

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

MAESTRIA EN PROTECCIÓN VEGETAL

"EVALUACIÓN DE MÉTODOS DE INOCULACIÓN DE *Fusarium oxysporum* f. sp.
gladioli EN CORMOS DE GLADIOLO".

TESIS

QUE COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL

PRESENTA:

RICARDO MARTÍNEZ RUEDA

DIRECCIÓN DE APLICACIÓN
DEPARTAMENTO DE ASESORIA ACADÉMICA
OFICINA DE EXÁMENES PROFESIONALES

FECHA 18 Junio de 2010

Chapingo, Estado de México



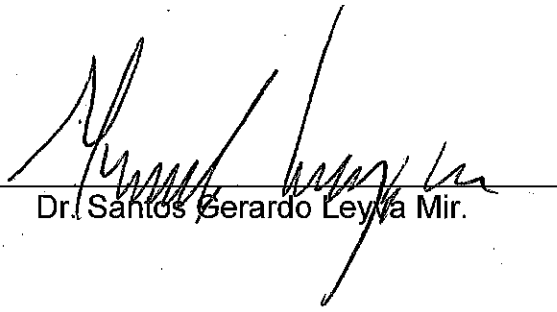
"EVALUACIÓN DE METODOS DE INOCULACIÓN DE *Fusarium oxysporum* f. sp.

gladioli EN CORMOS DE GLADIOLO".

Tesis realizada por Ricardo Martínez Rueda bajo la dirección del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL

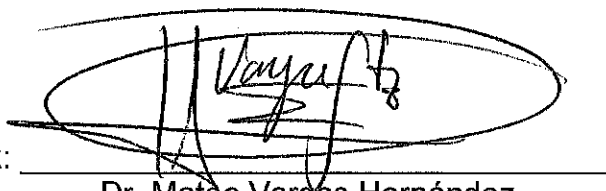
DIRECTOR:


Dr. Santos Gerardo Leyva Mir.

ASESOR:


Dra. Silvia Bautista Baños.

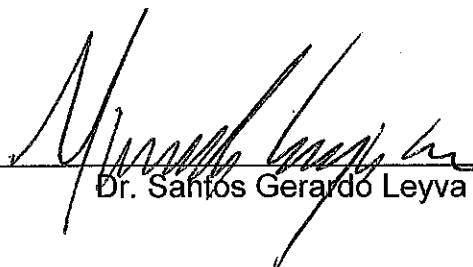
ASESOR:


Dr. Mateo Vargas Hernández.

"EVALUACIÓN DE METODOS DE INOCULACIÓN DE *Fusarium oxysporum* f. sp.
gladioli EN CORMOS DE GLADIOLO".

El jurado que revisó y aprobó el examen de grado de Ricardo Martínez Rueda autor de la presente tesis de Maestría en Ciencias en Protección Vegetal estuvo constituido por:

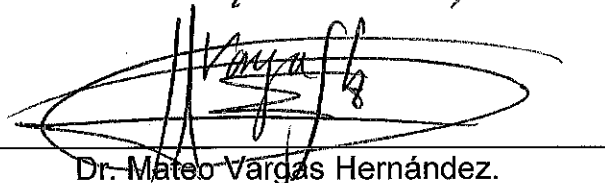
PRESIDENTE:


Dr. Santos Gerardo Leyva Mir.

ASESOR:


Dra. Silvia Bautista Baños.

ASESOR:


Dr. Mateo Vargas Hernández.

DEDICATORIA

A mis padres:

Martin y Guadalupe por regalarme la vida, brindarme amor y apoyo todos los días de mi vida.

A mis hermanos:

Martin, Abraham y Manuel por su paciencia, respeto y todos aquellos momentos de felicidad, tristeza y enojo que hemos compartido.

A mi cuñada y sobrinos:

Elsa, Eduardo, Oscar y Martin, por pasar momentos agradables conmigo y compartir grandes momentos de felicidad.

A mi otra cuñada:

Alma, sus hijas Jazmin e Itzel, además de Gerardo.

En especial a la Familia Martínez y a la Familia Rueda:

Por su amistad, apoyo, solidaridad que me han mostrado día a día.

A la Familia Orozco Bautista:

En especial a la Dra. Silvia B., a su esposo Raúl O. y su hijo Emilio por su amistad, por su apoyo en la realización de esta tesis., solo puedo decir muchas gracias.

A mi súper amigo y maestro:

Russ, a su familia Marta y Dany por permitirme ser parte de su familia y compartir momentos agradables conmigo.

A la amistad sincera, incondicional divertida y valiente:

Marie Cecile Bárcenas y a sus hijos por su amistad.

AGRADECIMIENTOS

A DIOS POR PERMITIRME DISFRUTAR DE LA VIDA, MI FAMILIA Y LOGRAR UNA META MÁS.

AL PUEBLO DE MÉXICO, QUE GRACIAS A SU APOYO TUVE LA OPORTUNIDAD DE ESTUDIAR Y REALIZAR ESTA MAESTRIA EN ESTE BELLO PAIS.

AL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIAS Y TECNOLOGÍA (CONACYT) POR LA BECA OTORGADA PARA REALIZAR MIS ESTUDIOS DE MAESTRÍA.

A LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO, EN ESPECIAL AL DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA. A TODOS LOS PROFESORES QUE COMPARTIERON SU CONOCIMIENTO Y EXPERIENCIA EN EL ÁREA FITOSANITARIA, GRACIAS POR EL APOYO Y LA COMPRENSIÓN DURANTE MI ESTANCIA.

A LA DRA. SILVIA BAUTISTA BAÑOS, POR SU AMISTAD, APOYO, COMPRENSIÓN, EJEMPLO DE DEDICACIÓN AL TRABAJO Y DESARROLLO PROFESIONAL. GRACIAS POR COMPARTIR SUS CONOCIMIENTOS, DISCIPLINA Y GUSTO POR EL TRABAJO CON HONGOS FITOPATÓGENOS.

AL DR. GERARDO S. LEYVA MIR POR SU AMISTAD, COMPRENSIÓN Y APORTACIONES EN ESTE TRABAJO.

AL DR. MATEO VARGAS HERNÁNDEZ, POR SU AMISTAD, VALIOSOS COMENTARIOS Y SUS OBSERVACIONES CRITICAS DE ESTE TRABAJO.

A MIS COMPAÑEROS Y AMIGOS DE PREPARATORIA GEN. 1997, A MIS AMIGOS DE LA LIC. GEN 2004 Y 2005, FINALMENTE A MIS AMIGOS DE LA MAESTRÍA GRACIAS POR SU APOYO.

A MIS AMIGOS(AS) Y PROFESORES DEL CEPROBI POR SU AMISTAD Y APOYO.

A MIS AMIGOS SINCEROS (OSWALDO NAVARRO, ALBERTO MEDINA, MARTIN MURILLO, GASPAR PADILLA, ERASMO MALDONADO) Y A MIS AMIGAS ONIXIA MARTIN, MEGUMI OWAWA Y MARIE CECILE BARCENAS POR SU APOYO MORAL EN TODO MOMENTO. A LA C. ANITA CLEMENTE HERNANDEZ, A LA FAMILIA TORRES DE TEPOZTLAN MORELOS.

DATOS BIOGRAFICOS

DATOS PERSONALES

NOMBRE: Ricardo Martínez Rueda

Nacido en el Estado de México el 3 de Abril de 1980.



