

Evaluación *in vitro* de la actividad antifúngica de cuatro extractos vegetales metanólicos para el control de tres especies de *Fusarium* spp.

Evaluation *in vitro* of the anti-fungal activity of four methanol plant extracts for the control of three species of *Fusarium* spp.

Ochoa Fuentes YM¹, E Cerna Chávez¹, J Landeros Flores¹, S Hernández Camacho²,
JC Delgado Ortiz¹

Resumen. El objetivo de la investigación fue evaluar la actividad antifúngica *in vitro* de los extractos de pirul (*Shinus molle*), chirimoya (*Annona cherimola*), canela (*Cinnamomum zeylanicum*) y tabaquillo (*Nicotiana glauca*) sobre el crecimiento micelial y esporulación de *Fusarium oxysporum*, *Fusarium culmorum* y *Fusarium solani*. El trabajo de investigación se realizó en la Universidad Autónoma de Aguascalientes (UAA), y en la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN). Las cepas de *Fusarium* fueron previamente identificadas en el Laboratorio de Parasitología de la UAA. Los extractos fueron obtenidos en el Laboratorio de Toxicología de la UAAAN. Para determinar la inhibición del crecimiento micelial, dosis efectiva media (ED₅₀) y número de conidios, se utilizó la metodología de medio envenenado, donde se evaluaron diversas concentraciones de los extractos. Los resultados mostraron que los extractos de chirimoya y canela presentaron efecto inhibitorio sobre el crecimiento micelial y esporulación. En contraste, los extractos de tabaquillo y pirul no mostraron efecto inhibitorio sobre el crecimiento micelial. Sin embargo, el primero de ellos incrementó la producción de conidios al incrementarse la concentración del extracto. En relación a la ED₅₀ el extracto de canela controló las tres especies en estudio a dosis de 330,34 a 538,63 ppm. Por otro lado, el extracto de chirimoya presentó el mejor control a 593 ppm contra *F. culmorum*, mientras que para *F. oxysporum* y *F. solani* se requirieron dosis de 2060 a 2571 ppm, respectivamente. Los extractos de canela y chirimoya presentaron efecto en la inhibición micelial y esporulación de *F. oxysporum*, *F. culmorum* y *F. solani*.

Palabras clave: *Fusarium oxysporum*; *Fusarium culmorum*; *Fusarium solani*; México.

Abstract. We evaluated the *in vitro* antifungal activity of extracts of peruvian peppertree (*Shinu molle*), cherimoya (*Annona cherimola*), cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) and tobacco (*Nicotiana glauca*) on the mycelial growth and sporulation of *Fusarium oxysporum*, *Fusarium culmorum* and *Fusarium solani*. The research was conducted at the Universidad Autónoma de Aguascalientes (UAA) and the Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN). The species of *Fusarium* were previously identified in the UAA Laboratory of Parasitology. The extracts were obtained in the laboratory of Toxicology of the UAAAN. The methodology of poisoned culture medium was used to determine the (1) inhibition of mycelial growth, (2) average effective dose (ED₅₀) and (3) number of conidia at various concentrations of the extracts. The cherimoya and cinnamon extracts exhibited inhibitory effects on mycelial growth and sporulation. In contrast, tobacco and Peruvian peppertree extracts did not show any inhibitory effect. However, the first of them increased conidia production when extract concentration was increased. In relation to ED₅₀, cinnamon extracts were effective to control *Fusarium* species in doses of 330 to 539 ppm. On the other hand, the best control of the cherimoya extract was at 593 ppm against *F. culmorum*, while higher doses from 2060 to 2571 ppm were required to control *F. oxysporum* and *F. solani*, respectively. We conclude that cinnamon and cherimoya extracts showed inhibitory effects on the mycelial growth and sporulation of *F. oxysporum*, *F. culmorum* and *F. solani*.

Keywords: *Fusarium oxysporum*; *Fusarium culmorum*; *Fusarium solani*; Mexico.

¹ Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Departamento de Parasitología, Buenavista, Saltillo, Coahuila, C.P. 25315, México.

² Universidad Autónoma de Aguascalientes, Centro de Ciencias Agropecuarias, Departamento de Fitotecnia, Posta zootécnica, Jesús María, Aguascalientes, C.P. 20900, México.
Address Correspondence to: Yisa María Ochoa Fuentes. Phone (01) 449 9650062 Ext 8107, e-mail: yisa8a@yahoo.com ; ymochoa@correo.uaa.mx
Recibido / Received 8.II.2010. Aceptado / Accepted 9.IX.2011.

