



Evaluación de la actividad antifúngica del extracto de *Datura Stramonium* sobre hongos fitopatógenos del tomate.

Evaluation of antifungal activity from extracts of *Datura stramonium* against tomato phytopathogenic fungi.

Lina Maria Otalvaro Rincón¹, Ana Cecilia Caro Zapata, Brayan Roldan Mesa, Carlos Andres Nore

Recibo: 22.08.2018 Aceptado: 04.07.2019

Otalvaro L., Caro A., Roldan B., Nore C. (2019). Evaluación de la actividad antifúngica del extracto de *Datura Stramonium* sobre hongos fitopatógenos del tomate. *Revista Colombiana de Investigaciones Agroindustriales*, 6(1), 116-126

Resumen

El deterioro de los tomates por el efecto de los hongos fitopatógenos ha sido reconocido como una fuente de posible peligro para la salud humana y animal. La especie vegetal *Datura stramonium* posee una alta actividad biológica antifúngica, debido a la presencia de alcaloides tropánicos. En este trabajo se evaluó la actividad de control fúngico de los extractos preparados con la flor y la semilla de esta especie. En los ensayos se midió el diámetro de crecimiento de un hongo nativo del cultivo de tomate en un medio sólido PDA (agar papa dextrosa) que estaba enriquecido con 100 μ l (microlitros) de los extractos obtenidos de las partes de la especie vegetal. Los porcentajes de inhibición encontrados fueron del 90 % y del 100% para los extractos de la flor y la semilla respectivamente. Con el fin de identificar la naturaleza química de los metabolitos extraídos que presentaron actividad antifúngica, se realizaron análisis mediante cromatografía líquida HPLC/UV, y espectrofotometría IR. Este estudio permitió confirmar que los metabolitos extraídos fueron alcaloides tropánicos, pero con algunas sustancias diferentes para los extractos de la semilla y la flor.

Palabras clave: *Solanum lycopersicum*, fungicida, extractos naturales, alcaloides, plagas.

Abstract

The deterioration of tomatoes due to the effect of fungi has been recognized as a source of possible danger to the health of humans and animals. *Datura stramonium* has high antifungal activity, due to the presence of tropanic alkaloids. In this work the activity of the extracts from the flower and the seed of the plant *Datura stramonium* is evaluated, measuring the diameter of the growth halo of a native tomato fungus in a solid PDA medium enriched with 10 microliters of extract. The percentages of inhibition were 90% for the extract of the flower and 100% for the extract of the seed, since day 2 of the test. In order to identify the chemical nature of the metabolites that are antifungal activity, the results with liquid chromatography HPLC / UV, and IR spectrophotometry. This study confirmed that the extracted metabolites were

¹Servicio Nacional de Aprendizaje, Centro Textil y de Gestión Industrial; Correo: lotalvaror@sena.edu.co; Colombia

seeds or flowers.

Keywords: *Solanum lycopersicum*, fungicide, natural extracts, alkaloids, plague.

Introducción

La finalidad de la agricultura es la de satisfacer las necesidades de alimentos y fibras de los seres humanos, estas son mayores a medida que aumenta la población mundial, como se espera que para el año 2025 la población alcance de 6,3 a 8,5 mil millones de habitantes. Estos aumentos requerirán de un incremento de la producción agrícola de aproximadamente un 40 a 50 % para mantener el nivel actual de insumos de alimentos.(FAO, 2009; Unemployment, Skills, & Programmes, 2011)

En la mayoría de los países en vía de desarrollo, la principal fuente de nutrientes la constituyen los alimentos de origen vegetal, de los cuales los cereales y las hortalizas ocupan un lugar muy importante. (Fao, 2007). El tomate (*Solanum lycopersicum* L), es la hortaliza más difundida en todo el mundo y la de mayor valor económico siendo; China, EE.UU y Turquía los mayores productores. El cultivo del tomate ocupa una superficie anual de 4.803.680 con un rendimiento a nivel mundial de 33,68 ton/ha(FAO, 2010) y (Alarcon, 2018). En América del Sur, Chile es un gran exportador de puré de tomate, y Brasil produce aproximadamente 3 millones de toneladas de tomate. (PlagasyDesinfeccion, 2018), (Systems, 2018) y (Cámara de Comercio de Bogotá, 2018).