EDUCACIÓN

1997-2005 *Universidad Autónoma Chapingo, Departamento de Parasitología Agrícola*

**- INGENIERO AGRÓNOMO ESPECIALISTA EN PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA
TITULADO**

TESIS.- EVALUACIÓN DE PRODUCTOS BIOLÓGICOS Y QUÍMICOS SOBRE POBLACIONES DE NEMATODOS QUE ATACAN EL CULTIVO DE ZANAHORIA (*Daucus carota*) EN CHAPINGO, MÉXICO, 2005

CURSOS

Constancia por participación como asistente en el “Seminario sobre fitosanidad e inocuidad alimentaria” realizado Chapingo, México, del 13 al 14 de noviembre del 2000.

Constancia por participación como asistencia al “Simposio sobre fitosanidad en hortalizas” realizado el 13 de Noviembre del 2001 en Chapingo, Edo. de México.

Constancia por participación como asistencia al “Simposio sobre fitosanidad en frutales” realizado el 15 y 16 de Noviembre del 2001 en Chapingo, Edo de México.

Constancia por asistencia al “XXVIII Simposio nacional de parasitología agrícola” realizada en Acapulco, Guerrero, del 25 al 27 de septiembre del 2002.

Reconocimiento por su participación como colaborador en la 10ª Semana nacional de ciencia y tecnología, realizada del 27 al 31 de octubre del 2003 en Chapingo, Edo. de México.

Reconocimiento por asistencia al “Simposio: enfoques actuales en la parasitología agrícola”, dentro del marco de la semana de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo, celebrado el día 14 de Noviembre de 2003.

Constancia por asistencia al “Taller de capacitación en técnicas de laboratorio y detección de nematodos fitopatógenos”, impartida en Texcoco, 5 de Febrero de 2005.

EXPERIENCIA LABORAL.

Laborando como “Profesional Fitosanitario” en la campaña de manejo de la roya del gladiolo *Uromyces transversalis* en el CESVMOR del Estado de Morelos de 2006 al 2008.

ÍNDICE

ÍNDICE.....	I
ÍNDICE DE CUADROS.....	IV
ÍNDICE DE FIGURAS.....	V
RESUMEN.....	VI
I.- INTRODUCCIÓN.....	1
II.- OBJETIVOS.....	3
2.1.- OBJETIVOS GENERAL.....	3
2.2.- OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	4
III.- REVISIÓN DE LITERATURA.....	5
3.1.- Enfermedades del cultivo de gladiolo.....	7
3.1.1.- Roya del gladiolo <i>Uromyces transversalis</i>	7
3.1.1.1.- Importancia.....	7
3.1.1.2.- Síntomas.....	7
3.1.1.3.- Control.....	8
3.1.2.- Pudrición del cuello <i>Stromatinia gladioli</i>	8
3.1.2.1- Importancia.....	8
3.1.2.2- Síntomas y daños.....	8
3.1.2.3- Control.....	9
3.1.3.- Mancha foliar y pudrición del corno <i>Curvularia trifolii</i> f.sp. <i>gladioli</i> Boerema & Hamers.....	9
3.1.3.1.- Importancia.....	9
3.1.3.2.- Síntomas y daños.....	9
3.1.3.3.- Control.....	10
3.1.4.- Moho gris <i>Botrytis gladiolorum</i>	10
3.1.4.1.- Importancia.....	10
3.1.4.2.- Síntomas y daños.....	10
3.1.4.3. - Control.....	11
3.1.5.- <i>Penicillium gladioli</i> Mc Cull. Et. Thom.....	11
3.1.5.1.- Importancia.....	11
3.1.5.2.- Síntomas y daños.....	11
3.1.5.3.- Control.....	11
3.1.6.- Pudrición del tallo (<i>Rhizoctonia</i> sp.).....	12

3.1.6.1.- Importancia.....	12
3.1.6.2.- Síntomas y daños.....	12
3.1.6.3.- Control.....	12
3.2.- Fusariosis, pudrición café o secadera (<i>Fusarium</i> sp).....	13
3.2.1.- Importancia.....	13
3.2.2.- Biología de <i>Fusarium oxysporum</i>	13
3.2.3.- Morfología.....	14
3.2.4.- Ciclo de vida.....	14
3.2.4.1.- Formación y germinación de esporas.....	15
3.2.4.2.- Patogénesis.....	15
3.2.5.- Enzimas.....	16
3.2.6.- Toxinas.....	16
3.2.6.1.- Acido fusárico.....	17
3.2.7.- Factores que contribuyen a la patogénesis.....	17
3.2.7.1.- Temperatura.....	17
3.2.7.2.- Suelos y pH.....	18
3.2.7.3.- Nutrición.....	18
3.3. - <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>gladioli</i>	19
3.3.1. - Antecedentes.....	19
3.3.2.- Importancia.....	20
3.3.3.- Morfología.....	20
3.3.4.- Síntomas.....	21
3.3.5.- Ciclo de vida y Epidemiología.....	21
3.3.6.- Toxinas.....	22
3.3.7.- Control.....	22
3.3.7.1.- Control cultural.....	23
3.3.7.2.- Control térmico.....	23
3.3.7.3.- Control genético.....	24
3.3.7.4.- Control biológico.....	24
3.3.7.4.1.- Aplicación de extractos vegetales y aceites esenciales.....	27
3.3.7.4.1.1.- Extractos vegetales.....	27
3.3.7.4.1.2.- Aceites esenciales.....	28

3.3.7.4.2.- Suelos supresores.....	28
3.3.7.5.- Control químico.....	29
3.3.8.- Métodos de inoculación de patógenos de suelo.....	30
3.3.9.- Métodos de inoculación de <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>gladiol</i>	31
IV.- MATERIALES Y MÉTODOS.....	39
4.1.- Lugar de muestreo.....	39
4.2.- Colecta de cormos.....	39
4.3.- Aislamiento y purificación de <i>Fusarium</i>	40
4.4.- Identificación del patógeno.....	41
4.5.- Evaluación de diferentes métodos de inoculación.....	42
4.5.1.- Siembra directa de cormos con lesiones.....	42
4.5.2.- Siembra directa de cormos sanos.....	42
4.5.3.- Siembra directa de cormos sanos dañados con punciones e inoculados.....	44
4.5.4.- Siembra directa de cormos sanos dañados con bisturí e inoculados.....	45
4.5.5.- Siembra directa de cormos sanos y posteriormente dañados e inoculados.....	45
4.5.6.- Siembra de cormos heridos y posteriormente inoculados.....	46
4.5.7.- Testigo.....	46
4.6.- Diseño experimental.....	47
4.7.- Variables evaluadas.....	48
4.8.- Modelo estadístico.....	51
4.9.- Análisis estadístico.....	51
V.- RESULTADOS.....	53
5.1.- Periodo de incubación, incidencia y severidad.....	53
5.2.- Análisis estadístico.....	56
VI.- DISCUSIÓN.....	59
VII.- CONCLUSIONES.....	62
VIII.- PERSPECTIVAS.....	62
IX.- LITERATURA CITADA.....	63

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1.- Tratamientos evaluados.....	47
Cuadro 2.- Escala recomendada para evaluar hongos del suelo.....	49
Cuadro 3.- Escala para evaluar pudriciones de cormo.....	50
Cuadro 4.- Periodo de incubación, incidencia y severidad a los 14 días en suelo con inculo	53
Cuadro 5.- Periodo de incubación, incidencia y severidad a los 21 días en suelo con inculo	54
Cuadro 6.- Periodo de incubación, incidencia y severidad de <i>F. oxysporum</i> a los 28 días en suelo estéril.....	55
Cuadro 7.- Incidencia de pudrición de cormos en la cuarta semana en suelo con inculo.....	55
Cuadro 8. Análisis de varianza individuales y combinados para cada uno de los suelos, utilizando Modelos Categóricos (CATMOD, SAS) para los términos Suelo, Tratamientos y la Interacción Suelo*Tratamiento.....	56
Cuadro 9. Comparaciones múltiples de medias, método de la diferencia mínima significativa (LSD), alfa al 5%.....	57
Cuadro 10. Comparaciones múltiples de medias, método de la diferencia mínima significativa (LSD) con alfa al 5%.....	58