INTRODUCCIÓN

Una de las enfermedades más destructivas de la mayoría de las ornamentales, cultivos hortícolas en invernadero, así como en campo abierto es causada por *Fusarium* spp. (Tjamos y Beckman, 1989). El tejido vascular de la raíz y los tallos es colonizado por el crecimiento de la hifa y movimiento de conidias en el flujo de transpiración. Los síntomas iniciales aparecen como clorosis y distorsión de las hojas bajas. La marchitez afecta a la planta, presentándose una decoloración vascular y necrosis en los tallos; ésta se da a medida que el patógeno avanza, llegando a ocasionar la muerte de la planta. El género *Fusarium* contiene numerosas especies fitopatogénicas como lo son: *Fusarium oxysporum*, *Fusarium culmorum* y *Fusarium solani* siendo estos algunos de los principales fitopatógenos en cereales, ornamentales y hortalizas (Giraud et al., 2002). Debido a que *Fusarium* es un habitante común del suelo, es posible que diversas especies patogénicas y no patogénicas, incluyendo especies productoras de micotoxinas, se encuentren asociadas a pudriciones de raíces. El esfuerzo de los productores por manejar esta problemática los ha conducido a la búsqueda de alternativas de manejo, debido al bajo control que presenta el uso de productos agroquímicos sintéticos. Sumado a esto, las múltiples aplicaciones de dichos agroquímicos pueden acarrear diferentes problemas, entre los que destacan la toxicidad en humanos (Paulitz y Bélanger, 2001; Whalen et al., 2003), detenciones de exportaciones por residuos en productos, daños al medio ambiente (Ramírez y Jacobo, 2002) y efectos perjudiciales en organismos benéficos (Anderson et al., 2003). Más aún, los fitopatógenos podrían desarrollar resistencia a ingredientes activos de los fungicidas sintéticos, requiriendo el uso de altas dosis y la búsqueda de nuevos agroquímicos para reemplazar a los que han mostrado resistencia en hongos (Bajwa et al., 2003; Chapagain et al., 2007). Debido a la problemática que presenta el uso indiscriminado de los fungicidas sintéticos, es necesario desarrollar alternativas naturales para el control de enfermedades. Una de estas estrategias es el uso de extractos vegetales y/o aceites esenciales. Además, estos poseen origen biológico, son biodegradables y manifiestan un mínimo impacto (negativo) sobre la salud humana y el ambiente (Bravo et al., 2000). De tal manera, en el presente trabajo se consideraron aspectos para buscar una alternativa de manejo utilizando insumos de menor impacto ambiental, pero con alta efectividad, para integrarla a las prácticas del manejo de *Fusarium* spp. En esta investigación se trabajó con extractos de las plantas *Schinus molle*, *Annona cherimola*, *Cinnamomum zeylanicum* y *Nicotiana glauca* quienes han mostrado actividad antifúngica (Hernández et al., 2007; Ayala et al., 2008). Los objetivos de este trabajo fueron evaluar *in vitro* los efectos de extractos de *Annona cherimola*, *Nicotiana glauca*, *Schinus molle* y *Cinnamomum zeylanicum* sobre el crecimiento micelial y esporulación de *Fusarium oxysporum*, *Fusarium culmorum* y *Fusarium solani*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación del experimento. El trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Parasitología Agrícola del Centro de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma de Aguascalientes (UAA), con la colaboración de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN) en el período de Enero - Diciembre del 2009.

Fitopatógenos. Las cepas de *Fusarium oxysporum*, *Fusarium culmorum* y *Fusarium solani*, fueron aisladas, purificadas e identificadas en el Laboratorio de Parasitología de la UAA.

Obtención de extractos evaluados. Los cuatro extractos evaluados fueron obtenidos en el Laboratorio de Toxicología del Departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro Unidad-Salttillo. La recolección de *Annona cherimola*, *Nicotiana glauca* y *Schinus molle* se llevó a cabo en los estados de Michoacán y Coahuila, México y para *Cinnamomum zeylanicum* se utilizó material comercial; para las tres especies arriba mencionadas se utilizaron las tres primeras hojas y para el último corteza. Dicho material se secó, se maceró (100 g de vegetal en 400 mL de metanol al 99%), y dejó en agitación por dos semanas. La mezcla fue filtrada para finalmente separar el extracto de la planta y el disolvente con la ayuda de un rotavapor Büchi®. El extracto puro fue envasado en un frasco ambar y se colocó en refrigeración (4 °C) para su conservación.

