

## Extractos hidroalcohólicos de *Parkinsonia aculeata* L., Sp. Pl. para el biocontrol de *Fusarium oxysporum* Schlecht

Eivy Fabiola Arvizu-Quintana, Leandris Argente-Martínez \*, Ofelda Peñuelas-Rubio, Aurelio Leyva-Ponce y Julio García-Urías

Laboratorio de Biotecnología, Departamento de Ingenierías, Tecnológico Nacional de México / Instituto Tecnológico del Valle del Yaqui, Bámuc, Sonora, México

\* Autor de correspondencia: oleinismora@gmail.com; Tel.: (00526441923560)

Recibido: 17 de agosto de 2021

Aceptado: 10 de septiembre de 2021

**Resumen:** La fusariosis, causada por el *Fusarium oxysporum* Schlecht. genera pérdidas significativas en cultivos importantes como el tomate y la sandía en el Noroeste de México, principalmente en el Estado de Sonora. Ante la necesidad de disminuir las cargas contaminantes por el uso de fungicidas comerciales, el uso de alternativas biotecnológicas ecológicas sustentables como extractos vegetales para el biocontrol de esta enfermedad es una solución parcial en los sistemas de producción orgánicos y tradicionales. El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar el potencial antifúngico de extractos hidroalcohólicos obtenidos a partir de hojas y tallos de *Parkinsonia aculeata* L., Sp. Pl. (palo verde) para el biocontrol de *Fusarium oxysporum* Schlecht. Se tomaron muestras de plantas procedentes de dos ecosistemas semiáridos (Bahía de Lobos, Sitio 1, y Tesopaco, Sitio 2) para obtener y aplicar dos volúmenes de extractos hidroalcohólicos (300 y 500 ppm) en el medio de cultivo preparado para el crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum* Schlecht en condiciones experimentales controladas. Como control se empleó agua destilada para evaluar el libre crecimiento micelial (variable dependiente) y el fungicida comercial (TIABENDAZOL) para el control total del hongo. Estos extractos se adicionaron a medios de cultivo usando la técnica de medio de cultivo envenenado. Los tratamientos se ubicaron en una cámara de crecimiento, siguiendo un diseño experimental completamente aleatorizado con arreglo trifactorial. Los extractos de *Parkinsonia aculeata* L., Sp. Pl. de ambos sitios y órganos mostraron efectividad en ambos volúmenes (300 ppm, y a 500 ppm) inhibiendo totalmente el crecimiento micelial. Existió interacción altamente significativa entre los tres factores (Sitios, órganos y volúmenes) establecidos en el experimento. La fuente de variación de mayor contribución a la variabilidad total encontrada fue el volumen en el medio de cultivo. El volumen mínimo inhibitorio de extracto hidroalcohólico fue de 289 ppm y el volumen mínimo cuadrático letal fue 444 ppm en el medio de cultivo. Los resultados obtenidos confirman la viabilidad del uso de extractos hidroalcohólicos de *Parkinsonia aculeata* L., Sp. Pl. como alternativa sustentable para el biocontrol de fusariosis en los sistemas de producción agrícola del noroeste de México.

**Palabras clave:** palo verde; fusariosis; crecimiento micelial

## Hydroalcoholic extracts of *Parkinsonia aculeata*: a sustainable alternative for the biocontrol of *Fusarium oxysporum*