La producción de tomate en Colombia es común en casi todas las zonas del país. Sin embargo, el departamento del Norte de Santander lidera la producción, participando con el 29% del total de la producción nacional, seguido de Antioquia con 11,4%, Boyacá con 11,3%, Santander con 10,4% y Cundinamarca con el 6,5% (Ministro de Agricultura y Desarrollo Rural, 2017), (Cámara de Comercio de Bogotá, 2018)

Los frutos del tomate representan uno de los componentes más frecuentes de la dieta humana, debido a su notable riqueza en: vitaminas,

azúcares, compuestos antioxidantes, pigmentos carotenoides, microelementos, metabolitos secundarios, sales minerales y fibras, así como sus excelentes cualidades gustativas, que mejoran el apetito y contribuyen con la digestión de alimentos. (Elein Terry-Alfonso, Mayo-agosto, 2018) y (Luna-Guevara, 2014). Algunos de estos compuestos se relacionan con la prevención de enfermedades como el cáncer, la inflamación del colon y el síndrome de degeneración muscular, principal causa de ceguera en gente mayor de 65 años.(Bobo, 2014; Hernández, Politécnica, & Orihuela, 2016).

El cultivo de tomate se ve influenciado por unas variables ambientales como la temperatura, humedad, tipo de suelo y luminosidad que causan efectos diferenciales que lo favorecen o afectan; además de los controles con sustancias químicas (plaguicidas) aplicadas para evitar plagas asociadas al cultivo. Este es un fruto que madura en verano, necesitando así; temperaturas que durante el día oscilan por los 25°C, y durante la noche entre los 10°C y 15°C. Este cultivo se puede ver afectada por varios microorganismos fitopatógenos, los cuales pueden generar deterioro en el sabor, olor, color, apariencia o textura de los frutos. (Elein Terry-Alfonso, Mayo-agosto, 2018) y (Luna-Guevara, 2014)

Los hongos son una de las principales fuentes de deterioro del tomate, siendo los más destacados *Aspergillus phoenicis*, *Absidia* spp, *Trichoderma* spp, *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium moniliformis*, *Aspergilli us niger*, *Mucor* spp, *Rhizopus stolonifer*, *Penicillium* spp, *Geotrichum* spp y *Phytophthora* spp (Etebu, Nwauzoma, & Bawo, 2013; Musa, Sani, & Aliero, 2011)(Etebu et al., 2013). Este deterioro por efecto de los hongos, ha sido reconocida como fuente de posible peligro para la salud humana y animal debido a que durante la infestación se producen diferentes tipos de micotoxinas, sustancias que

en cantidades muy pequeñas son tóxicas capaces de generar graves efectos sobre la salud después de la ingestión o inhalación (Musa et al., 2011) y (Organización Panamericana de la Salud OPS, 2018)

Para contrarrestar la propagación de estos microorganismos (hongos) se han utilizado diferentes alternativas como son los fungicidas sintéticos, los cuales han sido una buena alternativa. Pero estos productos al presentar una alta concentración de sustancias químicas nocivas, han ocasionado efectos negativos para los consumidores y los cultivos mismos y provocando la contaminación de la estructura de la planta, el suelo, el aire y a su vez las fuentes hídricas por el efecto de la escorrentía. (Alarcon, 2018) (Elein Terry-Alfonso, Mayo-agosto, 2018) (PlagasyDesinfeccion, 2018)

En un intento de modificar esta condición, se han adoptado algunos métodos alternativos de control, los esfuerzos recientes se han centrado en desarrollar métodos de biocontrol

ambientalmente seguros, duraderos y efectivos para el manejo de los microorganismos que afectan los cultivos. Estos surgen principalmente de especies vegetales naturales que presentan principios activos específicos que son una opción para el control de los microorganismos en las plantas (Kagale, Marimuthu, Thayumanavan, Nandakumar, & Samiyappan, 2004) (Nashwa & Abo-elyousr, 2012). Además, los biocidas de origen vegetal en general no son fitotóxicos, son sistémicos y fácilmente biodegradables, estos pueden reducir las poblaciones de patógenos foliares y controlar el desarrollo de la enfermedad, por lo que se puede decir que estos extractos de las plantas tienen un potencial como alternativas en programas integrados de manejo de plagas, sin efectos hasta ahora identificados al ambiente, personas y animales por venir de componentes naturales. (Bowers & Locke, 2004; Mercurialis, 1996).



Figura 1. Especie vegetal *Datura stramonium*. Elaboración Propia

La especie vegetal *Datura stramonium* (ver figura 1) o localmente llamado borrachero es una planta de la familia Solanácea. El término *Datura* se refiere a especies de arbustos o plantas herbáceas que se producen en forma de trompeta con flores blancas o púrpuras, con corolas grandes que miden 6 cm de largo aproximadamente, las hojas miden 20 cm de

largo y son ovaladas, con un borde ondulado y grueso. (Boros et al., 2010).

