

ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA *in vitro* DEL EXTRACTO ACUOSO Y ALCALOIDEO DE *Lupinus* spp. SOBRE *Moniliophthora roreri*

In vitro ANTIFUNGAL ACTIVITY OF THE AQUEOUS AND ALKALOID EXTRACT OF *Lupinus* spp. ON *Moniliophthora roreri*

De la Cruz-Ricardez, D.¹; Lagunes-Espinoza, L.C.²; Ortiz-García, C.F.^{2*}; Pablo-Pérez, M.¹

¹Instituto Tecnológico de Huimanguillo. Carretera del Golfo Malpaso - El Bellote Km. 98.1, Ranchería Libertad. 86400 Huimanguillo, Tabasco. ²Posgrado en Producción Agroalimentaria en el Trópico. Colegio de Postgraduados, Campus Tabasco, LGAC-2: Sistemas Sustentables de Producción Agrícola y Pecuaria. Periférico Carlos A. Molinas s/n, 86500 H. Cárdenas, Tabasco, México.

*Autor de correspondencia: cfortiz@colpos.mx

RESUMEN

Se realizó una evaluación de la actividad antifúngica *in vitro* de extractos acuoso y alcaloideo de semillas, hojas y tallos de *L. campestris* (*Lc*) y *L. montanus* (*Lm*) sobre la inhibición del crecimiento micelial y esporulación de *M. roreri*. El menor crecimiento micelial ($p \leq 0.05$) de *M. roreri* fue registrado al 25% del extracto acuoso de semillas de *Lm*. De forma similar los extractos alcaloideo totales de semillas y hojas más tallos de *Lc* y *Lm* inhibieron el crecimiento micelial de *M. roreri*, registrando una inhibición total en todas las concentraciones hasta seis días de evaluación, después de los cuales el crecimiento del hongo se activó, pero sin alcanzar al del testigo. La esporulación sólo fue afectada por el extracto de alcaloides de semillas. La concentración de 10 mg mL⁻¹ presentó la mayor inhibición de la esporulación (83.6%) en semillas de *Lm*. Los niveles de inhibición del crecimiento micelial con extractos de semillas de *Lm* fueron de 84.8% a 93.6% (acuoso) y 73.4% a 85.2% (alcaloideo); y los extractos de alcaloides de hojas más tallos de *Lm* fue de 61.3% a 79.7% y para *Lc*, 57.9% a 72.1%.

Palabras claves: Moniliasis, crecimiento micelial, alcaloides, esporulación, cacao.