Evaluación de los extractos vegetales. Se evaluaron los cuatro extractos vegetales arriba mencionados, sobre *F. oxysporum*, *F. culmorum* y *F. solani*. Para ello, se utilizó la metodología de medio de cultivo envenenado, utilizando las siguientes dosis: canela: 50, 100, 150, 200, 250 y 300 ppm; chirimoya: 2000, 4000, 6000 y 10000 ppm; tabaquillo: 1000, 2000, 4000, 6000, 8000 y 10000 ppm, y Pirul: 500, 1000, 2000, 4000, 6000, 8000 y 10000 ppm. Para la obtención de las dosis se tomó el extracto a una concentración del 100%, y luego se realizaron diluciones utilizando como solvente el medio de cultivo hasta obtener las concentraciones deseadas. Una vez obtenidos los medios de cultivo a las diferentes concentraciones se colocaron explantes de 0,5 cm de diámetro de los fitopatógenos evaluados, se incubaron a 25 °C ± 2 en oscuridad hasta que el crecimiento del micelio de la caja testigo (PDA sin extracto) alcanzó el tamaño de la placa. El diámetro del crecimiento del micelio se midió diariamente con un vernier. El porcentaje de inhibición de crecimiento se determinó de la siguiente manera: % inhibición = crecimiento micelial del testigo - crecimiento micelial del tratamiento / crecimiento micelial del testigo x 100. Por otro lado se contabilizó el número de conidios a los 9 días después de la inoculación en los diferentes tratamientos evaluados utilizando una cámara de Neubauer.

Análisis de resultados. Los datos del número de conidios fueron analizados con un diseño experimental completamente al azar con 4 repeticiones. Cada repetición constó de tres cajas por evaluación y una prueba de comparación de medias por DMS ($p \leq 0,01$) utilizando el paquete estadístico SAS 6.08. Además con los datos de inhibición obtenidos se calculó la dosis efectiva media (ED_{50}) por un análisis Probit mediante el método de máxima verosimilitud (Finney, 1971). Se utilizó el programa SAS.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los extractos de chirimoya y canela presentaron el mayor efecto inhibitorio sobre el crecimiento micelial de los hongos fitopatógenos, que fue influenciado por el período de incubación y la concentración de los extractos. El extracto de canela inhibió el crecimiento micelial de *F. oxysporum*, *F. culmorum* y *F. solani* en 4,47; 2,56 y 3,15%, respectivamente, a una concentración de 50 ppm (Tabla 1). La mayor dosis mostró inhibiciones de 43,15; 31,81 y 45,58%, respectivamente (Tabla 1). El extracto de chirimoya tuvo un porcentaje de inhibición de 89% para *F. oxysporum* y *F. culmorum*, y 62,5% para *F. solani* a una concentración de 10000 ppm. Ayala et al. (2008) informaron que el extracto de canela inhibió el crecimiento micelial de *Alternaria alternata*,

Tabla 1. Inhibición del crecimiento micelial de tres especies de *Fusarium* por extractos vegetales de *Annona cherimola* y *Cinnamomum zeylanicum*.

Table 1. Mycelial growth Inhibition of three pathogenic fungi by plant extracts of *Annona cherimola* and *Cinnamomum zeylanicum*.

Extracto	Concentración (ppm)	Fo Inhibición (%)	Fc Inhibición (%)	Fs Inhibición (%)
<i>Annona cherimola</i>	0	0	0	0
	2000	53	78,35	45,25
	4000	62,62	80,75	57,87
	6000	72,95	85,69	60,87
	10000	89,55	89,62	62,5
	<i>Cinnamomum Zeylanicum</i>	0	0	0
50		4,47	2,56	3,15
100		13,33	5,0	12,33
150		22,13	12,79	23,28
200		37,30	21,19	34,88
250		39,38	22,26	37,05
300		43,15	31,81	45,58

Fo: *Fusarium oxysporum*, Fs: *Fusarium solani*; Fc: *Fusarium culmorum*. Los extractos de *Nicotiana glauca* y *Shinus molle* no mostraron inhibición a las diversas dosis estudiadas.