Esta planta según revisiones bibliográficas, contiene en la mayoría de sus partes una gran cantidad de alcaloides ricos en atropina, escopolamina e hioscinamina, por lo cual ha sido empleada con fines alucinógenos, sin embargo sus extractos han sido ampliamente

estudiados para el control de diversos hongos fitopatógenos. (Luna-Guevara, 2014) , (Elein Terry-Alfonso, Mayo-agosto, 2018)

Sharma y colaboradores reportan que las sustancias presentes en la especie *Datura* presenta porcentajes de inhibición del crecimiento de los hongos en *Rhizoctonia solani*, *R. bataticola*, *Fusarium solani* y *F. moniliforme* entre el 76 y el 88% por la actividad de los extractos alcohólicos de las hojas (Sharma, Srivastava, Verma, Niwas, & Singh, 2014). Rodino y colaboradores reportan que los extractos de *Datura stramonium* L, *Xanthium strumarium* L, *Rosmarinus officinalis* L. y *Artemisia absinthium* L mostraron actividad antifúngica mediante la inhibición del crecimiento micelar en *Alternaria alternata*. (Rodino, Butu, Petrache, Butu, & Cornea, 2014). Lo cual es un resultado similar a lo reportado por Sasode y colaboradores sobre el hongo *Alternaria brassicae*. (Sasode, Prakash, Gupta, & Pandya, 2012). Sahu y colaboradores reportan que extractos de *Datura stramonium* L. mostraron 34,65% de inhibición del crecimiento micelar en *Alternaria solani* (Sahu, Khare, & Patel, 2014).

Por lo tanto este trabajo tiene como objetivo principal evaluar el efecto antifúngico de extractos de partes de la flor y semillas de la especie vegetal *Datura stramonium* sobre hongos fitopatógenos como *Fusarium ssp* del tomate en condiciones de laboratorio.

Materiales y Metodos

Recolección de las plantas

De la especie vegetal *Datura stramonium ssp* se recolectaron las flores y los frutos (las semillas) en la Loma del Escobero en la ciudad de Medellín coordenadas 6°08'10.0" N 75°33'15.8" W – Colombia que pertenece a la zona tropical, en una época de verano en una zona semirural donde se presenta esta planta en los jardines de las viviendas. (öz arık, 2017)

Obtención de los extractos de la planta *Datura stramonium*

Se pesó aproximadamente 200 g de la semilla y/o la flor para cada extracto, previamente seca y molida, el proceso de secado se realizó a 45°C en un horno de secado con aire forzado marca Binder, luego fue molido en un molino de cuchillas marca IKA. Posteriormente se procedió a hacer un desengrasado, agregando 50 ml de hexano y se dejó en contacto durante dos días protegida de la luz. Después de este tiempo se separó la capa hidrofóbica y luego se realizó la extracción a 60 g del material desengrasado mediante el método soxhlet con 350 ml de una mezcla de etanol y éter de petróleo en proporciones 1:2 a 220°C por 12 horas. Posterior a este tiempo el extracto se llevó a rotavaporar a 40°C y una presión de 335 milibares en un rotoevaporador marca Buchi, obteniendo alrededor de 45 ml de extracto para las flores y semillas.

Evaluación de la actividad antifúngica del extracto en hongos fitopatógenos del tomate.

La evaluación de la actividad antifúngica de los extractos se realizó mediante una prueba de inhibición del crecimiento radial de un hongo fitopatógeno, este último aislado desde plantas enfermas de tomate. Para el aislamiento del hongo se tomaron segmentos de las plantas con presencia de hongos filamentosos o zonas enfermas. Estos segmentos fueron cultivados en agar papa dextrosa (PDA) a 28°C hasta el desarrollo de colonias. Posteriormente con ayuda del microscopio se tomaron muestras de hifas y se cultivaron en el medio sólido PDA para su purificación. Finalmente se seleccionó un moho con características morfológicas (macro y microscópicas) compatibles con *Fusarium ssp* que fue el hongo fitopatógeno estudiado.

Para la prueba de inhibición tanto para extracto de flores como de semillas se emplearon cajas Petri de 10 cm de diámetro con medio sólido PDA, este último preparado según las indicaciones del fabricante y enriquecido con 100 µL del correspondiente extracto, lo anterior con el fin de no alterar significativamente los demás componentes del medio. Los blancos

fueron medios solidos que se enriquecieron con los solventes empleados en la extracción, la finalidad de estos blancos fue descartar el efecto del solvente sobre el crecimiento del hongo, así mismo se realizaron controles negativos con medios sin alteración alguna. Los medios fueron inoculados en el centro con discos de 1 cm de diámetro del hongo fitopatogeno que llevaba 8 días de crecimiento. Las cajas Petri fueron selladas, incubadas a 28°C y monitoreadas por espacio de 20 días. Se hicieron mediciones a las 24, 48, 72 horas y 20 días, determinando el crecimiento radial por mediciones del diámetro de las colonias (Lizcano, 2007). De este ensayo se realizaron 5 réplicas, con resultados muy similares.

