuvieron porcentajes de inhibición superiores tanto para el crecimiento como para la esporulación. Aguayo (2002) plantea que es muy común que las mayores concentraciones de metabolitos secundarios se encuentren en flores y semillas. También el hecho de haber sido preparado a una dosis mayor (entre 1 y 3 g L^{-1}) refuerza lo obtenido por Miño *et al.* (2001) los cuales, realizando un screening *in vitro* de actividad antimicótica de los extractos etanólicos de 25 plantas, encontraron que las dosis efectivas se localizaban a partir de una concentración de 1 g L^{-1} .

El extracto de hojas de *Wedelia trilobata* presenta un color verde olivo bien oscuro manteniendo esta propiedad al observarlo a trasluz. Tiene un olor penetrante, muy fuerte; posee un sabor amargo, desagradable, que persiste en el paladar.

El extracto de flores de la planta presenta un color carmelita fuerte, puesto a trasluz es un líquido transparente; posee un olor fuerte también muy penetrante. El sabor es amargo (mucho menos que el de hojas) e igualmente desagradable el cual persiste en el paladar durante varios minutos.

Los resultados del tamizaje fitoquímico mostrados en la tabla 4 coinciden con los reportados por Nguyen *et al.* (1998); Navaes *et al.* (2001); Apers *et al.* (2002) y Sartori *et al.* (2003) quienes informan en estas plantas estructuras triterpénicas, esteroides, glúcidos y algunos compuestos grasos,

respectivamente. Otras plantas de este género han sido estudiadas. En *W. calendulacea*, *W. paludosa* y *W. chinese*, se han reportado flavonoides, ácidos norwedélico, wedelolactano, norwedelolactano, saponinas citotóxicas, diterpenos caurénicos, eudesmanoloides, esteroides, triterpenos, ácidos caurénicos, labdano, cauronolabdano,

labdano sesquiterpénicos, ácido luteolínico, estigmaterol, glucósido de estigmaterol, sistosterol, ésteres y compuestos glicosídicos. (Sohel *et al.*, 2003; Michalak, 1997; Carvalho *et al.*, 2001; Cechinel *et al.*, 2004; Vieira *et al.*, 2001; Bresciani, 2000 y Hung, 2000).

Tabla 3. Tamizaje fitoquímico

	<i>Wedelia trilobata</i>	
Compuestos	Hojas	Flores
Resinas	-	-
Alcaloides (Wagner)	+++	++
Alcaloides (Mayer)	+++	++
Saponinas	+	-
Fenoles y/o Taninos	Taninos pirogalotánicos	Taninos pirogalotánicos
Quinonas	-	+
Triterpenos y/o Esteroides	Estructuras triterpénicas	Estructuras triterpénicas
Flavonoides	+	+
Cumarinas	++	++
Aminoácidos Libres	-	-
Azúcares Reductores	+	++
Compuestos Grasos	+	+
pH	5.74	5.41
IR	1.324	1.326

CONCLUSIONES

1. Se obtuvo un incremento de la inhibición del crecimiento micelial de *A. porri* y *A. solani* con el incremento de las dosis de los extractos de hojas y flores de *W. trilobata*.
2. La respuesta de los hongos frente a ambos extractos no fue estable observándose una tendencia a disminuir el efecto inhibitorio de los extractos con el tiempo de incubación.
3. Los extractos evaluados mostraron capacidad para disminuir la esporulación de *A. solani* y *A. porri* en condiciones *in vitro*.
4. La composición química de los extractos de hojas y flores de la planta fue similar excepto por la presencia de quinonas en el extracto de flores y de saponinas en el extracto de hojas, metabolitos ausentes, respectivamente, en el otro extracto.

RECOMENDACIONES

1. Evaluar el efecto del extracto de hojas de *Wedelia trilobata* frente a *A. solani* y *A. porri* a dosis superiores a 1g.L^{-1} .
2. Evaluar el potencial antifúngico de otros órganos de la planta.

BIBLIOGRAFÍA

1. AGUAYO, S.: Insecticidas Vegetales, Facultad de Agronomía, Universidad de Concepción, en <http://www.udec.cl>, 2002.
2. ALCALÁ, D.; N. VARGAS Y A. PIRE: "Efectos de extractos vegetales y fungicidas sintéticos sobre el crecimiento micelial *in vitro* de *Sclerotium rolfsii*". *Revista de la Facultad de Agro-nomía* (Luz). (22): 315-323, en: <http://www.revfacagrmluz.org.ve>.
3. APERS, S.; Y. HUNG; S. VANMIERT; R. DOMMISSE, ET