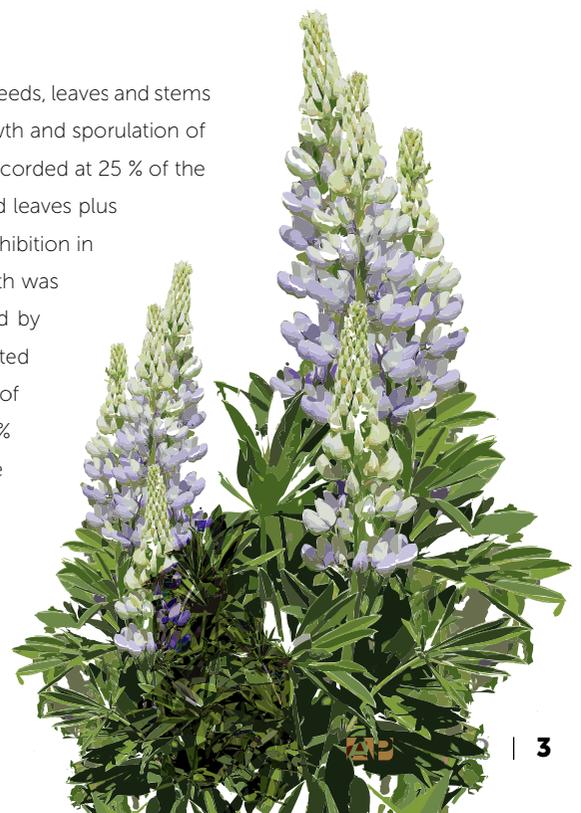
ABSTRACT

An evaluation of the *in vitro* antifungal activity of aqueous and alkaloid extracts of seeds, leaves and stems of *L. campestris* (*Lc*) and *L. montanus* (*Lm*) on the inhibition of the mycelial growth and sporulation of *M. roreri* was performed. The lower mycelial growth ($p \leq 0.05$) of *M. roreri* was recorded at 25 % of the aqueous extract of *Lm* seeds. Similarly, the total alkaloid extracts from seeds and leaves plus stems of *Lc* and *Lm* inhibited the mycelial growth of *M. roreri*, showing a total inhibition in all the concentrations up to six days of evaluation, after which the fungus growth was activated, although without reaching the control. Sporulation was only affected by the extract of alkaloids from seeds. The concentration of 10 mg mL⁻¹ presented the highest sporulation inhibition (83.6 %) in *Lm* seeds. The levels of inhibition of mycelial growth with *Lm* seed extracts were 84.8 % to 93.6 % (aqueous) and 73.4% to 85.2% (alkaloid); and the extracts of alkaloids from *Lm* leaves plus stems were 61.3% to 79.7%, and for *Lc*, 57.9% to 72.1%.

Keywords: Moniliasis, mycelial growth, alkaloids, sporulation, cacao

Agroproductividad: Vol. 9, Núm. 12, diciembre. 2016. pp: 3-9.

Recibido: julio, 2016. **Aceptado:** noviembre, 2016.



INTRODUCCIÓN

El control intensivo de plagas y enfermedades en la agricultura convencional es basado en pesticidas cuyo efecto acumulativo es negativo para los sistemas agrícolas. El uso de estos pesticidas no es aceptado en la agricultura orgánica y son reemplazados con productos o compuestos químicos altamente solubles que ocurren naturalmente en las compostas o en plantas de la familia Fabaceae (IFOAM, 2009). La mayoría de las especies que conforman esta familia son fuente de metabolitos secundarios, que extraídos y administrados en forma adecuada producen un efecto curativo en el manejo de insectos-plagas y microorganismos fitopatógenos (López-Báez *et al.*, 2009; Lozada *et al.*, 2012). Estos metabolitos secundarios presentan diversidad en estructuras químicas lo que resulta en acciones biológicas específicas, las que pueden ser aprovechadas para el diseño de productos químico-biológicos que tienen el potencial de reducir las pérdidas de cultivos al controlar los fitopatógenos. Además, de que se degradan fácilmente, son de bajo costo, y pueden adaptarse al manejo integrado para una agricultura orgánica y sustentable (Gurjar *et al.*, 2012). Entre los metabolitos secundarios con acción fúngica y farmacológica presentes en fabáceas, específicamente en el género *Lupinus* L., son los alcaloides quinolizidínicos que funcionan como mecanismos de defensa contra depredadores y agentes patógenos (Muzquiz *et al.*, 1993). Extractos de especies de *Lupinus* L., que contienen lupanina, 13-hidroxilupanina, multiflorina, angustifolina y esparteína han demostrado tener acción biofungicida contra microorganismos patógenos (Ruiz-López *et al.*, 2010). El extracto alcaloideo de semillas de *L. mexicanus* inhibe el crecimiento micelial de *Rhizoctonia solani* (Zamora-Nátera *et al.*, 2008) y el de *L. exaltatus* el de *Sclerotium rolfsii*, *Alternaria solani* y *R. solani* (Zamora-Nátera *et al.*, 2005). *Moniliophthora roreri* es un hongo que ataca al cultivo del cacao (*Theobroma cacao* L.) en América latina, y causa la enfermedad Moniliasis, la cual ocasiona daños en frutos de cacao como deformaciones y manchas color café ("chocolate") en cualquier etapa de desarrollo, lo que tiene un alto impacto económico que degenera en el abandono del cultivo, o su reemplazo (Avendaño *et al.*, 2011; Hernández *et al.*, 2015). El manejo de la Moniliasis está basado en podas, remoción de frutos enfermos y aplicación intensiva de fungicidas para evitar la diseminación del hongo, sin embargo, la baja capacitación de productores y los costos de la implementación de éste conjunto de prácticas