Caracterización química de los extractos Análisis del extracto mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)

Los extractos se caracterizaron mediante un equipo HPLC cromatografía líquida acoplada a detector ultravioleta/visible marca Thermo Scientific, modelo Accela 600, utilizando una columna C18 de 150 mm de longitud y 4,6 mm de diámetro interno, con fase móvil que fue un gradiente que inicia de tiempo 0 con 5% de acetonitrilo y 95% de agua y termina en un tiempo de 30 minutos con un 100% de acetonitrilo, utilizando un detector ultravioleta con arreglo de diodos y se observaron los picos del cromatograma en un rango de longitud de onda entre 210 nm y 360 nm, las muestras de los extractos para flores y semillas previamente se filtraron a través de un acrodisco de nylon de tamaño de poro de 0,2 µm en un vial de 1,5 ml.

Análisis por espectroscopia infrarrojo (FT-IR)

Los extractos de las flores y las semillas se caracterizaron por espectrofotometría infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR), en un equipo marca Thermo Scientific, modelo Nicolet IS10; para identificar los grupos funcionales presentes en los extractos de los metabolitos obtenidos según referencias bibliográficas y

experiencia de los autores para estas sustancias.

Discusión

Actividad antifúngica de los extractos de las flores y semillas de *Datura stramonium*

Como se aprecia en las figuras 2 y 3, los medios enriquecidos (agares) con los extractos obtenidos de las flores y semillas de *Datura stramonium*, presentaron porcentajes de inhibición altos desde el primer día de cultivo que permanecieron durante los 20 días restantes. De manera particular para el extracto obtenido desde la flor de *D. stramonium* se obtuvo en promedio para todas las réplicas un 90% de inhibición, mientras el extracto de las semillas presentó una inhibición del 100 % para todas las réplicas. Lo anterior es acorde con lo reportado por otros autores como los anteriormente nombrados sobre el efecto de *D. stramonium* en plagas del tomate por hongos. (Sahu et al., 2014; Ravikumar & Garampalli, 2013).

Caracterización química de los extractos

El estudio de la composición química de los extractos de la flor y la semilla de la planta *Datura stramonium* por cromatografía líquida HPLC permitió inferir sobre la polaridad de los compuestos presentes en los extractos y sus longitudes de onda de absorción en el rango ultravioleta.

Según los cromatogramas obtenidos a una longitud de onda de 254 nm (Figuras 4 y 5), en los dos extractos se observa un pico pronunciado en un tiempo de retención de 14 min para el extracto de la flor (Figura 4) y 16 minutos para el extracto de la semilla (Figura 5), estos picos de acuerdo a los tiempos de retención y a su apariencia son compuestos de polaridad media que poseerían una estructura similar dado que los tiempos de retención en ambos cromatogramas son muy cercanos, pero no se trata de la misma sustancia porque los tiempos de retención no coinciden. Según la revisión bibliográfica es normal que los extractos de los alcaloides tropanicos presentes fueron espectros

con tiempos de retención de hasta 2 minutos familia química (alcaloides) pero que son de diferencia indicando que son de la misma diferentes sustancias.