- AL.: "Characterisation of new Oligoglyco-sidic compounds in two Chinese medicinal herbs". *Phytochemical Analysis* 13: 202-206, 2002.
4. BELDA, J. E. Y J. LASTRES: Reglamento específico de producción integrada de tomate bajo abrigo. Resumen de aspectos importantes, en: <http://www.agroinformacion.com>, 2006.
5. BENLLOCH, M.: "Técnicas histológica y microbiológicas. Principios de protección de plantas". *Patología Vegetal Agrícola*, 1983.
6. BRESCIANI, L. F. V.; V. CECHINEL AND R. A. YUNES: *Natural Products Letters*. (14): 247-254, 2000.
7. CARVALHO, G. J. A.; M. G. CARVALHO; D. T. FERREIRA; T. J. FARIA E R. BROZ -FILHO: "Diterpenos, Triterpenos y Esteroides Das flores de Wedelia paludosa". *Quim. Nova* 24(1): 20, 2001.
8. CECHINEL, C.; L. C. BLOCK; R. YUNES AND F. DELLE: "Paludolactona: A new Eudesmanoloides Lactones from *Wedelia paludosa*; da (*Acmela brasiliensis*)". *Natural Product Research*. 18(5):447-451, 2004.
9. CSURCHES, S. AND R. EDUARDO: Potential environmental weeds in Australia: candidate species for preventative control. Queensland Department of Natural Sources, p.201, 1998.
10. FERREIRA, D. F.; T. FARIAS Y R. BENZ. *Química Nova*. 24(1):24-26, 2003.
11. GOMERO, L. O.: "Plantas que protegen a otras plantas. Una alternativa a los cultivos GM resistentes a plagas", *Rev. Lisa*. marzo, 2002.
12. HERNÁNDEZ, M. M.: "Una técnica simple para lograr abundante fructificación del hongo *Stemphylium solani* Webs", *Cultivos Tropicales*, 4(4): 603-608, 1982. <http://www.hear.org/pier/wra/pacific/wedelia-trilobata.htm>, 2006.
13. HUERRES, C Y N. CARABALLO: *Horticultura*. Capítulo No. 1, Editorial Pueblo y Educación, La Habana, 1996.
14. HUNG, Y.: Biologically active Compound from plant used international Chinese Medicine: *Wedelia chinese* (obs.) Merr (Asteraceae) *Pieria Fell-terre* Lour (Scrophulariaceae) *Kilinga brebifolia* Rottb (Cyperaceae). PhD Thesis, University of Antwerp, 2000.
15. LÓPEZ, C. E. Y M. I. PADILLA: Producción de metabolitos secundarios. CSIC. Estación experimental la Mayora (Málaga), en: <http://www.encuentros.uma.es>, 2005.
16. MESÉN, R.: Manejo integrado del Tizón tardío (*Phytophthora infestan*) con extractos naturales y fungicidas químicos en el cultivo de la papa en tierra blanca de Cátago. MINAGRI. ASA. I Congreso de Agricultura Conservacionista, en: <http://www.potato.org>, 2005.
17. MESSIAEN, C. M Y R.. LAFON: *Enfermedades de las hortalizas*, 361 pp., Ediciones Vilssar de Mar, Barcelona, España, 1967.
18. MICHALAK, E.: *Apuntamento fitoterapeutico da Irma Eva Michalak*. 60 pp., Ed EPAGRI, Florinapolis, Brasil, 1997.
19. MINAGRI. CENSAV. CENTRO NACIONAL DE SANIDAD VEGETAL. Programa de Defensa fitosanitaria para hortalizas. Tomate, Pimiento, Col, Ajo y Cebolla. Departamento de Programa de Defensa, 2002.
20. MIÑO, C. P.; P. X. CHIRIBOGA Y R. G. MORENO: "Acti-vidad biológica en plantas medicinales amazónicas". *Revista Mexicana de Fitopatología*. Vol. 19, en: <http://www.sociedad.tripo.com> Facultad de Química. Universidad Central de Ecuador, 2001.
21. NAVAES, A. P.; C. ROSSI; C. POFTE and E. PHEN JUNIOR: *Therapie*. (56): 430-527, 2001.
22. NGUYEN, N. S.; DO N. T. NGUYEN; K. P. P. NGUYEN AND C. H. NGUYEN: *Top Chi Hoa*. (36): 87, 93, 1998.
23. PEÑA, A; J. RAMÍREZ Y L. R. CHÁVEZ: Algunas consideraciones sobre el empleo de productos naturales en la medicina natural. Monografía. Universidad de Granma, Bayamo, M.N, 2002.
24. RAHMAN, A.; M. I. CHOUDHARY AND W. J. THOMSON: *Bioassay Techniques for Drug Development*. pp.14-25, Harwood Academic Publisher is an imprint of the Gordon and Breech Publishing Group, 2001.
25. RICHARD, J Y P. CANNEL: *National products isolation*. Edit. Humana Press, Titonia, New Jersey.
26. RIVERA, M.; I. HECHEVERRÍA; C. CARVALLO Y M. REYES: "Posibilidades de control de enfermedades a partir de productos naturales y controles biológicos en las plantas medicinales", *Rev. Cubana de Plantas Medicinales* 9(3), 2008.

27.SARTORI, M. R. K.; J. B. PETTO; A. B. CRUZ; ET AL.: *Pharmazie*. 58: 576-578, 2003.

28.SOHEL, H. M.; R. CHOWDHUNY; A. K. N. MOTTAKIN; C. M. HASAN, ET AL.: "Kauren diterpenes from *Wedelia caledulaceae*". *Biochenical Sistematies and Ecology*. (31): 539-540, 2003.

29.STAUFFER, A.; F. A. ORREGO Y A. AQUINO: Selección de extractos vegetales con efectos bactericidas y/o fungicidas. Facultad de Ciencias Agrarias. Departamento de Producción Vegetal, 2000.

30.VÁZQUEZ, L. M.: Manejo Integrado de Plagas. Pregun-tas y Respuestas para Extensionistas y Agricultores, INISAV,. MINAGRI, 566 pp., 2003.

31.VIEIRA, H. S.; J. A. TAKAHOSHI AND M. A. D. BOAVEN-TURA: *Fitoterapia* (72): 854-856, 2001.

32.VILLALOBOS, P.: Evaluación de la actividad insecticida de extractos vegetales de *Chrysanthemun corona-rium* L, 1996.

Recibido: 15/Diciembre/2006

Aceptado: 21/Marzo/2007