hacen difícil su estandarización, por lo que no se logra el control eficiente de la enfermedad. Aunado a ello, los resultados del uso de fungicidas son inconsistente de un año a otro, su aplicación no controlada puede tener un efecto ambiental negativo, y si el productor decidiera producir cacao orgánico, no podría usar estos productos. Por ello, es necesario la búsqueda de alternativas sustentables para el manejo de la Moniliasis del cacao y el uso de extracto de plantas con antecedentes de actividad fungicida (Pablo-Pérez *et al.*, 2015). Con base en lo anterior, se evaluó la actividad fungicida *in vitro* de los extractos acuoso y alcaloideos de semillas, hojas y tallos de *L. campestris* y *L. montanus* sobre la inhibición del crecimiento micelial y esporulación de *M. roreri*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Semillas y material vegetativo de *L. campestris* y *L. montanus* fueron proporcionados por el Laboratorio de Fisiología Vegetal del Colegio de Postgraduados, Campus Tabasco. Estas especies crecen en los ecosistemas agrícolas y forestales de los municipios de Chalchicomula de Sesma y Tlachichuca en la región de los Valles del Serdán, Puebla (18° 48' 30" y 19° 16' 30" N, y 97° 18' 10" y 97° 35' 20" O), a una altitud de 1800 a 3600 m (Lagunes-Espinoza *et al.*, 2012) bajo un clima templado subhúmedo, con una temperatura media de entre 12 a 18 °C y precipitación media anual de 400 a 600 mm.

La obtención del extracto acuoso fue a través de semillas de *L. montanus* usando 15 g de semillas las cuales se desinfectaron con hipoclorito de sodio (NaOCl) al 1% durante 15 min con seis lavados con agua destilada estéril. A las semillas desinfectadas se les agregaron 200 mL de agua destilada, se dejaron reposar por 12 h, y se maceraron en un mortero. El macerado se colocó en la solución de imbibición y se mantuvo en agitación constante por 24 h. La solución del macerado se centrifugó a 10000 xg durante 30 min a 20 °C y el sobrenadante se utilizó para realizar el bioensayo de actividad fúngica. Para el extracto alcaloideo de semillas de *L. montanus* y de hojas más tallos de *L. campestris*, se usaron 50 g de cada material desengrasados de acuerdo a Muzquiz *et al.* (1993). Para la extracción de



alcaloides totales, a las muestras desengrasadas se les agregó ácido tricloroacético 0.3 M, manteniéndose en agitación constante 16 h a 180 rpm. La mezcla homogenizada se centrifugó a 4500 xg a 25 °C 15 min; la fase líquida fue decantada. El decantado se alcalinizó con hidróxido de sodio 10 M y se dejó reposar 1 min, y una vez alcalinizado se le agregó diclorometano, se agitó vigorosamente y se dejó reposar hasta la separación de fases. La fase orgánica con los alcaloides (fase inferior) se decantó en matraces previamente secados y tarados, tapados con papel aluminio (repetiendo esta operación tres veces más). Todo se dejó evaporar completamente a temperatura ambiente. Al final se registró el peso de los matraces más muestra para determinar por diferencia el contenido de alcaloides totales (Wysocka *et al.*, 1989; Bernal-Alcocer *et al.*, 2005), y se almacenaron a 4 °C para su posterior uso. El porcentaje de alcaloides totales se calculó con la fórmula:

$$\% \text{ de alcaloides totales} = [(P_2 - P_1) / P_3] 100$$

donde P_1 es el peso inicial del matraz vacío sin tapa (g); P_2 es el peso final del matraz más residuo sin tapa (g) y P_3 es el peso de la muestra seca (g).

Obtención del hongo fitopatógeno: La cepa No. MRV8070515 de *Moniliophthora roreri* aislada de frutos de cacao de Tabasco, fue proporcionada por el Laboratorio de Fitopatología del Colegio de Postgraduados, Campus Tabasco.

Bioensayo: Para el extracto acuoso, se prepararon concentraciones de 10%, 17.5% y 25% de éste extracto en un volumen de 100 mL del medio de cultivo V8. Se incluyó un testigo (0%). Para los de alcaloides totales, los residuos de semillas de *L. montanus* y de hojas más tallos de *L. campestris* y *L. montanus* se disolvieron con 500 μ L de metanol y se diluyeron hasta 50 mL con agua destilada para obtener el extracto alcaloideo; de éste se prepararon concentraciones de 5, 7.5 y 10 mg mL⁻¹ de alcaloides totales en 100 mL de medio de cultivo V8 clarificado. Se incluyó un testigo (0 mg mL⁻¹). Los medios con cada tratamiento se agitaron para garantizar la homogeneidad de la mezcla, y se esterilizaron en autoclave a una presión de 15 lb cm⁻² y 121 °C. Por cada concentración de alcaloides se realizaron 10 repeticiones. El ensayo se realizó en cajas Petri de 9 cm de diámetro, a las que se les agregaron 10 mL de medio.