The extracts of *Nicotiana glauca* and *Shinus molle* did not show inhibitory effect at the study concentrations.

indicando que la inhibición se incrementó al aumentar la concentración del extracto. Por otro lado los extractos de tabaquillo y pirul no mostraron inhibición a las diversas dosis estudiadas.

Tabla 2. Efecto de los extractos vegetales de *Annona cherimola*, *Nicotiana glauca*, *Schinus molle* y *Cinnamomum zeylanicum* en el número de conidios/mL producidos por *Fusarium oxysporum* (Fo), *Fusarium culmorum* (Fc) y *Fusarium solani* (Fs).

Table 2. Effect of the plant extracts of *Annona cherimola*, *Nicotiana glauca*, *Schinus molle* and *Cinnamomum zeylanicum* on the number of conidia/mL produced by *Fusarium oxysporum* (Fo), *Fusarium culmorum* (Fc) and *Fusarium solani* (Fs).

Extracto	Concentración (ppm)	Fo ^x	Fc ^x	Fs ^x
<i>Annona cherimola</i>	0	10 a	2,74 a	7,40 a
	2000	2,88 b	2,24 ab	3,00 b
	4000	2,24 b	1,96 ab	1,84 b
	6000	1,92 b	1,48 ab	1,32 b
	10000	1.6 b	1.16 b	1.28 b
<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	0	10 a	2,74 a	7,40 a
	50	9,2 ab	1,52 ab	3,56 b
	100	5,8 b	1,24 b	2,88 bc
	150	5,6 b	1,12 b	1,36 cd
	200	1,6 c	1,0 b	1,32cd
	250	0,96 c	0,9 b	0,91 d
<i>Nicotiana glauca</i>	300	0,92 c	1,16 b	0,88 d
	0	10 a	2,74 a	7,40 a
	1000	11,6a	2,92 a	7,6 a
	2000	12,0 a	3,08 a	7,72 a
	4000	12,4 a	3,2 a	7,95 a
	6000	12,16a	3,2 a	8,35 a
<i>Schinus molle</i>	8000	12,4 a	3,2 a	8,44 a
	10000	12,63 a	3,28 a	8,87 a
	0	10 a	2,74 a	7,40 a
	500	10,44 a	2,68 a	7,72 a
	1000	10,24 a	2,66 a	7,72 a
	2000	10,68a	2,44 a	7,62 a
	4000	10,26 a	2,36 a	7,24 a
	6000	10,62 a	2,44 a	7,40 a
	8000	10,64 a	2,44 a	7,62 a
	10000	10,68 a	2,68 a	7,72 a

^x $1,0 \times 10^5$ Conidios/mL

Valores con la misma letra en la misma columna dentro de cada especie son estadísticamente iguales (DMS, $p > 0,01$).

Valores con la misma letra en la misma columna dentro de cada especie son estadísticamente iguales (DMS, $p > 0,01$).

Tabla 3. Dosis efectiva media (DE₅₀) de los extractos de *Annona cherimola* y *Cinnamomum zeylanicum* sobre el crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum*, *Fusarium culmorum* y *Fusarium solani*.
Table 3. Mean effective dosis (DE₅₀) of *Annona cherimola* and *Cinnamomum zeylanicum* extracts on mycelial growth of *Fusarium oxysporum*, *Fusarium culmorum* and *Fusarium solani*.

Extracto	Fitopatógeno	ED ₅₀	Límites Fiduciales 95%	Límites Fiduciales 95%
<i>Annona cherimola</i>	<i>F. oxysporum</i>	2060	1329	2656
	<i>F. culmorum</i>	593	561,82	1236
	<i>F. solani</i>	2571	412,75	4012
<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	<i>F. oxysporum</i>	337,44	283,59	439,06
	<i>F. culmorum</i>	538,63	408,10	891,01
	<i>F. solani</i>	330,34	281,19	419,74

Los extractos de *Nicotiana glauca* y *Shinus molle* no mostraron inhibición en el crecimiento micelial a las diversas dosis estudiadas, es por ello que no se obtuvo la ED₅₀ de éstos.

The extracts of *Nicotiana glauca* and *Shinus molle* did not show inhibitory effect on mycelial growth, so no ED₅₀ was obtained from these.