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1.- Colecta de plantas enfermas y suelo en la región de Cuautla.....	39
Fig. 2. Síntomas de la fusariosis en plantas colectadas de campo.....	40
Fig. 3. Plantas de gladiolo enfermas en cámara húmeda.....	40
Fig. 4. Crecimiento algodonoso de <i>F. oxysporum</i> en cajas Petri con coloraciones rosas, púrpuras y blancas.....	41
Fig. 5. Microcondios y macroconidios característicos de <i>F. oxysporum</i>	41
Fig. 6. Cormos con síntomas de pudrición por <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>gladioli</i>	42
Fig. 7. Preparación de la solución de esporas de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>gladioli</i>	43
Fig. 8. Aplicación de la segunda inoculación de la solución de esporas de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>gladioli</i>	43
Fig. 9. Daño mecánico a los cormos de gladiolo mediante punciones.	44
Fig.10. Inmersión de cormos en la solución de esporas (10^6) de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>gladioli</i>	44
Fig. 11. Heridas mecánicas realizadas con bisturí en la zona de raíz del cormo de gladiolo.....	45
Fig. 12. Daño mecánico en el cormo de gladiolo hecho con un sacabocado.....	46
Fig. 13. Inoculación del cormo con micelio de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>gladioli</i> ..	46
Fig. 14. Tratamientos a campo abierto.....	48
Fig. 15. Grado de severidad en plantas de gladiolo.....	49
Fig. 16. Grado de severidad en cormos de gladiolo.....	50
Fig. 17. Incidencia de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>gladioli</i> a los 14 días de incubación en suelo con inoculo.....	53
Fig. 18. Incidencia de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>gladioli</i> a los 21 días de incubación en suelo con inoculo.....	54
Fig. 19. Incidencia de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>gladioli</i> a los 28 días de incubación en suelo estéril y con inoculo.....	56

EVALUACIÓN DE MÉTODOS DE INOCULACIÓN DE *Fusarium oxysporum* f.
sp. *gladioli* EN CORMOS DE GLADIOLO
EVALUATION OF INOCULATION METHODS OF *F. oxysporum* f. sp. *gladioli* IN
GLADIOLUS CORMS

Ricardo Martínez Rueda¹, Santos Geraldo Leyva Mir¹, Mateo Vargas
Hernández¹, Silvia Bautista Baños²

Resumen. Los cormos y flores de gladiolo presentan una alta incidencia de *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli*. Existen varias metodologías de inoculación de las cuales se han presentado diferentes niveles de infección. En esta investigación, se evaluó en suelo estéril y con inoculo, 10 diferentes métodos de inoculación para determinar: periodo de incubación, % de incidencia y severidad a los 7, 14, 21 y 28 días. La manifestación de la enfermedad fue mayor en cormos que en plántulas. El periodo de incubación en cormos fue más corta por 14 días en el suelo inoculado que en el no inoculado. La incidencia y severidad fue significativamente mayor ($P = 0.0001$) en suelo inoculado. De los 10 métodos de inoculación sólo tres fueron significativamente diferentes ($P = 0.0001$). A los 21 días, la enfermedad se manifestó en cuatro de los tratamientos, la mayor incidencia y severidad (30% y, 30-90%) se observó en el tratamiento 'siembra de cormos heridos y posteriormente inoculados'. A los 28 días de incubación, en el tratamiento 'siembra directa de cormos con lesiones' tanto en suelo inoculado como estéril se observó la mayor incidencia y severidad en los cormos en comparación con los tratamientos restantes. En relación al testigo, (cormos aparentemente sanos) la incidencia y severidad fue la más baja con 10% en ambos casos. El éxito en lograr la infección artificial, dependió del suelo y tipo de inoculación.

Palabras clave. Fusariosis, *Gladiolus* spp, pudrición café

Abstract. Corms and plants present high incidence *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli*. There are several inoculation methodologies that present different levels of infection. In this research, it was evaluated in sterile and inoculated soil, 10 different inoculation methods were evaluated in sterile and inoculated soil to determine: incubation period, % of incidence and severity after 7, 14, 21 and 28 days. Disease appearance was higher in corms than in seedlings. The incubation period in corms was shorter by 14 days in the inoculated soil than in the sterile one. The incidence and severity was significantly higher ($P = 0.0001$) in inoculated soil in comparison with the sterile one. Of the 10 inoculated methods only three were significantly higher ($P = 0.0001$) in comparison with the remaining treatments. After 21 days of incubation, the disease appeared in four with the highest incidence and severity (30% and, 30-90%) observed in the treatment in which injured corms were planted and subsequently inoculated. After 28 days of incubation, the highest incidence and severity of the disease, in both inoculated and sterile soils, was observed in the treatment in which injured corms had been directly sown. In relation to the control (apparently healthy corms), the incidence and severity was the lowest with 10% in both cases. The success of inducing artificial inoculation laid in the soil and type of inoculation.

Keywords. corm rot, *Gladiolus* spp, yellows, brown rot

¹Universidad Autónoma Chapingo. Departamento de Parasitología. km 38.5. Carr. México-Texcoco. Chapingo, Estado de México c. p. 56230

²Instituto Politécnico Nacional-Centro de Desarrollo de Productos Bióticos. Carr. Yautepec-Jojutla km. 6, Colonia San Isidro. Calle CEPROBI 8. Morelos c. p. 62531

I.- INTRODUCCIÓN

Por muchos años, el cultivo de flores de bulbo fue privilegiado de países desarrollados en cultivos ornamentales con los climas templados. Cuatro siglos de producción de bulbos, la reproducción, el desarrollo de nuevos productos y el comercio de bulbos llevó al liderazgo claro de Holanda en este dominio, y un gran público mira a Holanda como un centro principal de origen de bulbos y a veces de diversidad. Sin embargo, como consecuencia de la globalización del comercio hortícola, la transferencia de conocimientos y el progreso económico de los países en vías de desarrollo, la producción de bulbos no es más limitada a países con un clima templado. La producción de bulbos y flores de alta calidad en regiones con los climas cálidos ha sido importante durante la última década, y es apoyado por las regiones relativamente baratas y costos de mano de obra bajos, y la expansión del comercio internacional. Con el desarrollo de arquitectura paisajista y jardinería privada en regiones con clima cálido, los bulbos se hicieron populares en las partes del sur de los Estados Unidos y la Unión Europea, tanto como en países asiáticos y Australia (Kamenetsky, 2005).

Un análisis de la producción mundial de flores de bulbo revela que seis géneros de los que *Gladiolus*, *Hyacinthus*, *Iris*, *Lilium*, *Narcissus* y *Tulipa* ocupan el 90 % de la superficie de producción reportada. La mayoría de estos cultivos tradicionales son producidos en regiones de clima templado (Kamenetsky, 2005).

En México, el cultivo de flores con fines ornamentales es una práctica antigua con mucha importancia cultural, ya que es una tradición adornar los lugares de culto religioso, festivo y domestico. Los antepasados han tenido un interés por los valores estéticos que presentan las flores, su arquitectura, colores y perfumes (Tlahuextl *et al.*, 2005).