Inoculación del hongo: A partir de colonias *M. roreri* de 10 días de crecimiento, se extrajeron discos de micelio de 5 mm de diámetro con un sacabocados y se colocaron en el centro de las cajas Petri con medio V8 clarificado con las concentraciones a evaluar (diez repeticiones por tratamiento), y se incubaron a 25±1°C. Se midió el crecimiento micelial (mm) en dos ejes perpendiculares: horizontal y vertical, cada 24 h, con la ayuda de un vernier manual marca Pretul®. Las mediciones se detuvieron hasta que el testigo (sin ninguna concentración de alcaloides) llenó la caja. Para determinar

el porcentaje de inhibición se utilizó la fórmula usada por Zamora-Natera *et al.* (2008):

$$I = [(C - T) / C] 100$$

donde I es la inhibición (%), C es el diámetro del micelio en la caja Petri del control (0 mg mL⁻¹), T es el diámetro del micelio en la caja Petri del tratamiento (5, 7.5 y 10 mL⁻¹).

La esporulación se determinó mediante el conteo de esporas. Para ello con una pipeta Pasteur estéril, se agregaron 5 mL de agua destilada estéril en cada caja de Petri, y con la ayuda de un tubo de vidrio estéril se hizo un raspado de esporas, recuperándose la solución nuevamente con la pipeta Pasteur, y colocándose en un tubo de ensayo con tapa. Todo se agitó en vortex, posteriormente con otra pipeta Pasteur se tomó una gota de la concentración de esporas y se colocó en un Hematocitómetro marca Lumicyte para su conteo.

Análisis estadístico: Se utilizó un diseño completamente al azar, los datos de crecimiento micelial se sometieron al análisis de varianza, y a la separación de medias por la prueba de Tukey ($p \leq 0.5\%$) mediante el software estadístico InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2014).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efectividad fungicida del extracto acuoso de semillas *L. montanus* sobre *M. roreri*. Los resultados mostraron que hubo diferencias estadísticas significativas ($p \leq 0.05$) entre las concentraciones del extracto acuoso de semillas de *L. montanus* evaluadas. Las tres dosis probadas redujeron el crecimiento micelial de *M. roreri* con respecto al testigo



(Figura 1A). Una completa inhibición del crecimiento micelial fue observada, por cuatro días en las concentraciones de 10% y 15 % y de ocho días con la concentración mayor (Figura 1B) después mostró crecimiento. La mayor concentración (25%) del extracto acuoso de semillas de *L. montanus* registró el mejor efecto fungicida sobre *M. roreri* ($p \leq 0.05$) con respecto al testigo (0%) y a las otras dos concentraciones evaluadas (10% y 15%) con similar comportamiento. Otros estudios realizados con especies de *Lupinus* L., confirman el efecto fungicida observado. Así, una relación inversa del crecimiento del micelio (diámetro, cm) de *A. solani* y *Fusarium solani* y el incremento de la concentración del extracto acuoso de semillas de *L. mutabilis* fue reportado por Yepes *et al.* (2009). Concentraciones a 5000, 10000 y 20000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de alcaloides totales presentes en las aguas de cocción e hidratación de semillas de *L. mutabilis*, manifestaron actividad antimicrobiana frente *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella gallinarum*, *Klebsiella pneumoniae*, *Mycobacterium Smegmatis* y *Pseudomona aeruginosa* (Rodríguez, 2009). En contraste, estos tratamientos no mostraron actividad fungicida frente a *Candida albicans*, *Mycrosporium canis* y *Trichophyton rubrum* (Coloma, 2009).

Efectividad in vitro del extracto alcaloideo de semillas de *L. montanus*.

Los resultados del crecimiento micelial de *M. roreri* presentaron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) por efecto de la concentración del extracto alcaloideo de semillas de *L. montanus*, siendo la concentración más alta (10 mg mL^{-1}) la que presentó la menor área micelial (Cuadro 1). La tasa del crecimiento micelial registró una relación inversa respecto a las concentraciones evaluadas (7.5 y 10 mg mL^{-1}). La me-

nor concentración evaluada (5 mg mL^{-1}) mantuvo un efecto reductivo significativo con respecto al testigo.

Una completa inhibición del crecimiento de *M. roreri* hasta por seis días se observó en todas las concentraciones evaluadas (Figura 2A), después de los cuales el crecimiento del *M. roreri* se activó, sin alcanzar al testigo.