**Abstract:** Fusarium, caused by *Fusarium oxysporum* Schlecht, generates significant losses in important crops in the Northwest Mexico, mainly in the State of Sonora. Given the need to reduce polluting loads due to the use of commercial fungicides, the use of sustainable ecological biotechnological alternatives such as plant extracts for disease biocontrol is a partial solution in both organic and traditional production systems. The present work aimed to evaluate the antifungal potential of hydroalcoholic extracts from leaves and stems of *Parkinsonia aculeata* L., Sp. Pl. (palo verde) for *Fusarium oxysporum* Schlecht biocontrol. Plant samples were taken from two semi-arid ecosystems (Bahía de Lobos, Site 1, and Tesopaco, Site 2). This samples were used to obtain and apply two volumes of hydroalcoholic extracts (300 and 500 ppm) in the culture medium prepared for the mycelial growth of *Fusarium oxysporum* Schlecht. As a control, distilled water was used to evaluate the free mycelial growth (dependent variable) and the commercial fungicide (TIABENDAZOL) for the total control of the fungus. These extracts were added to culture media using the poison culture medium technique. The treatments were placed in a growth chamber, following a completely randomized experimental design with a trifactorial arrangement. The extracts of *Parkinsonia aculeata* L., Sp. Pl. from both sites and volumes (300 ppm, and at 500 ppm) showed effectiveness for mycelial growth inhibition. There was a highly significant interaction between the three established factors. The source of variation with the greatest contribution to the total variability found was the volume in the culture medium. The minimum inhibitory volume of the hydroalcoholic extract was 289 ppm and the lethal least squared volume was 444 ppm in the culture medium. The obtained results confirm the viability of using hydroalcoholic extracts of *Parkinsonia aculeata* L., Sp. Pl. as a sustainable alternative for *Fusarium oxysporum* Schlecht biocontrol of in the agricultural production systems of northwestern Mexico.

**Keywords:** palo verde; fusarium; mycelial growth

## Introducción

*Fusarium oxysporum* Schlecht es una especie anamórfica que incluye cepas patógenas y no patógenas. Las formas patógenas de las plantas causan una enfermedad cuyo principal síntoma es la marchitez asimétrica y se agrupan en formas especiales según su rango de hospedadores; algunos se subdividen a su vez en razas patógenas (Peñuelas *et al.*, 2017). Muchas formas especiales están compuestas por múltiples linajes clonales y, en algunos casos, una raza patógena se asocia con más de un linaje clonal, lo que sugiere orígenes independientes. La mayoría de las apariciones nuevas de marchitez por *Fusarium* parecen ser el resultado de una introducción reciente, independiente del patotipo. La propagación asexual es la influencia dominante en la estructura de la población en *F. oxysporum* y no es probable que la ausencia de reproducción sexual evite que este patógeno continúe infligiendo daños importantes a los cultivos hospedantes susceptibles (Gordon, 1997). Mientras que las no patógenas son endófitas de las raíces y bases del tallo en la rizósfera de las plantas o en la base de los tallos pero no causan daños significativos y en ocasiones inhiben el desarrollo de formas patogénicas (Sajeena *et al.*, 2020).

Para el manejo de esta enfermedad es común el uso de fungicidas químicos. Sin embargo, las aplicaciones de estos productos se hacen sin considerar el efecto que producen sobre organismos biocontroladores y otros que contribuyen a la descomposición de la materia orgánica. Además no siempre se tiene en cuenta el daño que ocasionan estas aplicaciones al medio ambiente (Rodríguez, 2020). Uno de los cultivos donde se realizan altas dosis de fungicidas es el tomate (*Solanum lycopersicum* L.).

El tomate es ampliamente cultivado en condiciones de agricultura protegida en México y el estado de Sonora tiene una contribución del 26% a la producción nacional, siendo el segundo estado de mayores volúmenes de exportación a Estados Unidos y a países asiáticos (Valenzuela-Escoboza *et al.*, 2015). Recientemente, hace una década, se ha informado la presencia significativa de *Fusarium oxysporum* Schlecht y un detrimento de la diversidad de hongos benéficos debido a las altas dosis de fungicidas que han generado resistencia por parte de *F. oxysporum* y sensibilidad por parte de otros microorganismos de naturaleza fúngica (Martínez *et al.*, 2019). Los daños que causa el *Fusarium oxysporum* Schlecht en el cultivo de tomate generan un impacto negativo mayor del 30% en la economía regional y nacional (Carmona y Sautua, 2017), por lo que urge usar diversos mecanismos y manejos para su control.