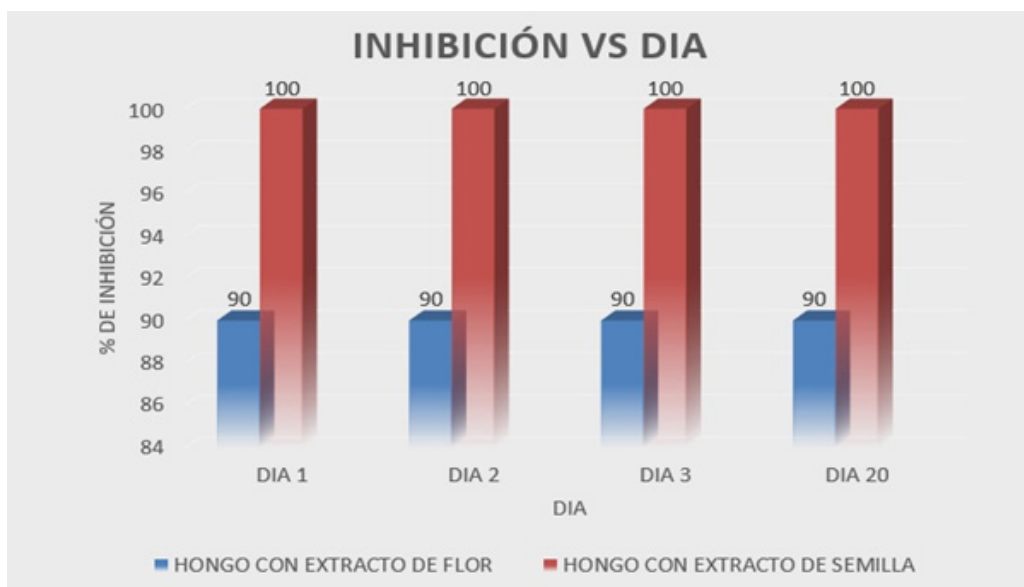


Figura 2. Porcentajes de inhibición de los extractos de la flor y la semilla de la planta *Datura stramonium* sobre los hongos del tomate. Elaboración Propia



Figura 3. Inhibición del crecimiento del hongo debido a los extractos de la flor (izquierda) y la semilla (derecha), comparado con el control (centro) en medio solido PDA. Elaboración Propia

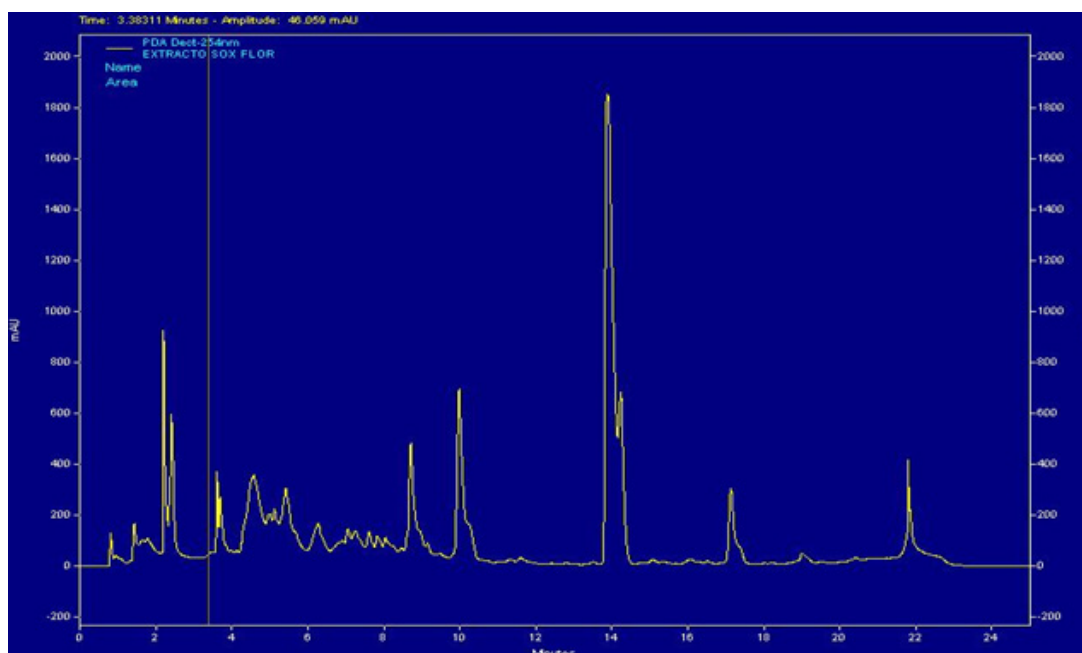


Figura 4. Cromatograma HPLC/UV del extracto de la flor de *Datura stramonium*. Fuente: HPLC.