Los extractos alcaloideos de especies de *Lupinus* L., pueden mostrar o no capacidad fungicida sobre diferentes hongos fitopatógenos, tales como extractos alcaloideos de *L. montanus* y *L. rotundiflorus* que no inhibieron el crecimiento micelial de *Fusarium* sp. en ninguna de las concentraciones evaluadas, lo que contrasta con lo observado en *M. roreri*; y cuando se probaron sobre *S. rolfisii*, *A. solani*, *R. solani* y *F. oxysporum*, el extracto de *L. montanus* fue el de menor actividad fungicida (Bernal-Alcocer *et al.*, 2005). En contraste, el extracto de *L. rotundiflorus* mostró alta actividad fungicida ($p < 0.01$) en los cuatro hongos y una inhibición de 92% con 2500 mg mL^{-1} para *S. rolfisii*. Otra especie de *Lupinus* L., que ha mostrado efecto antifúngico es *L. exaltatus*, cuyo extracto crudo de alcaloides a partir de semillas inhibió el crecimiento de *A. solani*, *R. solani* y *S. rolfisii* pero no de *F. oxysporum* (Zamora-Natera *et al.*, 2005).

Efectividad in vitro del extracto alcaloideo de hoja más tallo de *L. campestris* y *L. montanus*.

La Figura 2B muestra que en ambas especies se observó una reducción significativa del crecimiento micelial con respecto al testigo (0 mg mL^{-1}), siendo mayor el efecto a la concentración más alta (10 mg mL^{-1}). El comportamiento semejante entre las especies evaluadas para inhibir el crecimiento micelial de *M. roreri* puede deberse a su contenido similar de

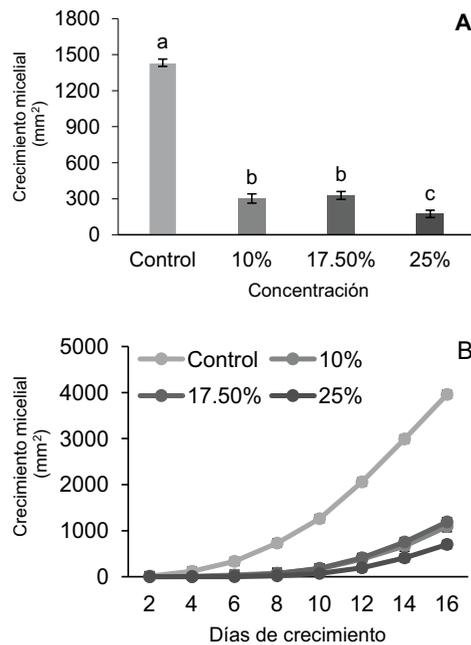


Figura 1. Efecto fungicida de la concentración de extracto acuoso de semillas de *L. montanus* sobre el crecimiento micelial de *M. roreri*.

Concentración (mg mL^{-1})	Crecimiento micelial (mm^2)
0	1609.84 a
5	738.49 b
7.5	578.54 c
10	464.60 c

Medias con letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$).

alcaloides totales. *L. montanus* contiene 1.2 g 100 g⁻¹ en hojas más tallos y *L. campestris* 1.4 g 100 g⁻¹ (Pablo-Pérez *et al.*, 2015). Aunque el perfil de alcaloides es diferente entre estas especies, *L. montanus* contiene esparteína como alcaloide mayoritario y en bajos niveles angustifolina que también posee actividad bioplaguicida y farmacológica (Ruiz-López *et al.*, 2010) y *L. campestris* presenta como alcaloide mayoritario a hidroxifilidina (Cortés *et al.*, 2005). Extractos de otras especies vegetales han demostrado inhibir el crecimiento micelial de *M. roleri*, entre ellas los aceites esenciales de hojas y tallos de especies de *Lippia* en concentraciones de 800 y 1000 µg mL⁻¹ (Lozada *et al.*, 2012).

Inhibición de la esporulación de *M. roleri*. El extracto acuoso de semillas de *L. montanus* no presentó diferencias significativas ($p > 0.05$) sobre la esporulación de *M. roleri* en ninguna de las concentraciones evaluadas. En contraste, los extractos alcaloideos de semillas ($p < 0.0001$) y de hoja más tallo ($p < 0.005$) de esta especie presentaron inhibición significativa en la esporulación de *M. roleri*. En ambos casos la concentración más alta (10 mg mL⁻¹) presentó una mayor inhibición en la esporulación, siendo el extracto de semillas el que mayor efecto mostró (Figura 3). La inhibición del porcentaje de esporulación de *M. roleri* fue observado por Lozada *et al.* (2012) al usar aceites esenciales de tres especies de *Lippia*.

Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de *M. roleri*. Los resultados mostraron que hubo diferencias estadísticas significativas ($p \leq 0.05$) entre las

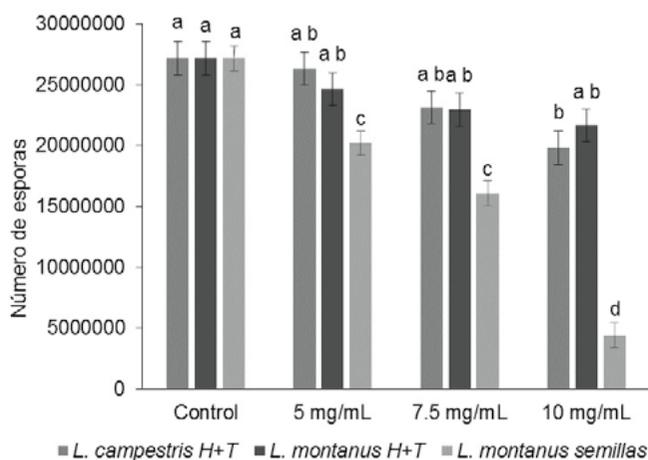


Figura 3. Efecto de la concentración del extracto alcaloideo de semillas y hojas más tallos de *L. campestris* y *L. montanus* sobre la esporulación de *M. roleri*. Medias con letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$).

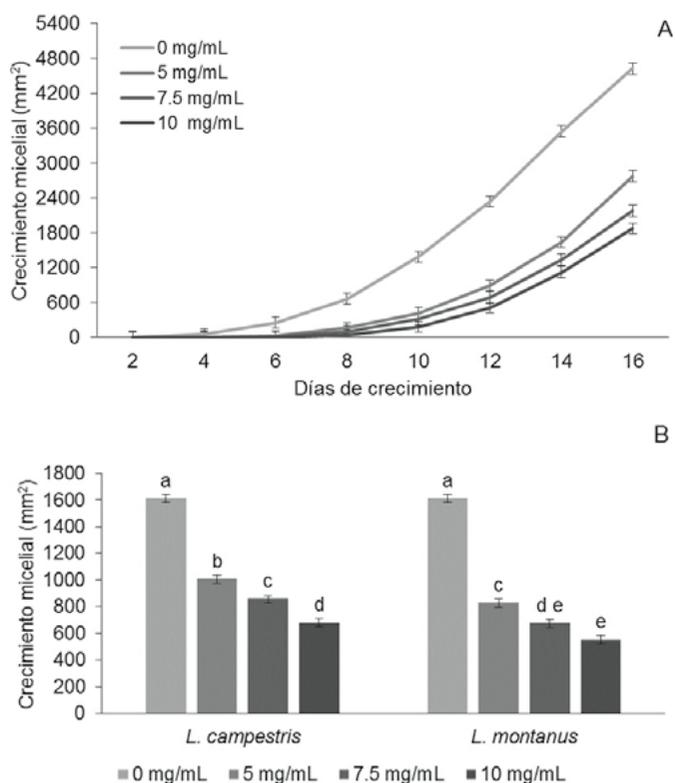


Figura 2. A) Efecto del extracto alcaloideo de semillas de *L. montanus* sobre crecimiento micelial de *M. roleri*. B) Efecto de la concentración de alcaloides (mg mL⁻¹) de hojas más tallos de *L. campestris* y *L. montanus*.

concentraciones del extracto acuoso de semillas de *L. montanus* evaluadas en la inhibición del crecimiento micelial de *M. roleri*. La concentración de 25% inhibió, en un 93.6% a los 16 días de desarrollo, mientras que las concentraciones de 17.5% y 10% éste fue de 84% respecto al desarrollo micelial del testigo (Figura 4A). Resultados similares de inhibición del crecimiento micelial fueron observados en los hongos *A. solani* (74.2%) y en *F. solani* (66.8%) utilizando el extracto acuoso de semillas, *L. mutabilis* a una concentración de 13% (Yepes *et al.*, 2009).