Ante el incremento de las poblaciones de cultivos agrícolas, en condiciones de cultivo protegido y a campo abierto, con problemas de fusariosis en el noroeste de México, y la necesidad de disminuir las cantidades de productos químicos a aplicar tanto en sistemas de producción convencional como orgánicos, se impone la necesidad de explorar alternativas económicas y ecológicamente viables para generar nuevos productos con baja residualidad y alta efectividad que no contaminen al ambiente o en su defecto que los daños sea mínimos. El uso de extractos vegetales de diversas especies, como el de plantas del género *Brassica* para el control del *Fusarium oxysporum* Schlecht. ha sido un aporte significativo a la reducción de las dosis de fungicidas a aplicar en el cultivo del tomate (Campanella *et al.*, 2020). Sin embargo no se tienen referencias documentadas sobre el uso de la especie *Parkinsonia aculeata* L., Sp. Pl. para el control de este patógeno.

Por lo anterior, en la presente investigación se evaluó el potencial antifúngico de extractos hidroalcohólicos de tallos y hojas *Parkinsonia aculeata* L., Sp. Pl. obtenidas en regiones con condiciones edafoclimáticas contrastantes (húmedo halófito y seco glicófito) y comprobar si los metabolitos secundarios sintetizados en estas condiciones contribuyen al control de *Fusarium oxysporum* Schlecht.

## Materiales y Métodos

### Obtención de la cepa de *Fusarium oxysporum* Schlecht.

La cepa se aisló previamente de la corona del tallo de plantas de tomate de la variedad Heirloom var. Brandy Pink que presentaban sintomatología típica de fusariosis. Una vez purificada la cepa mediante cultivos monospóricos, se caracterizó mediante la comparación de sus características coloniales y morfológicas con el uso de literatura especializada (Peñuelas-Rubio *et al.*, 2017; Leslie y Sumerell, 2016). Una acepción del aislado se encuentra conservada a -80 °C en la Colección de Microorganismos de la Rizósfera del Instituto Tecnológico del Valle del Yaqui.

### Obtención del extracto hidroalcohólico

El material vegetal fue extraído de plantas de *Parkinsonia aculeata* L., Sp. Pl. procedentes de dos sitios experimentales. Un sitio donde predominan condiciones de alta salinidad en la localidad de Bahía de lobos, en el municipio San Ignacio, Río Muerto (27°35.6'27" N, 110° 39'87" W) y el segundo sitio, en el Municipio del Rosario, Tesopaco, (27°50'41" N, 109° 22'12" W) con condiciones de sequía extrema, ambos municipios pertenecientes al estado de Sonora,. Se tomaron muestras, al azar, de diferentes árboles hasta completar una masa de 100 gramos de hojas y tallos para preparar un litro extracto fluido empleando como solvente alcohol al 76%. El material vegetal se mantuvo en agitación a total oscuridad durante 10 días y posteriormente se procedió a eliminar el solvente en un rotavapor, BUCHI, R-215. La eficiencia de obtención del solvente fue de 76%. El extracto hidroalcohólico obtenido tuvo un pH de 6.8 y una conductividad eléctrica de 0.63 dS m<sup>-1</sup>.

### Bioensayo in vitro

Se utilizó el método de medio envenenado (Guerrero-Rodríguez *et al.*, 2007), que consiste en verter los extractos (considerando el volumen correspondiente a cada tratamiento, ver Tabla 1) al medio de cultivo papa dextrosa agar (ADP) en cajas petri estériles de 5 cm de diámetro; posterior a la solidificación del medio, se sembró por picadura central una muestra del margen de crecimiento vigoroso de la cepa de *Fusarium oxysporum* Schlecht. de 12 días de edad. El periodo de incubación fue de 7 días a 28 °C.