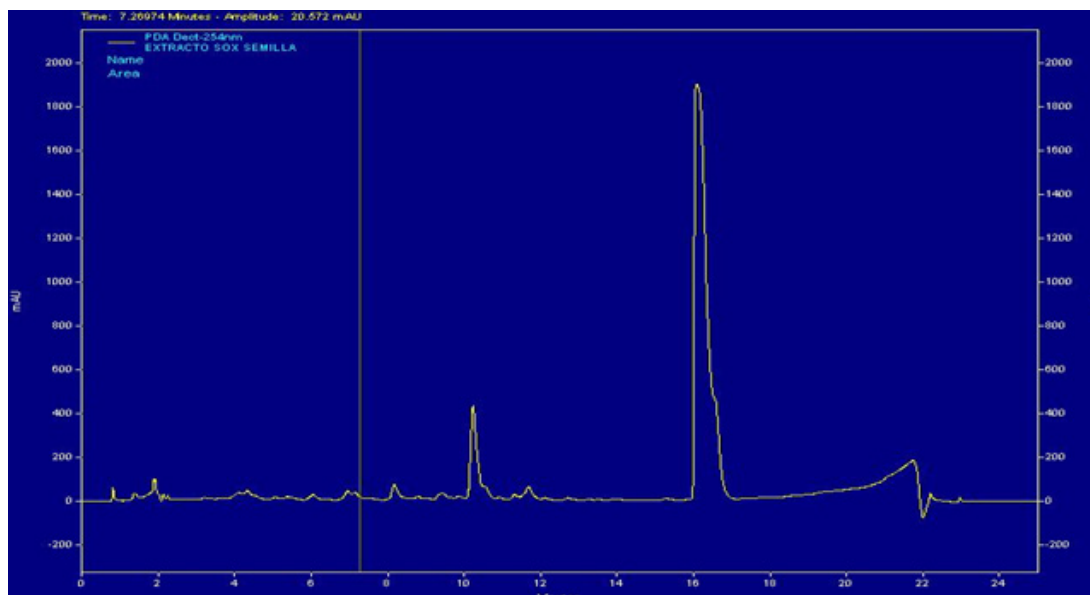


Figura 5. Cromatograma HPLC/UV del extracto de la semilla de *Datura stramonium*. Fuente: HPLC

Según el grafico de contornos en los que se superponen los cromatogramas y los espectros de cada especie (Figuras 6 y 7) se observa que las sustancias eluidas en los tiempos de retención de 14 min en el extracto de la flor y

de 16 min en el extracto de la semilla absorben luz ultravioleta en el rango de longitudes de onda de 220 nm a 260 nm, lo que indicaría la presencia de alcaloides tropánicos o derivados de la escopolamina (Hassan, 1990).

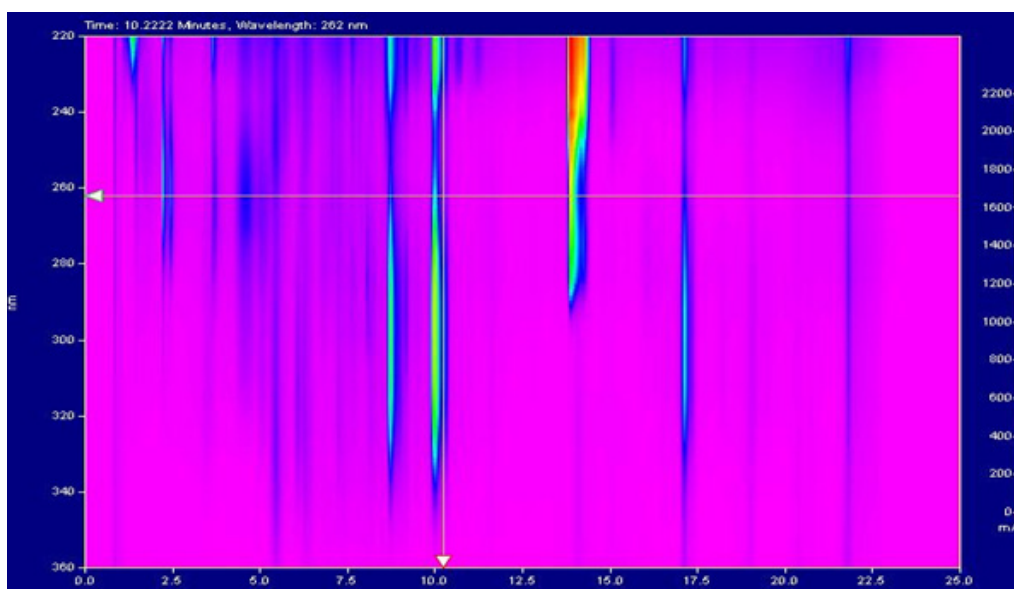


Figura 6. Diagrama de contornos Cromatograma HPLC y espectro ultravioleta del extracto de la flor de *Datura stramonium*. Fuente: HPLC