Las geófitas ornamentales son utilizadas principalmente para: (1) la producción de flor comercial, incluyendo flores cortadas al aire libre y plantas en maceta y (2) para la jardinería ornamental, incluyendo la jardinería privada. Para ambos casos, la producción comercial de la propagación de buena calidad material es una condición necesaria (Kamenetsky, 2005).

La Floricultura en México se extendió entre 1980 y 1990. La superficie cultivada creció de 3,000 a 13,000 hectáreas, debido a los esfuerzos encaminados a la consolidación de la plataforma de exportación. En estos años el valor de la producción fue importante para los estados de México y Morelos. En el periodo de 1980-1990 la producción de flor de exportación representaba el 10 por ciento de 8,416 hectáreas de flor y plantas de crecimiento en el país y generaron ganancias de 20.3 millones de dólares anualmente. En el período mencionado, las flores con la mayor contribución de volumen fueron la gladiola, el clavel y el crisantemo. Después del cultivo de la rosa, el cultivo del crisantemo y otras flores ornamentales fueron añadidas. Esta situación está relacionada con un proceso de intensificación en la producción a través del incremento de la superficie en el cultivo de invernadero. Los mercados principales de destino son: los Estados Unidos, Canadá y algunos países de Europa (Orozco, 2007).

El gladiolo ha tenido una historia global y un interés continuo. Especies incontables crecen en todo el mundo, de África del sur a el mediterráneo o Asia (Stevens, 1993). Hay más de 150 especies endémicas de gladiolo en el Sur de África solamente (Campbell y Bower, 2003).

La diferencia en los precios de mercado externo está condicionada por la temporada y las fechas específicas. La mejor estación para la exportación de esta flor es el invierno (de noviembre a febrero en algunas zonas de los Estados Unidos y de noviembre a marzo en Canadá), esto es debido a la falta de productos en los países compradores. En verano la oferta de flores aumenta en los Estados Unidos y Canadá, entonces el precio internacional baja y es más atractivo que los productores nacionales vendan en el mercado nacional. En el mercado nacional, la central de abastos de la ciudad de México es el principal concentrador de la producción florícola de los estados de México, Morelos y Puebla. El promedio mensual de precios muestra que las flores mas valiosas son las de primera competencia: la gladiola grande, y gladiola mediana (Orozco, 2007).

Actualmente, la producción tanto de cormos y flores de gladiolo se encuentra en peligro debido a la incidencia de enfermedades entre las más importantes se

conoce la pudrición café, cuyo agente causal es *Fusarium oxysporum* Schlecht.: *Fusarium oxysporum* es un patógeno importante del suelo que causa la marchitez y pudrición del cormo o amarillamiento de numerosos cultivos. Más de 150 formas especiales de *F. oxysporum* han sido reportadas como patógenas de plantas en todo el mundo. *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli* es el agente causal de la pudrición del bulbo o la coloración amarillenta en gladiolo.

Muchas variedades de gladiolo son tolerantes, pero ninguna es realmente resistente a la enfermedad causada por este hongo (Magie, 1980a). Pruebas de inoculación de numerosas variedades con aislamientos de *Fusarium* han demostrado una amplia gama de niveles de susceptibilidad de las variedades. Con el fin de seleccionar rápidamente plántulas de gladiolo de susceptibilidad a la pudrición del cormo causada por *Fusarium*, debe desarrollarse una metodología así como evaluar medidas de control (Wilfret y Woltz, 1973).

Debido a la importancia de este hongo se han evaluado diferentes métodos de control sin embargo, en experimentos controlados es necesario primeramente lograr la infección del patógeno en el material vegetal. Existen diferentes metodologías de inoculación artificial de *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli* en cormos y plantas de gladiolo como la aplicación directa de micelio o suspensión conidial en el material vegetal o suelo entre otras. En esta investigación se usaron algunas de estas metodologías para determinar el éxito de la inoculación de los aislamientos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli* y corroborar su patogenicidad en cormos y plantas de gladiolo.

II.- OBJETIVOS

2.1.- OBJETIVO GENERAL

- Evaluar diferentes métodos de inoculación en cormos de gladiolo con *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli*.

2.2.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Aislar y purificar la cepa de *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli* de las principales zonas productoras de gladiolo en el estado de Morelos.
- Aplicar diferentes métodos de inoculación en cormos de gladiolo seleccionados de la variedad "Roja borrega".
- Evaluar el periodo de incubación, porcentaje de incidencia y severidad en cormos y plantas de gladiolo durante un periodo de incubación dado.

III.- REVISIÓN DE LITERATURA

Los ornamentales son un factor económico mundialmente importante. La producción de plantas ornamentales excede la producción de verdura y fruta en muchos países del mundo (Linde *et al.*, 2007). El comercio internacional en flores de corte está concentrado en tres mercados importantes, concretamente los Estados Unidos, la Unión Europea y Japón. La Unión Europea es el mercado más grande, con Japón y los Estados Unidos ocupando el segundo y tercer puesto respectivamente (Buschman, 2005).

Aunque los Estados Unidos es el tercer productor más grande de flores cortadas, en el mundo entero, con un valor de 434 millones de euros, éste importa la mayor parte de sus necesidades en flores de corte (559 millones de euros o un 59 %). Los Estados Unidos también exportan flores de corte dignas de 38 millones de euros, principalmente a Canadá (Buschman, 2005).

El principal mercado de flores de corte en el mundo es la Unión Europea, la Unión Europea importa flores de corte con un valor de 653 millones de euros (10 %), los principales países importadores son Holanda, Reino Unido y Alemania, y las exportaciones de estos países en flores de corte están valuadas en 470 millones de euros, sus principales mercados son los Estados Unidos, Rusia y Suiza (Buschman, 2005).

Actualmente, en México se dedican 15,000 hectáreas al cultivo de ornamentales, con un volumen de producción anual de 83,377 Ton y un valor superior a los 325 dólares de los Estados Unidos. De ese volumen, el 90 % se comercializa en el mercado nacional y el 10 % al mercado de exportación, principalmente a Estados Unidos y Canadá (Murguía *et al.*, 2007).

El mercado nacional de ornamentales en México, está concentrado en la ciudad de México, Monterrey y Guadalajara, y se tiene un crecimiento en el consumo de árboles y plantas en los destinos turísticos de playa como en los estados de Quintana Roo, Baja California y Jalisco, entre otros (Murguía *et al.*, 2007).

En México la producción de gladiolo (*Gladiolus* sp.) ocupa el primer lugar entre las flores que se propagan por cormos (CESVMOR, 2009b). Los principales estados productores de gladiolo en México son: Puebla, el Estado de México, Morelos, Michoacán, Guerrero, Veracruz y Oaxaca, de los cuales el estado de Morelos ocupa el tercer lugar de producción a nivel nacional con una superficie de 594.20 hectáreas anuales y una producción de 733,130 Ton dejando una derrama económica para el Estado de \$107,728,000.00 (SIAP, 2010).

El gladiolo es originario de la cuenca mediterránea y de África austral. Ya se cultivaba en la época de los griegos y de los romanos. Comprende 180 especies nativas de África, Madagascar, Europa, Arabia y el oeste de Asia, donde el gladiolo crece espontáneamente, aunque la mayor parte son de origen africano (Gómez, 2009).

Gladiolus es el diminutivo del gladius, que significaba “espada”, por un lado se refiere a la forma de la hoja que es lanceolada terminando en punta y también al hecho de que la flor en la época de los romanos era entregada a los gladiadores que triunfaban en la batalla; por eso, la flor es el símbolo de la victoria (Gómez, 2009; Espinosa *et al.*, 2008).