Efecto de los extractos alcaloideos de *L. campestris* y *L. montanus*. Los extractos alcaloideos de semillas y los de hojas más tallo de *L. campestris* y *L. montanus* presentaron diferencias significativas ($p > 0.05$) sobre el crecimiento del micelio de *M. roleri* (Figura 4B). En semillas, todas las concentraciones mostraron diferencias significativas respecto al control (0 mg mL⁻¹). La concentración más alta manifestó un mayor porcentaje de inhibición (85.29%), aunque menor inhibición al registrado por la mayor concentración del extracto acuoso. Todas las concentraciones de los extractos en estudio presentaron un porcentaje de inhibición

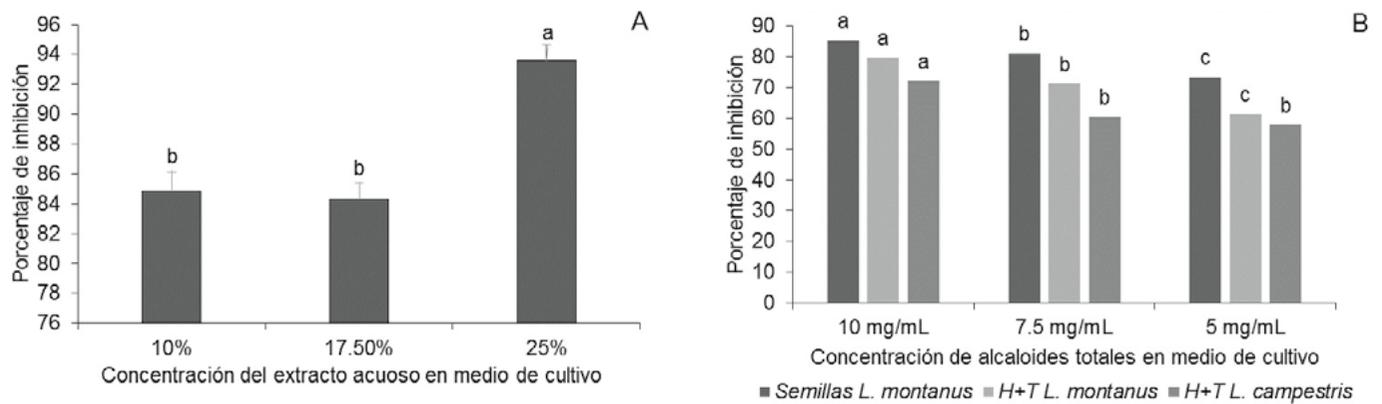


Figura 4. Efecto del extracto acuoso (A) de semillas de *L. montanus* y del alcaloide (B) semillas y de hoja más tallo de *L. campestris* y *L. montanus* sobre el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de *M. roleri* en relación al control 0%. Medias con letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$).

superior al 50%, manteniendo una relación directa entre la concentración y el porcentaje de inhibición.

Estudios similares demuestran la actividad inhibitoria del desarrollo micelial de hongos fitopatógenos que ejercen los extractos de alcaloides específicos de especies de *Lupinus* (Bernal-Alcocer *et al.*, 2005; Zamora-Natera *et al.*, 2005; Zamora-Natera *et al.*, 2008). El conocimiento del efecto de los alcaloides de especies de *Lupinus* L., sobre el crecimiento micelial y esporulación de *M. roleri* es un buen potencial para encontrar nuevas alternativas en el manejo sustentable y orgánico de la Moniliasis del cacao. Por lo que deberá ser deben realizar los ensayos de campo para determinar dosis de extractos o mezclas de compuestos naturales como agentes para el biocontrol en la producción orgánica del cacao.

CONCLUSIONES

En condiciones *in vitro* los alcaloides presentes en las semillas de *L. montanus* y hojas más tallos de *L. campestris* y *L. montanus* presentan un efecto fungicida sobre *M. roleri*, tanto en extractos acuosos como en alcaloideos. La inhibición de la esporulación de *M. roleri* se observó con el extracto alcaloideo a partir de semillas de *L. montanus*, principalmente con la concentración de 10 mg mL⁻¹ (83.6%).

LITERATURA CITADA

- Avendaño A.C.H., Villareal F.J.M., Campos R.E., Gallardo M.R.A., Mendoza L.A., Aguirre M.J.F., Sandoval E.A., Espinosa Z.S. 2011. Diagnóstico de cacao en México. Universidad Autónoma Chapingo. Texcoco, México. 80 p.
- Bernal-Alcocer A., Zamora-Natera J.F., Virgen-Calleros G., Nuño-Romero R. 2005. Actividad biológica *in vitro* de extractos de

Lupinus spp., sobre hongos fitopatógenos. Revista Mexicana de Fitopatología 23:140-146.