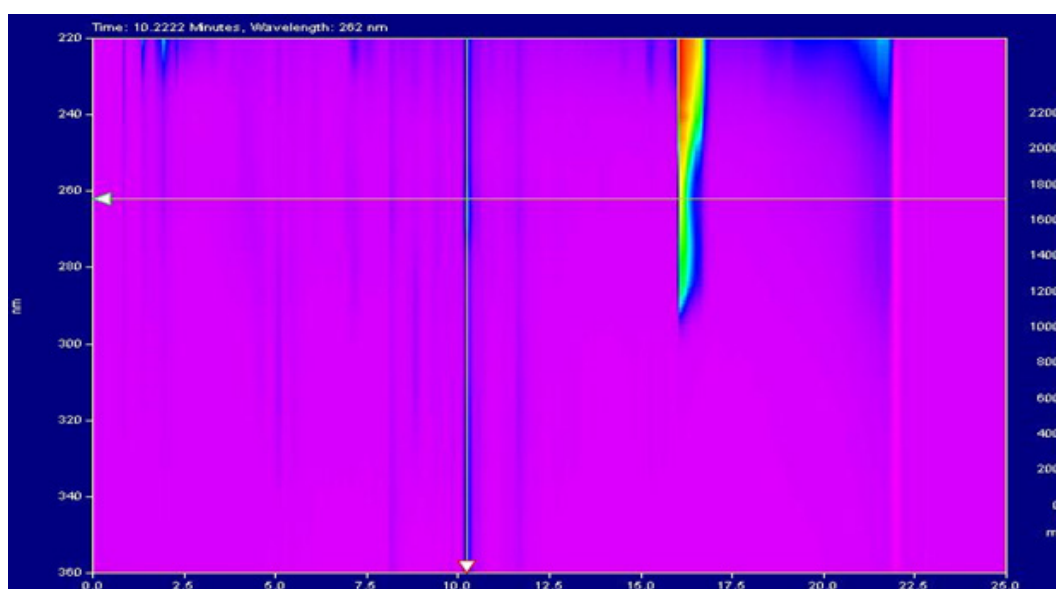


Figura 7. Diagrama de contornos Cromatograma HPLC y espectro ultravioleta del extracto de la semilla de *Datura stramonium*. Fuente: HPLC

Para tener una aproximación a los grupos funcionales presentes en las moléculas extraídas de las flores y semillas de las especies vegetales, se tomaron los espectros infrarrojos de cada uno de los extractos (Figuras 8). Allí se evidencia la presencia de los picos correspondientes a los

grupos funcionales de los alcaloides tropánicos presentados en la Tabla y que son señalados en el espectro, en el lado derecho se presentan las formulas químicas de las sustancias. de la escopolamina (Hassan, 1990).

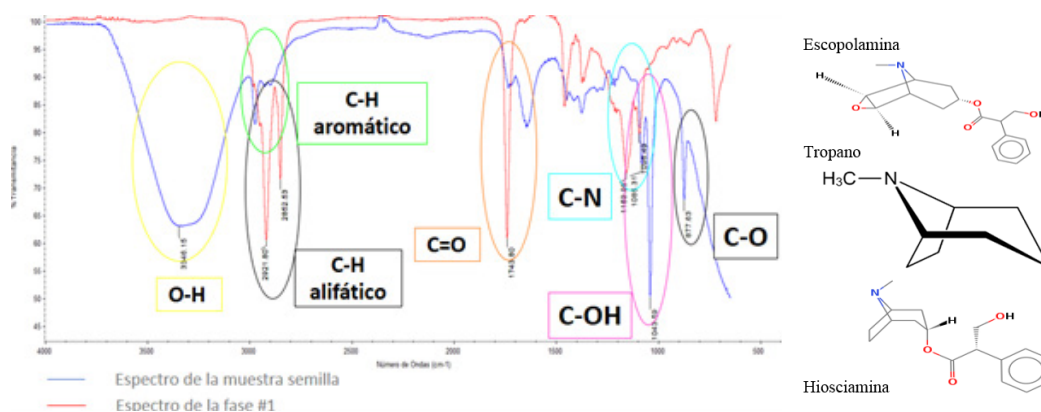


Figura 8. Espectro infrarrojo del extracto de la semilla (color azul) y de la flor (color rojo) de la planta *Datura stramonium*. Elaboración propia

Tabla. Grupos funcionales encontrados en los extractos de la flor y la semilla de la planta *Datura stramonium*.

Frecuencias (cm^{-1})	O-H (3000-3700)	C=C (1600-1675)	C=O (1735)	C-N (1000 – 1100)	C-O (1000 – 1300)
Extracto Flor	-	+	+	+	+
Extracto semilla	+	+	-	+	+

Fuente: Elaboración propia.

Conclusiones

1. Para los ensayos de laboratorio con hongos fitopatógenos del tomate los extractos de la flor y la semilla de la especie vegetal *Datura stramonium* presentan inhibición en el crecimiento del hongo de 90 y 100% respectivamente, mostrando que las sustancias extraídas si actúan como biocidas en las condiciones de preparación de los extractos.

2. Para concluir esta investigación sería importante realizar ensayos en campo donde se verifiquen los resultados obtenidos en condiciones de laboratorio y las concentraciones de aspersión que deben utilizarse, igualmente realizar la evaluación de las sustancias y sus residuales en los tomates.