Los gladiolos, en la antigüedad ya se cultivaban por los griegos y los romanos; son plantas herbáceas que se desarrollan a partir de un tallo subterráneo llamado “corno”, que es un tubérculo caulinar de orientación vertical con forma redondeada algo achatada, y en la parte superior esta algo hundida (Espinosa *et al.*, 2008). Las variedades hortícolas del gladiolo se han obtenido desde comienzos del siglo XIX por cruzamientos entre diversas especies botánicas. Presentan gran diversidad de tamaños, colores y forma de las flores así como épocas de floración (Gómez, 2009).

En México se cultivan principalmente las variedades de color rojo: (“Valeria, Victoria”, “Sans Souci”, “Traderhorn”) y las variedades de color blanco (“Peregrina, Princesa”, “Tequendama” y “White Prosperity”). Las cuales son conocidas con nombres populares (“Borrega”, “China”, “Lupe”, “Limón”, etc.). Los gladiolos florecen desde los 60 a 100 días después de la plantación, por lo tanto se han

dividido a las variedades desde Tempranas: "Ámsterdam" (blanca) y "Novalux" (amarilla a naranja); Intermedias (de 70 a 90 días), y tardías (más de 91 días): "Peter Pears" (roja), "Majestic" (rosa), "Blanca Espuma", "Rosa Pink" (Espinosa *et al.*, 2008).

3.1.- Enfermedades del cultivo de gladiolo

Los productores de gladiolo se enfrentan con varios problemas fitosanitarios tanto en el cultivo como en la vida postcosecha de los cormos. En este cultivo, las enfermedades son muy importantes y prácticamente el control se efectúa durante todo el ciclo. Esto es, durante la cosecha y almacenamiento de los cormos, resiembra y cultivo. Los cormos producidos o comprados e incluso los importados, pueden estar infectados por varios patógenos (Leszczyńska *et al.*, 1994). Entre las principales enfermedades destacan las siguientes:

3.1.1.- Roya del gladiolo *Uromyces transversalis*

3.1.1.1.- Importancia

Es una enfermedad de importancia cuarentenaria para nuestro país (CESVMOR, 2009a) y también es de importancia cuarentenaria en Estados Unidos y Europa (Peterson y Berner, 2009). Su presencia fue detectada en el cultivo del gladiolo en Noviembre de 2004, en los estados de México, Puebla y Morelos. Sin embargo, la enfermedad se ha dispersado en los estados de Michoacán, Guerrero, Oaxaca, Sinaloa y Veracruz. Afecta principalmente el follaje del cultivo, lo que ocasiona daños económicos serios a la producción y demerita la calidad de la flor para su comercialización. La detección en embarques de exportación, ocasiona el rechazo por el país comprador (CESVMOR, 2009a).

3.1.1.2.- Síntomas

Los primeros síntomas son manchas pequeñas y amarillentas formadas en hojas que posteriormente rompen la pared de la hoja formando protuberancias (pústulas) de 1 mm de largo por 1 cm de ancho, llenas de polvillo amarillo-anaranjado, las manchas llegan a unirse formando manchas mas grandes. El síntoma típico corresponde a protuberancias de color amarillo-anaranjadas en el follaje, las cuales están ubicadas transversalmente con relación a las nervaduras de la hoja. Conforme avanza el daño las lesiones se tornan de color café oscuro

a negro (Teliosporas). Las plantas severamente afectadas no llegan a producir flores y/o los cormos no llegan a madurar (Peterson y Berner, 2009., CESVMOR, 2009a).

3.1.1.3.- Control

El manejo de esta enfermedad se da a través de aplicaciones de fungicidas como: bitertanol, trifloxistrobin, folpet , aplicaciones de captan + manzate, tebuconazole, oxicarboxin, epoxiconazol, azoxistrobin y difenoconazol. También dentro de las recomendaciones están: eliminar la maleza del cultivo, evitar plantar en zonas con alta incidencia en ciclos anteriores, evitar el uso excesivo de compuestos nitrogenados, plantar en terrenos bien nivelados y con buen drenaje, eliminar focos de infección y quemar los residuos de cosecha entre otras (CESVMOR, 2009a).

3.1.2.- Pudrición del cuello *Stromatinia gladioli*

3.1.2.1- Importancia

La pudrición seca del gladiolo o pudrición del cuello, presenta una distribución mundial y generalmente se encuentra en todos los lotes comerciales (CESVMOR, 2009a), originalmente encontrada en Norte América la pudrición seca es causada por *Stromatinia gladioli* (Fox, 1997). En México, *S. gladioli* es una de las enfermedades más importantes del gladiolo, desde el año 1978 se reporta como causante de graves daños, pudiendo atacar a otros miembros de la familia Iridaceae a los que causa amarillamiento, decaimiento de hojas y pudrición del cuello (CESVMOR, 2009a).

3.1.2.2- Síntomas y daños

Las pudriciones de la base de las hojas resultan en amarillamiento prematuro y muerte de las plántulas (Anónimo, 1983). El hongo causa pudriciones secas en cormos, cuello, tallo, raíces y hojas al nivel del suelo (CESVMOR, 2009a). Al inicio las lesiones son de color café-rojizo, usualmente se desarrollan por un lado o debajo de la mitad del cormo (Anónimo, 1983). En el cuello de la planta aparecen pequeños esclerocios redondos de color negro. También es característico un olor desagradable de los tejidos podridos. Debido a la pudrición de las raíces el follaje se amarilla y las espigas no alcanzan su tamaño normal (CESVMOR, 2009a). En

plantas jóvenes infectadas se observa un achaparramiento, amarillamiento y muerte de la planta, sola o en manchones. Las plantas adultas no mueren totalmente, pero se pudre la base de los tallos y de las hojas dando una coloración café a negra. Puede desarrollarse un moho blanco grisáceo sobre las hojas envainantes, así como un desgarramiento de las mismas, donde se observan pequeños esclerocios de color negro; estas estructuras también se observan sobre las lesiones de cormos y raíces (CESVMOR, 2009a). Los esclerocios viven por un largo tiempo en el suelo, son conocidos por sobrevivir alrededor de diez años (Fox, 1997).

3.1.2.3- Control

Los fungicidas que han resultado prometedores para el control de la enfermedad controlando o inhibiendo el desarrollo del hongo son: benomil, ceresam-M, iprodiona, cobre sistémico, tebuconazole, procloraz, folpet, dicloram y fluazinam (CESVMOR, 2009a).

3.1.3.- Mancha foliar y pudrición del cormo *Curvularia trifolii* f. sp. *gladioli* Boerema & Hamers

3.1.3.1.- Importancia

El hongo *Curvularia trifolii* es la enfermedad mas importante en Florida, Alabama, California y San Diego, cuando se presentan las condiciones de alta temperatura y humedad. En 1980 se mencionó a *Curvularia trifolii* causando manchas foliares en campos de Taiwán, el cual penetra por los estomas, o bien directamente, formando apresorios (CESVMOR, 2009a). En México, esta enfermedad se le conoce como mancha foliar y pudrición de tallo, daña plantas en campo, cormos en almacén provocando pérdidas muy esporádicas, pero es menos importante que *Fusarium* y *Stromatinia* (CESVMOR, 2009a).