A los siete días de incubación (cuando el testigo alcanzó el 100% del crecimiento) se determinó el crecimiento micelial, midiendo y promediando dos diámetros cruzados (cm). El porcentaje de inhibición se determinó a través de la siguiente fórmula (Ecuación 1):

$$\%I = \left( dc - \frac{dt}{dt} \right) * 100 \quad (1)$$

Donde: dc es el diámetro promedio del crecimiento micelial del control y dt es el diámetro del crecimiento micelial con los diferentes extractos (Peñuelas *et al.*, 2017).

### Tratamientos y diseño experimental.

Los tratamientos se conformaron mediante la combinación de tres fuentes de variación: sitio de donde procedían las muestras: Bahía de lobos (BL) y Tesopaco (TES); órganos: hojas (HO) y tallos (TA) y volúmenes a emplear: 300 ppm y 500 ppm (Tabla 1). Como control se empleó agua destilada y como control químico se empleó el fungicida comercial Tecto 60 – Syngenta (Ingrediente activo: Tiabendazol: 2-(4-Tiazolil)-1H-benzimidazol). El experimento se estableció en condiciones controladas siguiendo un diseño completamente aleatorizado con arreglo trifactorial con tres repeticiones por cada tratamiento.

Tabla 1. Tratamientos establecidos

Tratamiento	Sitio	Órgano	Volumen (ppm)
T1	BL	HO	300
T2	BL	HO	500
T3	BL	TA	300
T4	BL	TA	500
T5	TES	HO	300
T6	TES	HO	500
T7	TES	TA	300
T8	TES	TA	500
T9	PQ	-	500
T10	H2O	-	500

BL: Bahía de Lobos; TES: Tesopaco; HO: hojas; TA: Tallos; PQ: producto químico

## Siembra de esporas

Una vez gelificado el medio de cultivo se procedió a la siembra de las esporas en el centro de la placa. Para ello, se tomaban muestras del hongo conservado en placas con cepas puras de *Fusarium oxysporum* Schlecht. raspando suavemente las esporas con una asa, marca *Sart*, y ubicándola en la posición central. Finalmente, se sellaron las cajas Petri con parafilm y se colocaron en una incubadora marca *Temple 17-WL USA*, programada a 28°C por 7 días.

## Análisis estadístico

Con los datos obtenidos de cada tratamiento se determinaron las medias, su desviación estándar y se realizó un análisis de varianza de clasificación doble, con arreglo trifactorial, basado en un modelo lineal de efectos fijos (Fisher, 1937) para niveles de significancia de 5 y 1%. Cuando se encontraron diferencias entre tratamientos, se utilizó la comparación múltiple de medias de Tukey para niveles de significancia de 5% y 1% (Tukey, 1960). Se determinaron los porcentajes de contribución (coeficientes de determinación sin ajustar:  $R^2$ ) de las diferentes fuentes de variación y sus interacciones, para identificar la fuente de variación que aportó en mayor porcentaje a la variabilidad total encontrada el control del crecimiento micelial del hongo. Asimismo, se determinó el error estándar medio general (EE) de los tratamientos y el coeficiente de variación (CV) para obtener información estadística y biológica de la variabilidad del efecto de los tratamientos. Se realizaron análisis de regresión lineal simple para determinar el volumen mínimo cuadrático letal y la concentración mínima inhibitoria del crecimiento micelial. Se empleó para estos análisis el paquete estadístico profesional ESTATISTICA, versión 12, para Windows (Statsoft, 2013).

## Resultados y Discusión

### Análisis de varianza de los tratamientos establecidos

Existieron diferencias altamente significativas entre las medias de los tratamientos establecidos, por tanto se rechaza la hipótesis nula sobre la similitud del efecto de diferentes volúmenes del extracto hidroalcohólico en el crecimiento micelial del *Fusarium oxysporum* Schlecht., lo cual sugiere que a mayor volumen de extracto se puede obtener un mayor control del patógeno. Al analizar los factores aislados se encontró diferencias altamente significativas entre los sitios y los órganos de donde se tomó el material vegetal para obtener los extractos. Además, existieron diferencias altamente significativas entre los volúmenes establecidos (Tabla 2).