Respecto a la actividad antiesporulante, el extracto de chirimoya determinó un menor número de conidios en las tres especies de *Fusarium*. El número de conidios de *F. oxysporum* en los tratamientos fue de 1,6 a 2,88 x 10⁵ conidios/mL (Tabla 2); al mismo tiempo, el testigo presentó valores de 10 x 10⁵ conidios/mL. Resultados similares se obtuvieron para *F. culmorum* y *F. solani*. Sin embargo, no hubo diferencias entre los tratamientos. Nuestros resultados coinciden con los obtenidos por Hernández-Albíter et al. (2007). Estos autores evaluaron 40 especies de plantas del estado de Morelos México, con la finalidad de determinar el potencial antifúngico. Hernández-Albíter informaron actividad antifúngica al evaluar el extracto crudo de chirimoya (*Annona cherimola*) sobre *C. gloeosporoides*. Un estudio de Bautista-Baños et al. (2000) indicó que, de 19 especies de plantas evaluadas, el extracto acuoso de *Annona reticulata* L. inhibió la formación de esporas y la germinación de *Rhizopus stolonifer*. La inhibición conidial también fue observada cuando *C. gloeosporoides* creció sobre este extracto (Bautista-Baños et al., 2002).

Por otro lado, el extracto de canela sobre *Fusarium culmorum* presentó diferencias entre el testigo y los tratamientos a partir de 50 ppm hasta 300 ppm. Para *Fusarium oxysporum* dicho extracto también mostró diferencias entre los tratamientos; los mayores porcentajes de inhibición de la esporulación se obtuvieron a partir de las 200 ppm con 1,6 x 10⁵ conidios/mL. El extracto de canela produjo la mayor inhibición en la producción de conidios de *F. solanis* a partir de 150 ppm (Tabla 2). Los resultados obtenidos son inferiores a los reportados por Soliman y Badeaa (2002). Estos autores indicaron que la canela inhibió completamente el desarrollo de *Aspergillus flavus*, en una dosis de 500 ppm. García-Camarillo et al. (2006) también reportaron que el extracto de canela inhibió el crecimiento micelial de *A. flavus* a partir de 250 ppm.

Los extractos de tabaquillo y pirul no mostraron diferencias entre tratamientos. Sin embargo, el primero de ellos mostró una tendencia de incrementar la producción de conidios al incrementarse la concentración del extracto. Este mismo comportamiento lo reportaron Guerrero et al. (2007) al determinar la actividad biológica *in vitro* del extracto de *Flourensia cernua* sobre hongos patógenos de postcosecha. Estos autores indicaron que el extracto hexánico estimuló la formación de conidios sobre *Alternaria alternata* y *Colletotrichum gloeosporoides*. Similarmente, el extracto de éter también indujo a *C. gloeosporoides* a producir una mayor cantidad de conidios en comparación al testigo.

En relación a la ED₅₀, el extracto de canela controló las tres especies en estudio a dosis de 330,34 a 538,63 ppm (Tabla 3). Estos resultados coinciden con los reportados por García-Camarillo et al. (2006) y Soliman y Badeaa (2002). Estos autores indicaron que el crecimiento micelial de los hongos puede ser inhibido totalmente a dosis de 250-500 ppm de extracto de canela. El extracto de chirimoya mostró el mejor control de *F. culmorum* a 593 ppm. Al mismo tiempo, el mejor control de *F. oxysporum* y *F. solani* se obtuvo a dosis de 2060 a 2571 ppm, respectivamente. Los extractos de canela y chirimoya inhibieron así el crecimiento micelial y la esporulación de *F. oxysporum*, *F. culmorum* y *F. solani*.