3.1.3.2.- Síntomas y daños

El hongo *Curvularia trifolii* casi siempre produce una pudrición a la mitad del cormo, pero ocasionalmente ocurren infecciones en el follaje y floración (Anónimo, 1983). En los cormos atacados se manifiestan pequeñas lesiones ligeramente hundidas de color oscuro, circulares alargadas. Sobre las escamas se observan manchas y rayas alargadas de color marrón claro a oscuro. Las yemas de la parte

baja del cormo, parecen bordeadas por una mancha de color oscuro. En hojas las manchas son de tamaño variable pero crecen rápido en dirección de las venas, su color es café claro a oscuro y es rodeada por un anillo café rojizo y un halo amarillento; en la parte apical de las hojas se observa una mancha café, como un síntoma de deficiencia o quemadura que continua hasta la parte basal (CESVMOR, 2009a).

3.1.3.3.- Control

Para el control se recomiendan aspersiones con captan, iprodiona y algunos fungicidas aplicados contra *Botrytis* y el tratamiento con agua caliente a 56 °C en cormos (CESVMOR, 2009a).

3.1.4.- Moho gris *Botrytis gladiolorum*

3.1.4.1.- Importancia

En México se reporta el ataque de esta enfermedad en cormos almacenados, hojas y flores donde causa perdidas hasta de un 50 % en condiciones de campo y transporte (CESVMOR, 2009a). *Botrytis gladiolorum* es una enfermedad que tiene dos fases bien diferenciadas: la pudrición del cormo en el almacenamiento y el manchado de flores y podredumbre de cuello en el campo (Lorbeer *et al.*, 2007).

3.1.4.2.- Síntomas y daños

Tejidos infectados pueden ser cubiertos con masas grises de esporas de *B. gladiolorum*, comúnmente produce pudriciones de hojas y flores, además de una pudrición de tallo y la base del tallo (Anónimo, 1983). Ataca hojas basales envoltantes, que al avanzar causan una pudrición completa de los tejidos foliares subterráneos que se encuentran unidos al cormo, provocando un amarillamiento y muerte de las hojas. En flores aparecen manchas blancas a cafés, a veces blancas con un margen café claro a violeta, y en condiciones de humedad alta se observa una capa gris (CESVMOR, 2009a).

En cormos aparece con mucha frecuencia en los alrededores de la yema apical, ocasionando una podredumbre parda. El tejido afectado es esponjoso y blando, con un aspecto gris y pulverulento; en el que se observan esclerocios irregulares de color negro (CESVMOR, 2009a). Al final del cultivo un arranque prematuro de

los cormos permite detener el ataque de *Botrytis* en el tallo. Las lluvias y el rocío favorecen el desarrollo del patógeno. Cuando se llegan a presentar condiciones continuas de alta humedad, el hongo puede esporular formando los conidios (Bigre, 1990).

3.1.4.3.- Control

Una bio-preparación que contiene a *Trichoderma harzianum* (Trichodex®) y otra con *Streptomyces griseoviridae* son eficaces contra el hongo en muchos países y en varios cultivos. El control químico se inicio con benomil o tiabendazol, pero rápidamente se detectó resistencia del hongo a los fungicidas, por eso hoy en día una de las mejores alternativas es la iprodiona y la mezcla de fludioxonil y ciprodinil, uno de los productos más resistentes es boscalid, propamocarb + fosetil, fosetil aluminio, carbendazim, iprodiona, procloraz, pirimetanil, captan, zineb, dicloran, benomilo y tiabendazol (CESVMOR, 2009a).

3.1.5.- *Penicillium gladioli* Mc Cull. Et. Thom

3.1.5.1.- Importancia

Penicillium gladioli se encuentra comúnmente en bulbos de gladiolo y, en almacén, puede causar fuertes pérdidas por pudrición (Romero, 1988). La pudrición por *Penicillium gladioli* ataca cormos que son maltratados o tienen alguna herida en almacenamiento (Anónimo, 1983).

3.1.5.2.- Síntomas y daños

Los cormos afectados presentan sitios de infección de color pardo, hundidos y claramente delimitados en la parte externa; tejido interior de la zona infectada de coloración parda, que luego se vuelve blanca con textura esponjosa (CESVMOR, 2009a). A bajas temperaturas crece un abundante moho verde-azul que crece encima de las lesiones (Anónimo, 1983).

3.1.5.3.- Control

Los fungicidas que dan buen resultado para controlar la enfermedad son principalmente tiabendazol, benomilo, carbendazim. El imazalil y el procloraz inhiben la esporulación; mientras el benomil y el tiabendazol son los protectantes y curativos más eficaces (CESVMOR, 2009a).

3.1.6.- Pudrición del tallo (*Rhizoctonia* sp.)

3.1.6.1.- Importancia

Rhizoctonia es parte del complejo de hongos que provocan el damping off, o caída de las plantas, como consecuencia del estrangulamiento y necrosis de tallos a nivel del cuello de las plantas (CESVMOR, 2009a).

3.1.6.2.- Síntomas y daños.

Los síntomas se caracterizan por presentar manchas secas bien delimitadas en raíces y lesiones hundidas en cormos, presentándose en sus etapas iniciales una coloración parda en el cuello de la planta y en hojas basales (CESVMOR, 2009a).

3.1.6.3.- Control

Aplicaciones de tebuconazole, procloraz, oxiclورو de cobre, iprodiona, pencicuron, quintozeno + thiram, benomilo (CESVMOR, 2009a).

3.2.- Fusariosis, pudrición café o secadera (*Fusarium* sp)

Reino.....	Fungi
División.....	Amastigomycota
Subdivisión.....	Deuteromicotina
Clase.....	Deuteromicetes
Orden.....	Moniliales
Familia.....	Tuberculariaceae
Genero.....	<i>Fusarium</i>
Especie.....	<i>F. oxysporum</i> (Romero, 1988).

3.2.1.- Importancia

Fusarium es un género ampliamente difundido en todo el mundo, con un amplio rango de hospedantes, es una enfermedad severa que afecta muchos cultivos incluyendo a los cultivos que se propagan por bulbos, cormos incluyendo gladiolo (amarillamientos), fresia (pudrición de corno), iris (pudrición basal), lili (pudrición por *Fusarium*) y bulbos menores incluyendo *Crocus*, *Croscornia*, *Ixia* y *Sparaxis* (Rees, 1992). Ejemplos de muchos reportes en la distribución de *F. oxysporum* incluyen en su distribución lugares como la zona ártica, los Alpes, el Himalaya, África central, Hawái, India, Norteamérica y Europa (Domsh *et al.*, 1980). *F. oxysporum* es un invasor del suelo por su pobre habilidad saprofítica y su incapacidad de colonizar material del hospedante muerto (Hillocks y Waller, 1997).

3.2.2.- Biología de *Fusarium oxysporum*

El género *Fusarium* es el mayor de la familia Tuberculariácea y, taxonómicamente, es uno de los más difíciles de todos los grupos fúngicos. Pocos micólogos intentan identificar las especies-forma de *Fusarium*, debido a la gran variabilidad existente en este grupo, variabilidad que hace que sea insegura para casi todos los especialistas (Alexopoulos, 1985). *Fusarium oxysporum* se compone de más de 80 cepas que muestran su patogenicidad específica para las especies de cultivos particulares (Deacon, 2006). Estas cepas se denominan "formas especiales", abreviado y ff. ssp (plural) o f. sp. (singular).

Todas las pudriciones vasculares tienen ciertas características en común. Las hojas de las plantas infectadas o partes de plantas infectadas pierden turgencia, comenzando con flacidez y coloraciones verde-claro a verde-amarillo, hay marchitamientos y finalmente la pudrición se torna amarillo hasta una coloración café y muere (Agrios, 2005, Deacon, 2006).