Tabla 2. Análisis de varianza de 10 tratamientos establecidos respecto al crecimiento micelial del *Fusarium oxysporum* Schlecht. (SS: suma de cuadrados; GL: grados de libertad; CM: cuadrados medios, F: Valor de F de Fisher calculado; P probabilidad).

Fuentes de Variación	SC	GL	CM	F	p
Sitios	0.60	1	0.60	8.86	0.008907**
Órganos	0.81	1	0.81	11.88	0.003319**
Volumen	8.64	1	8.64	127.23	0.000000**
Sitios*Órganos	6.83	1	6.83	100.51	0.000000**
Sitios*Volumen	0.33	1	0.33	4.81	0.043421*
Órganos*Volumen	1.23	1	1.23	17.89	0.000638**
Sitios*Órganos*Volumen	7.94	1	7.93	116.83	0.000000**
Error	1.09	16	0.07		

\* y \*\* representan diferencias significativas y altamente significativas, respectivamente.

Al analizar las interacciones entre las tres fuentes de variación, se obtuvo una interacción altamente significativa entre los sitios\*órganos, entre los órganos\*volumen y entre los sitios\*órganos\*volumen. Por su parte, la interacción sitios\*volumen fue solo significativa.

### Contribución de las fuentes de variación a la variabilidad total

La variabilidad total encontrada en la disminución del crecimiento micelial fue explicada en un 2% por efecto de los sitios y los órganos empleados; mientras que, por efecto del volumen se explicó el 31.5 % de la variabilidad total. Las interacciones de mayor contribución a la variabilidad total fueron Sitios\*Órganos y Sitios\*Órganos\*Volumen, en un

24% y 28% respectivamente (Tabla 3). El modelo matemático empleado fue efectivo en un 96% para evaluar la variabilidad del crecimiento micelial del *Fusarium oxysporum* Schlecht. Ante los tratamientos establecidos ( $R^2=0.96$ ).

Tabla 3. Contribución de las fuentes de variación establecidas en el experimento a la variabilidad total del crecimiento micelial del *Fusarium oxysporum* Schlecht. ( $R^2$ : coeficiente de determinación sin ajustar)

Fuentes de variación	$R^2$	%
Sitios	0.02	2.2
Órganos	0.03	2.9
Volumen	0.32	31.5
Sitios*Órganos	0.25	25
Sitios*Volumen	0.01	1
Órganos*Volumen	0.04	4
Sitios*Órganos*Volumen	0.29	29
Variabilidad total	0.96	96.0

### Comparación múltiple de medias de los tratamientos

Mediante la comparación múltiple de medias del crecimiento micelial del *Fusarium oxysporum* Schlecht. se observó que los tratamientos T2, T7, T4 T6 no presentaron diferencias estadísticas ( $P \geq 0.001$ ) respecto al control químico (T9). Este resultado evidencia la factibilidad del uso de estos extractos, ya sea a partir de hojas como de tallos a concentraciones entre 300 y 500 ppm para la inhibición del crecimiento micelial del hongo. Un resultado importante a tener en cuenta fue que cuando se usó material vegetal procedente del suelo salino con pH de 6.8 (en Bahía de Lobos) el efecto sobre el control del crecimiento micelial fue mayor a una concentración de 500 ppm. Este resultado indica que las plantas en condiciones de salinidad sintetizan en mayor medida o tienen más concentrados los principios activos que controlan al *Fusarium oxysporum* Schlecht. En contraposición a lo anterior, el extracto obtenido a partir de las muestras tomadas en la condición de sequía extrema (en Tesopaco) no realizó un control del 100% del crecimiento micelial cuando se trabajó con volúmenes de 300 ppm tanto para tallos como para hojas (Tabla 4).

Tabla 4. Medias del crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum* Schlecht. en los tratamientos establecidos.