REFERENCIAS

- Anderson, B.S., J.W. Hunt, B.M. Phillips, P.A. Nicely, V. Vlam-ing, V. Connor, N. Richard y R.S. Tjeerdema (2003). Integrated assessment of the impacts of agricultural drainwater in the Salinas River (California, USA). *Environmental Pollution* 124: 525-532.
- Ayala, F., E. Soto, A. González, E. Álvarez, O. Martín y G. González (2008). Microencapsulation of cinnamon leaf (*Cinnamomum zeylanicum*) and Garlic (*Allium sativum*) oils in β -cyclodextrin. *Journal of Inclusion Phenomena Macrocyclic Chemistry* 60: 359-368.
- Bautista, S., M. Hernández L. y L. Barrera N. (2000). Antifungal screening of plants of the state of Morelos, México against four fungal postharvest pathogens of fruits and vegetables. *Revista Mexicana de Fitopatología* 18: 36-41.
- Bautista, B.S., M. Hernández L., J.C Díaz y C.F. Cano (2002). Evaluation of the fungicidal properties of plant extracts to reduce *Rhizopus stolonifer* of ciruela fruit (*Spondias purpurea* L.) during storage. *Postharvest Biology Technology* 20: 99-106.
- Bajwa, R., A. Kjalidy y T.S. Cheema (2003). Antifungal activity of allelopathic plant extracts. III. Growth response of some pathogenic fungi to aqueous extract of *Parthenium hysterophorus*. *Pakistan Journal of Plant Pathology* 2: 145-156.
- Bravo, L.L., T.K. Bermúdez y B.R. Montes (2000). Inhibición de *Fusarium moniliforme* mediante polvos vegetales y algunos de sus componentes químicos. *Manejo Integrado de Plagas* 57: 29-34.
- Chapagain, B.P., Z. Wiesman y L. Tsrar (Lahkim) (2007). *In vitro* study of the antifungal activity of saponin-rich extracts against prevalent phytopathogenic fungi. *Industrial Crops and Products* 26: 109-115.

- Finney, D.J. (1971). Probit Analysis. Cambridge University Press. 3rd Ed. 120 p.
- García-Camarillo, E.A., M.Y. Quezada-Viay, J. Moreno-Lara, G. Sánchez-Hernández, E. Moreno-Martínez y M.C.J. Pérez-Reyes (2006). Actividad antifúngica de aceites esenciales de canela y orégano y su efecto sobre la producción de aflatoxinas en nuez pecanera. *Revista Mexicana de Fitopatología* 24: 8-12.
- Giraud, T., E. Fournier, D. Vautrin, M. Solignac, E. Vercken, B. Bakan y Y. Brygoo (2002). Isolation of eight polymorphic microsatellite loci, using an enrichment protocol, in the phytopathogenic fungus *Fusarium culmorum*. *Molecular Ecology Notes* 2: 121-123.
- Guerrero-Rodríguez, E., S. Solís-Gaona, F.D. Hernández-Castillo, A. Flores-Olivas y D. Jasso-Cantú (2007). Actividad biológica *in vitro* de extractos de *Fluorensia cernua* D en patógenos de postcosecha: *Alternaria alternata* y *Colletotrichum gloeosporoides*. *Revista Mexicana de Fitopatología* 25: 48-53.
- Hernández-Albiter, R.C., L.L. Barrera-Necha, S. Bautista-Baños y L. Bravo-Luna (2007). Antifungal Potential of Crude Plant Extracts on Conidial Germination of two isolates of *Colletotrichum gloeosporoides*. *Revista Mexicana de Fitopatología* 25: 180-185.
- Paulitz, T. y R. Bélanger (2001). Biological control in greenhouse systems. *Annual Review of Phytopathology* 39: 103-133.
- Pawar, V.C. y V.S. Taker (2007). Evaluation of the anti-*Fusarium oxysporum* f. sp. cicer and anti-*Alternaria porri* effects of some essential oils. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 23: 1099-1106.
- Ramírez-Legarreta, M.R y J.L. Jacobo-Cuellar (2002). Impacto ambiental del uso de plaguicidas en huertos de manzano del noroeste de Chihuahua, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 20: 168-173.
- Soliman, K.K., A.K. Sinha y G. Prasad (1993). The effect of clove and cinnamom oils on growth of and aflatoxin production by *Aspergillus flavus*. *Letters in Applied Microbiology* 16: 114-117.
- SAS Institute Inc. (2002). Guide for personal computers. SAS Institute, Cary, N.C.
- Tjamos, E.C. y C.H. Beckman (1989). Vascular wilt diseases of plants: basic studies and control. En: NATO ASI Series H: Cell Biology, Vol. 28.
- Whalen, M.M., S. Wilson, C. Gleghorn y B.G. Loganathan (2003). Brief exposure to triphenyltin produces irreversible inhibition of the cytotoxic function of human natural killer cells. *Environmental Research* 92: 213-220.