- Coloma R.J.M. 2009. Evaluación *in vitro* de la actividad antifúngica de los alcaloides del agua de cocción del proceso de desamargado del chocho (*Lupinus mutabilis* Sweet). Tesis de grado para obtener el Título de Bioquímico Farmacéutico. Riobamba, Ecuador. 92 p.
- Cortes S.M., Altares P., Pedrosa M.M., Burbano C., Cuadrado C., Goyoaga C., Muzquiz M., Jiménez-Martínez C., Dávila-Ortiz G. 2005. Alkaloid variation during germination in different lupin species. Food Chemistry 90: 347-355.
- Hernández G.E., Hernández M.J., Avendaño A.C.H., López G.G., Garrido R.E.R., Romero N.J., Nava Díaz C. 2015. Factores socioeconómicos y parasitológicos que limitan la producción del cacao en Chiapas, México. Revista Mexicana de Fitopatología 33(2):232-246.
- IFOAM. 2009. Organic agriculture a guide to climate change & food security. www.infoam.org.
- Lagunes-Espinoza L.C., López-Upton J., García-López E., Jasso-Mata J., Delgado-Alvarado A., García de los Santos G. 2012. Diversidad morfológica y concentración de proteína de *Lupinus* spp., en la región centro-oriental del estado de Puebla, México. Acta Botánica Mexicana 99: 73-90.
- López-Báez O., Ramírez-González S.I., Ramírez-González M., González-Mejía O., Espinosa-Zaragoza S., Villarreal-Fuentes J.M. 2009. Extractos de *Thymus vulgaris* y *Heliotropium indicum* sobre el crecimiento *in vitro* de *Phytophthora palmivora* (Butler) Butler en cacao (*Theobroma cacao* L.). Quehacer Científico en Chiapas 1(8) 44-51.
- Lozada B.S., Herrera L.V., Perea J.A., Stashenko E., Escobar P. 2012. Efecto *in vitro* de aceites esenciales de tres especies de *Lippia* sobre *Moniliophthora roreri* (Cif. y Par.) Evans *et al.*, agente causante de la moniliasis del cacao (*Theobroma cacao* L.). Acta Agronómica 61 (2): 102-110.
- Muzquiz M., Cuadrado C., Ayet G., De la Cuadra C., Burbano C., Osagie A. 1993. Variation of alkaloid components of lupin seeds in 49 genotypes of *Lupinus albus* L. from different countries and locations. Journal of Agricultural and Food Chemistry 42:1447-1450.
- Pablo-Pérez M., Lagunes-Espinoza L.C., López-Upton J., Aranda-Ibáñez E.M., Ramos-Juárez J. 2015. Composición química de

- especies silvestres del género *Lupinus* del estado de Puebla, México. Revista Fitotecnia Mexicana 38 (1): 49-55.
- Rodríguez B.A.I. 2009. Evaluación "in vitro" de la actividad antimicrobiana de los alcaloides del agua de cocción del proceso de desamargado del chocho (*Lupinus mutabilis* Sweet). Tesis de grado previa la obtención del título de Bioquímico farmacéutico. Riobamba, Ecuador. 83 p.
- Ruiz-López M.A., García-López P.M., Rodríguez-Macías R., Zamora-Natera J.F. 2010. Mexican wild lupines as a source of quinolizidine alkaloids of economic potential. Polibotánica 29: 159-164.
- Wysocka W., Brukwicki T., Jalszynski R., Hoffmann K. 1989. A new and efficient method of extraction of alkaloids from Lupin seed. Lupin NewsLetter 13:59-65.
- Yepes P.A., Rodríguez E.M., Enriquez L.P., Zafra P.H., Villegas L.S., Barboza A.Y., Alvarado C.P. 2009. Efecto antifúngico del extracto acuoso de semillas del chocho, *Lupinus mutabilis* sobre *Alternaria solani* y *Fusarium solani*. REBIOL 29(1).
- Zamora-Natera F., García-López P., Ruiz-López M., Salcedo-Pérez E. 2008. Composition of alkaloids in seeds of *Lupinus mexicanus* (Fabaceae) and antifungal and allelopathic evaluation of the alkaloid extract. Agrociencia 42:185-192.
- Zamora-Natera J.F., Bernal-Alcocer A., Ruiz-López M., Soto-Hernández M., Escalante-Estrada A., Vibrans-Lindemann H. 2005. Perfil de alcaloides de semillas de *Lupinus exaltatus* Zucc. (Fabaceae) y la evaluación antifúngica del extracto alcaloideo y Lupanina contra fitopatógenos. Revista Mexicana de Fitopatología 23:124-129.