Tratamiento	Sitios	Órganos	Volumen	Crecimiento micelial	Superíndice
9	PQ	-	-	0.00	a
2	Bahía de lobos	Hojas	500ppm	0.00	a
7	Tesopaco	Tallos	300ppm	0.00	a
4	Bahía de lobos	Tallos	500ppm	0.00	a
6	Tesopaco	Hojas	500ppm	0.00	a
8	Tesopaco	Tallos	500ppm	0.16	b
1	Bahía de lobos	Hojas	300ppm	0.27	b
3	Bahía de lobos	Tallos	300ppm	1.67	b
5	Tesopaco	Hojas	300ppm	3.03	c
10	H <sub>2</sub> O	-	-	3.5	d

Letras diferentes en la última columna indican diferencias estadísticas entre los tratamientos para  $p < 0.001$  por Tukey, 1960. (PQ: producto químico; H<sub>2</sub>O: agua).

En los tratamientos T2, T7; T4 y T6 se encontró un control total del *F. oxysporum* (Figura 1), sin diferencias estadísticas respecto al producto químico empleado (T9), lo que denota la factibilidad del uso de la solución hidroalcohólica para la inhibición total del crecimiento micelial.

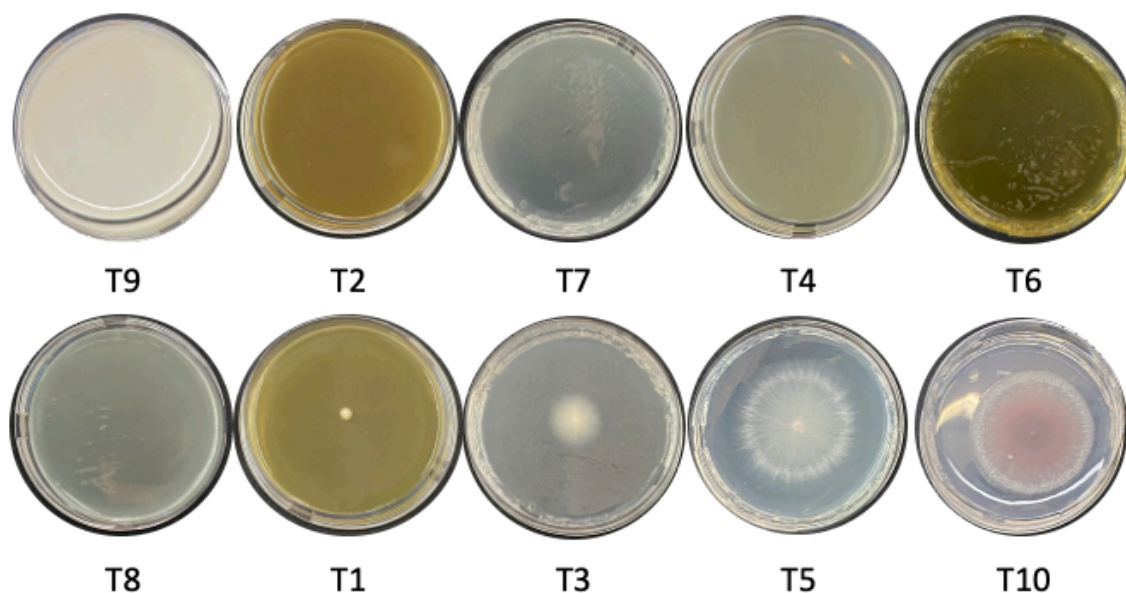


Figura 1. Tratamientos establecidos en el presente estudio y el crecimiento micelial del *Fusarium oxysporum* Schlecht. En condiciones controladas.