3.2.3.- Morfología

Las especies del género *Fusarium* típicamente producen dos tipos de conidios, que reciben la denominación de macroconidios y microconidios, debido a sus respectivos tamaños, ambos tipos son producidos a partir de fiálides. Los macroconidios son estructuras largas, multiseptadas, en forma de media luna o de canoa, que por lo general están ubicadas en los esporodoquios. Aunque también se pueden formar en conidioforos separados (Domsch *et al.*, 1980, Herrera y Ulloa, 1998). Los microconidios, pequeños, suelen ser unicelulares y de forma esférica u ovalada. Es también frecuente encontrar conidios que parecen intermedios entre los microconidios y los macroconidios (Domsch *et al.*, 1980, Herrera y Ulloa, 1998).

Morfológicamente, no se puede distinguir entre las formas patogénicas y saprofiticas, no es posible distinguir patogénicas de otras. Como una consecuencia, el aislamiento de *F. oxysporum* de plantas enfermas no implica automáticamente que una forma patogénica esté implicada. Cepas no patógenas son regularmente recobradas de plantas enfermas y aparentemente sanas (Domsch *et al.*, 1980, Baayen, 2000).

3.2.4.- Ciclo de vida

El ciclo de vida de *F. oxysporum* comienza con una fase saprofítica cuando el hongo sobrevive en el suelo como clamidospora. El talo es producido de cada forma de conidio en 6-8 h, y las clamidosporas en 2-3 días si las condiciones son favorables. La invasión de las raíces es seguida por la penetración de las células epidermales del hospedero, y el desarrollo de una enfermedad sistémica vascular en plantas hospederas (Beckman y Roberts, 1995). En etapas avanzadas de la enfermedad, el hongo crece fuera del sistema vascular dentro de las células del parénquima adyacente, produciendo cantidades vastas de conidios y

clamidosporas. El patógeno sobrevive en restos de plantas, en el suelo como micelio y en todas las formas de esporas, pero más comúnmente como clamidosporas en regiones con temperaturas frías (Agrios, 1997).

3.2.4.1.- Formación y germinación de esporas

La formación de clamidosporas en especies patogénicas de especies de *Fusarium* comúnmente tiene lugar en la hifa en el tejido infectado y podrido del hospedante. Las clamidosporas también podrían haber sido formadas abundantemente de macroconidios que se originaron de esporodoquios en lesiones a nivel de cuello (Groenewald, 2005).

3.2.4.2.- Patogénesis

El proceso de infecciones vasculares causadas por *F. oxysporum* es compleja y requiere de una serie de procesos altamente regulados que incluyen la adhesión y penetración.

La infección del hongo comienza cuando la hifa se adhiere a la superficie de la raíz del hospedero. La penetración es probable que sea controlada por una combinación de diversos factores que incluyen los compuestos de hongos, la superficie de la planta, estructuras, activadores o inhibidores de la germinación de las esporas de hongos, y la formación del tubo germinal (Mengden *et al.*, 1996). Las formas de penetración en la raíz de algunas formas patógenas pueden diferir, pero hay dos tipos distintos. Algunas formas patógenas penetran en las raíces directamente, mientras que otros deben entrar indirectamente a través de heridas. Los sitios más comunes de penetración directa se encuentran en o cerca de la punta de la raíz de ambas raíces primarias y de raíces laterales (Lucas, 1998). El patógeno entra por la región apical de la raíz donde la endodermis no está completamente diferenciada, el hongo puede crecer y llegar a través del protoxilema desarrollado (Groenewald, 2005).

Varios miembros del género *Fusarium* son parásitos, y suelen provocar el marchitamiento de la planta huésped. Durante la colonización, el micelio avanza intercelularmente a través de la corteza de la raíz hasta que llega a los vasos del xilema y entra. El micelio y los conidios del hongo invaden los tejidos vasculares,

llegando a bloquear físicamente los vasos del xilema, impidiendo el transporte del agua. Cuando quedan bloqueados los vasos, se produce el marchitamiento (Alexopoulos, 1985). La obstrucción es incrementada mas adelante por geles y gomas formadas por la acumulación y oxidación de los productos descompuestos de las células de las plantas atacadas por las enzimas producidas por el hongo. La oxidación y translocación de algunos productos en descomposición observados también son responsables para la decoloración café de los tejidos vasculares afectados. El número de vasos de xilema formados es reducido y sus paredes celulares son más delgadas de lo normal. A menudo las células del parénquima circundantes de los vasos del xilema son estimulados por las secreciones del patógeno a dividirse excesivamente, y esto, combinado con las paredes delgadas y debilitadas de los vasos, resultan en una reducción del diámetro o el colapso completo de los vasos (Agrios, 2005).

3.2.5.- Enzimas

F. oxysporum produce algunas enzimas que actúan sobre los componentes pécticos y la celulosa de las paredes celulares (Agrios, 1997). Las pectinasas catalizan la degradación de los polisacáridos pécticos, el principal componente de la lámina media, es decir, el cemento intercelular que tiene lugar en las células de los tejidos de la planta. Las enzimas pécticas consisten principalmente en pectina metilesterasa, poligalacturonasa y pectato liasa (Roncero *et al.*, 2003). La quitina sintetasa es una enzima asociada a la membrana involucrada en la biosíntesis de la quitina, un componente estructural de las paredes celulares de los hongos. La quitina V sintetasa es necesaria para la patogenicidad de *F. oxysporum* y desempeña un papel importante en la tolerancia que tiene el patógeno a compuestos antifúngicos de la planta (Roncero *et al.*, 2003).

3.2.6.- Toxinas

Además, se sabe que *Fusarium* produce toxinas de las que se piensa contribuyen al marchitamiento, al afectar la permeabilidad de la membranas celulares y alterar el metabolismo celular (Alexopoulos, 1985, Herrera y Ulloa, 1998). Las toxinas secretadas en los vasos por la pudrición del hongo son llevadas a las hojas, reducen la fotosíntesis, afectan la permeabilidad de las membranas de las células de la hoja y su habilidad para controlar la pérdida de agua a causa de la

transpiración, y por lo tanto resulta en la epinastia de la hoja, la pudrición, necrosis intravenal y la muerte de la planta (Agrios, 2005).

3.2.6.1.- Ácido fusárico

El ácido fusárico fue una de las primeras toxinas potenciales identificadas. Se sabe que es producida por *Fusarium oxysporum* en cultivos de laboratorio. También se ha detectado en las plantas enfermas, y cuando se aplica a los protoplastos de plantas *in vitro* aumenta su permeabilidad a los iones. Sin embargo, todavía hay dudas sobre el papel del ácido fusárico *in vivo*, porque sus concentraciones en el fluido del xilema suelen ser bajas (Deacon, 2006). La morfología, fisiología y ecología de *F. oxysporum* como un patógeno de plantas de suelo ha sido descrito, sin embargo no existían suficientes datos sobre su pared celular, hasta que Sivan y Chet (1989) mostraron que las células de la pared celular de *F. oxysporum* resultaron ser más resistentes a enzimas de degradación de la pared celular en comparación con las células de *Rhizoctonia solani* y *Sclerotium rolfsii*, esto es debido al contenido alto de proteínas, esto puede explicar la alta resistencia relativa de *F. oxysporum* a las enzimas líticas.

3.2.7.- Factores que contribuyen a la patogénesis

3.2.7.1.- Temperatura

Los factores ambientales desempeñan un papel importante en las enfermedades de la marchitez vascular. Las primeras pruebas de esto fueron encontradas en las plantaciones de banano de América Central, donde los suelos pueden ser categorizados como de "vida larga" o "corta vida" (Deacon, 2006).