3. Por las condiciones de preparación de los extractos de la flor y semilla, los ensayos de laboratorio y las caracterizaciones químicas en el HPLC y en espectroscopia infrarroja, se evidencia que los metabolitos responsables de la actividad antifúngica fue debida a los alcaloides tropánicos como Escopolamina, Tropano y Hiosciamina presentes en la especie vegetal *Datura stramonium*

Referencias

- Bobo, G. (2014). Universidad Pública de Navarra.
- Boros, B., Farkas, Á., Jakabová, S., Bacskay, I., Kilár, F., & Felinger, A. (2010). LC-MS Quantitative Determination of Atropine and

- Scopolamine in the Floral Nectar of *Datura* Species. *Chromatographia*, 71(S1), 43–49. <https://doi.org/10.1365/s10337-010-1524-y>
- Bowers, J. H., & Locke, J. C. (2004). Effect of Formulated Plant Extracts and Oils on Population Density of *Phytophthora nicotianae* in Soil and Control of *Phytophthora* Blight in the Greenhouse. *Plant Disease*, 88(1), 11–16. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2004.88.1.11>
- Etebu, E., Nwauzoma, a B., & Bawo, D. D. S. (2013). Postharvest Spoilage of Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) and Control Strategies in Nigeria. *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare*, 3(10), 51–61.
- Fao. (2007). Paying Farmers for Environmental.
- FAO. (2009). La agricultura mundial en la perspectiva del año 2050. Fao, 4. Retrieved from <http://www.fao.org/fileadmin/templates/wsfs/docs/I>
- FAO. (2010). Evaluación de los recursos forestales mundiales 2010: Informe principal. Estudio FAO Montes. In (Food and Agriculture Organization of the United Nations). [https://doi.org/ISBN 978-92-5-106654-6](https://doi.org/ISBN%20978-92-5-106654-6)
- Hassan, F. M. and M. M. A. (1990). Analytical profile of scopolamine hydrobromide. 19.
- Hernández, U. M., Politécnica, E., & Orihuela, S. D. E. (2016). Evaluacion de líneas de mejora de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) Muchamiel en distintas condiciones.
- Kagale, S., Marimuthu, T., Thayumanavan, B., Nandakumar, R., & Samiyappan, R. (2004). Antimicrobial activity and induction of systemic resistance in rice by leaf extract of *Datura metel* against *Rhizoctonia solani* and *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 65(2), 91–100. <https://doi.org/10.1016/j.pmp.2004.11.008>
- Mercurialis, L. (1996). Fungicidal Activity of Some Common Weed Extracts Against Different Plant Pathogenic Fungi. 161, 157–161.
- Ministro de Agricultura y Desarrollo Rural. (2017). Informe de rendición de cuentas Junio 2016 – Octubre 2017 Ministro de Agricultura y Desarrollo Rural Bogotá, diciembre 21 de 2017. 268.
- Musa, K., Sani, A., & Aliero, A. A. (2011). Microorganisms associated with the production of volatile compounds in spoiled tomatoes. 2(2), 82–89.
- Nashwa, S. M. a, & Abo-elyousr, K. a M. (2012). Evaluation of Various Plant Extracts against the Early Blight Disease of Tomato Plants under Greenhouse and Field Conditions. *Plant Pathology*, 48(2), 74–79. <https://doi.org/10.17221/14/2011-PPS>
- öz arık, ummahan. (2017). THE ANTIFUNGAL EFFECTS OF *DATURA STRAMONIUM* L., *D. METEL* L., *D. INNOXIA* Mill. IN FLORA OF TURKEY. *Mugla Journal of Science and Technology*, (December), 96–103. <https://doi.org/10.22531/muglajsci.345175>
- Ravikumar, M. C., & Garampalli, R. H. (2013). Antifungal activity of plants extracts against *Alternaria solani*, the causal agent of early blight of tomato. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 46(16), 1897–1903. <https://doi.org/10.1080/03235408.2013.780350>
- Rodino, S., Butu, M., Petrache, P., Butu, A., & Cornea, C. P. (2014). Antifungal Activity of Four Plants Against *Alternaria Alternata*. XVIII, 60–65.
- Sahu, D. K., Khare, C. P., & Patel, R. (2014). Eco friendly management of early blight of tomato using botanical plant extracts. *Journal of Industrial Pollution Control*, 30(2), 205–208.

Sasode, R. S., Prakash, S., Gupta, A., & Pandya, R. K. (2012). In vitro study of some plant extracts against *Alternaria brassicae* and *Alternaria brassicicola*. 4(1), 44–46.

Sharma, B., Srivastava, K. K., Verma, N., Niwas, R., & Singh, M. (2014). Antifungal potential of leaf extract of *Datura stramonium* L., against some important plant pathogenic fungi. 3(2), 659–662.

Unemployment, A. Y., Skills, S., & Programmes, C. (2011). Global Report.