Existió correlación negativa y altamente significativa entre el volumen de extracto aplicado y el crecimiento micelial para ambos sitios de donde se tomaron las muestras de material vegetal. Este resultado reafirma que a incrementos del volumen se asocia una mayor reducción del crecimiento micelial del patógeno (Tabla 5). El estudio demuestra que por cada 100 ppm adicionales a los volúmenes aplicados disminuirá en 1 cm el diámetro del micelio de *Fusarium oxysporum* Schlecht. Existió menor bondad de ajuste ( $R^2=0.98$ ) de los datos obtenidos cuando se aplicó extracto procedente del sitio bahía de Lobos que en los de Tesopaco, aun así fue mayor el efecto del extracto procedente de Bahía de Lobos.

Tabla 5. Ecuaciones de regresión entre el volumen de extracto (V) en los sitios Bahía de Lobos (BL) y Tesopaco (TE) y el crecimiento micelial (CM) del *Fusarium oxysporum* (promedio entre hojas y tallos). [r: coeficiente de correlación lineal;  $R^2$ : coeficiente de determinación, VMI volumen mínimo inhibitorio; VML: volumen máximo letal]

Sitio	Ecuación de regresión	r	$R^2$	VMI (ppm)	VML (ppm)
BL	CM = 3.38 - 0.01*V	-0.99**	0.98	288	437
TE	CM = 3.52 - 0.01*V	-0.99**	0.99	290	450

\*\* en r : significativo para  $p < 0.01$ .

Los extractos obtenidos en el sitio de Bahía de Lobos presentaron mayor capacidad de biocontrol de *Fusarium oxysporum* Schlecht. ya que el volumen mínimo letal fue más bajo que en los extractos procedentes de Tesopaco. Este resultado alude a que la condición donde se desarrollan las plantas permite sintetizar algún metabolito que es más efectivo para controlar el patógeno. Aun así, cuando se aplica un volumen de 288 ppm (Tabla 5) como promedio entre los extractos se logra inhibir el desarrollo del *Fusarium oxysporum* Schlecht. en su totalidad usando extractos de ambos sitios. Por otra parte, el volumen cuadrático medio letal entre los extractos fue de fue de 444 ppm, existiendo un mejor resultado cuando se aplicó el extracto procedente de Bahía de lobos. Este resultado demuestra la aplicación práctica que puede tener el uso del extracto hidroalcohólico *Parkinsonia aculeata* L., Sp. Pl. para el control de un hongo que ocasiona considerables pérdidas económicas en la agricultura tanto de campo abierto y como de condiciones de cultivo protegido, donde las dosis de aplicación de productos químicos son considerablemente altas. Además desde el punto de vista ecológico, su uso contribuiría a la disminución de la aplicación de fungicidas que dañan el ambiente y que pueden afectar o eliminar otras especies de microorganismos que pueden ser benéficos y que de alguna manera desempeñan un rol funcional en los ecosistemas (Heredia-Acuña *et al.*, 2014).

## Conclusiones

Los extractos de *Parkinsonia aculeata* L., Sp. Pl. evaluados mostraron efectividad a partir de las 300 ppm, pero a las 500 ppm se logró una inhibición total del crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum* Schlecht. en las pruebas *in vitro* realizadas. Lo anterior se considera aceptable, ya que constituye la primera etapa para el desarrollo de un biofungicida.

Las muestras obtenidas del sitio experimental de Bahía de Lobos fueron más efectivas para controlar el *Fusarium oxysporum* Schlecht. lo que demuestra que la condición de salinidad existente en la región conduce a la producción de algún compuesto orgánico, o quizás mayor concentración en *Parkinsonia aculeata* L., Sp. Pl. que propicia un mejor control del *Fusarium oxysporum* Schlecht. Los resultados obtenidos pueden contribuir a disminuir las pérdidas económicas que genera este patógeno en el cultivo del tomate.

El volumen mínimo inhibitorio de extracto hidroalcohólico a aplicar para el control del hongo fue de 288 ppm y el volumen mínimo cuadrático letal fue 444 ppm. Estos resultados permiten establecer un volumen promedio de 370 ppm para detener el crecimiento micelial de este patógeno que causa daños significativos en la agricultura y en particular en el cultivo del tomate en el noroeste de México.

## Bibliografía

- Campanella, V.; Mandal, C.; Angileri, V. and Miceli, C. 2020. Management of common root rot and *Fusarium* foot rot of wheat using *Brassica carinata* break crop green manure. Crop Protection. 130:105073. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2019.105073>.
- Carmona, M. y Sautua, F. 2017. La problemática de la resistencia de hongos a fungicidas. causas y efectos en cultivos extensivos. Rev. Facultad de Agronomía UBA. 37(1):1-19.
- Fisher RA. 1937. The Design of Experiments. Edinburgh; London: Oliver and Boyd.
- Gordon, Martyn. 1997. Biología evolutiva de *Fusarium Oxysporum*. Revisión anual de fitopatología. Vol. 35:111.
- Guerrero-Rodríguez, E., Solís-Gaona, S., Hernández-Castillo, F., Flores-Olivas, A., Sandoval-López, V. y Jasso-Cantú, D. 2007. Actividad biológica *in vitro* de extractos de *Flouren- cia cernua* D.C. en patógenos de postcosecha; *Alternaria alternata* (Fr.:Fr) Keissl., *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y *Penicillium digitatum* (Pers.:Fr) Sacc. Revista Mexicana de Fitopatología, 25(1), 48-53. <http://www.redalyc.org/pdf/612/61225107.pdf>.
- Heredia-Acuña, C., Alarcón, A., Hernández-Cuevas, L. V., Ferrera-Cerrato, R., & Almaraz-Suarez, J. J. (2014). Diversidad, ecología e importancia potencial de los hongos endófitos septados oscuros en México. *Botanical Sciences*, 92(3), 321-333.
- Leslie, J. and Summerell, B. 2006. The *Fusarium* laboratory manual. Blackwell Publishing. USA. 388 p. <https://doi.org/10.1002/9780470278376>
- Martínez-Ruiz, F. E., Andrade-Bustamante, G., Aispuro Hernández, E., Hernández-Montiel, L. G., Holguín Peña, R. J., & Rueda-Puente, E. O. 2019. Antisuero vs hongos fitopatógenos en el cultivo de tomate en Sonora, México. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 10(4), 873-884.
- Peñuelas-Rubio, O., Arellano-Gil, M., Verdugo-Fuentes, A., Chaparro-Encinas, L., Hernández-Rodríguez, S. and Martínez-Carrillo, J. 2017. Larrea tridentata extracts as an ecological strategy against *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* in tomato plants under greenhouse conditions. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 35(3), 360-377. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1703-3>
- Rodríguez, A. P. (2020). *Compatibilidad de fungicidas químicos, biológicos y de origen vegetal sobre el hongo benéfico Trichoderma harzianum, controlador de Fusarium oxysporum en plantas de tomate (Solanum lycopersium)*. Recuperado de: <http://hdl.handle.net/20.500.12010/8628>.
- Sajeena, A., Deepthi S. Nair, and K. Sreepavan. 2020. "Non-pathogenic *Fusarium oxysporum* as a biocontrol agent." *Indian Phytopathology* 73.2: 177-183. <https://doi.org/10.1007/s42360-020-00226-x>
- StatSoft, I. (2013). Electronic statistics textbook. *ESTADÍSTICA* Version 12. URL <http://www.statsoft.com/textbook>. TULSA, OK, USA , 2013.
- Tukey JW. 1960. A survey of sampling from contaminated distributions. In: Olkin I (ed) *Contribution to Probability and Statistics: Essays in Honor to Harold Hotelling*. Redwood City: Stanford University Press, pp. 448-485.
- Valenzuela-Escoboza, F. A., Reyes-Olivas, Á., Cortez-Mondaca, E., Bautista-Martínez, N., Lomelí-Flores, J. R., Palacios-Torres, R. E., & Palacios-Mondaca, C. A. 2015. Identification of Leaf Miner1 and Its Parasitoids