La incidencia y severidad de síntomas específicos depende, principalmente de la interacción con la especie hospedante, el tipo de variedad, las temperaturas del suelo y aire (Bautista, 2002). Para el rápido crecimiento, el hongo necesita una temperatura óptima entre 25 y 30 °C, un máximo o por debajo de los 37 °C, y una temperatura mínima por encima de los 5 °C, el punto muerto térmico fue determinado entre los 57.5 y 60 °C por 30 min en el suelo (Domsch *et al.*, 1980).

3.2.7.2.- Suelos y pH

La humedad y el pH tienen un pequeño efecto en las pudriciones por *Fusarium*, ya que el hongo se establece por sí mismo y crece en un amplio rango de tipos de suelo (Anónimo, 1988). *F. oxysporum* ha sido encontrado frecuentemente a 30 cm y por debajo de los 50 cm, este requiere humedades altas y es muy tolerante respecto al pH, aunque aparentemente es más común de encontrarse en suelos neutros o ligeramente ácidos, es tolerante a altas concentraciones de CO₂ y concentraciones de sales por arriba del 18% (Domsch *et al.*, 1980). Es un buen colonizador de la materia orgánica. Resiste bien en condiciones asfixiantes incluso del 100% de CO₂ de ahí su localización en profundidad (Bigre, 1990).

F. oxysporum puede sobrevivir mediante la producción de clamidosporas por largos periodos de tiempo en la ausencia del principal hospedero (Hillocks y Waller, 1997). Generalmente, los remanentes de la cosecha llevan estas estructuras (Powell, 1994). Ciertas especies pueden mantenerse mucho tiempo (diez años) a gran profundidad (100-150 cm). *Fusarium* resiste tanto a la desecación como a un suelo saturado de agua. Es capaz de asimilar azúcares muy complejos (Baayen, 2000). Del mismo modo, la situación del suelo con bajo contenido en nutrientes (P o K), aumentan la vulnerabilidad de las plantas a pudriciones de la raíz (Shivas y Beasley, 2005).

3.2.7.3.- Nutrición

Varios factores incluidos las enmiendas de nitrógeno y los exudados de la raíz del hospedante afectan la supervivencia y patogenicidad de las clamidosporas de *Fusarium* (Ciotola *et al.*, 2000). Las etapas de crecimiento, la disminución o quiescencia de una población de *Fusarium* en el suelo dependen del balance ecológico y disponibilidad de nutrientes. *F. oxysporum* es muy capaz como autótrofo de requerir solamente una fuente de carbono para la estructura y la energía, de compuestos inorgánicos para sintetizar compuestos orgánicos, tales como azúcares, lípidos y aminoácidos. La lista de los elementos esenciales de nutrientes para el crecimiento, la esporulación y la virulencia incluye al carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno, fósforo, potasio, magnesio, azufre, hierro, manganeso, molibdeno y zinc (Roncero *et al.*, 2003).

3.3. - *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli*

3.3.1. - Antecedentes

Massey en 1926 describió a la pudrición de *Fusarium* de cormos almacenados y lo atribuyó a *Fusarium oxysporum* Schlecht. var. *gladioli* Massey como pequeñas manchas café-rojizas, hundidas que podrían desarrollarse. Mc Culloch (1944), atribuyó como agente causal a *F. orthoceras* Woll. var. *gladioli* a un amarillamiento de las hojas de gladiolo. Esta enfermedad se caracterizaba por el amarillamiento del follaje y colapso de la punta floral durante el periodo de crecimiento (Buxton y Robertson, 1953). Sin embargo, el Dr. Gordon W.L. sugirió que *F. orthoceras* Woll. var. *gladioli* podía ser probablemente considerado como una forma especial de *F. oxysporum* debido a que morfológicamente eran indistinguibles las cepas de ambos. Buxton y Robertson (1953) sugirieron, por lo tanto, que el organismo causante de la enfermedad conocida como amarillamiento del gladiolo fuera incorporado como *F. oxysporum* Schlecht f. sp. *gladioli* Snyd & Hans tal y como lo había descrito Hansen en 1940.

Bajo condiciones de invernadero en 1980, Barrows-Broaddus y Dwinell, incubaron cormos en suelo infestado con dos cepas de *F. oxysporum* f. sp. *gladioli* y nueve cepas de *F. moniliforme* var. *subglutinans* (FSM) en la cual hubo un deterioro significativo que fue principalmente causado por las dos cepas de *F. f. sp. gladioli* y por dos de las nueve cepas de FMS. La degradación de los cormos y la colonización de tejido asintomático por FMS indicó a este como un potencial patógeno en el almacenamiento y la producción de cormos de gladiolo, esto coincidió con Woltz *et al* (1978), (citado por Barrows-Broaddus y Dwinell, 1980), quienes demostraron que otras especies de *Fusarium* (FMS) podrían ser aisladas de cormos comerciales y que estos aislamientos eran potencialmente patógenos del gladiolo (Barrows-Broaddus y Dwinell, 1980).

Una enfermedad desconocida causante de la marchitez y muerte de plantas de gladiolo fue estudiada molecularmente mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa) en 2004 en el estado de Puebla, México. En este estudio González (2009), reportó cinco especies fungosas que fueron identificadas en tejido sano y sintomático de cormos plantados y de almacén; también en tejido dañado de tallos basales y cuello de plantas de campo, esta fueron: *F. oxysporum* f. sp

gladioli, *F. solani*, *Penicillium* sp., y dos especies reportadas anteriormente, *Acremonium strictum* y *Gliocadium roseum* que eran desconocidas en este cultivo.

3.3.2.- Importancia

La pudrición del bulbo originada por *F. oxysporum* f. sp. *gladioli* es la enfermedad mas importante del gladiolo y es transmitida por el suelo (Van Rijbroek *et al.*, 1997, Loeffler *et al.*, 2000, Riaz *et al.*, 2009b., Chung *et al.*, 2009). Es el principal problema con el material de siembra (cormos) y se encuentra en raíces, cormos y principalmente en el suelo. (Leyva, 1992, CESVMOR, 2009a). Es considerada la enfermedad más destructiva y se distribuye ampliamente en la mayoría de los países productores de gladiolo del mundo (Paulus *et al.*, 1971, Mishra *et al.*, 2000 Tripathi *et al.*, 2009). *F. oxysporum* f. sp. *gladioli* es un patógeno importante que puede reducir la producción de cormos y flores de gladiolos (Nasir y Riazuddin, 2008b) y causar grandes pérdidas económicas a los productores (Ram *et al.*, 2004). El cultivo de los cormos y las flores se ve obstaculizada por este hongo, la forma especial *gladioli* se ha convertido el mayor problema durante la cultivación (Van Rijbroek *et al.*, 1997).

3.3.3. - Morfología

Una de las características principales de *F. oxysporum* f. sp. *gladioli* es la capacidad para producir varios tipos de esporas como microconidios, macroconidios y clamidosporas, estas últimas sirven como esporas de resistencia (Bautista, 2002, Straathof *et al.*, 1997a). Posee un micelio extenso y algodonoso, frecuentemente con algunos matices rosas, púrpuras o amarillentos; conidióforos variables, delgados, simples o cortos y robustos, ramificados irregularmente, solos o agrupados dentro de un esporodoquio; conidios hialinos variables principalmente de dos clases, frecuentemente sostenidas en pequeñas cabezas húmedas, macroconidios con varias células delgadas, curvadas o encorvadas en donde termina la punta de forma típica de canoa, microconidio unicelular, ovoide o en forma de huso, nacen solos o en cadena algunos conidios intermedios con 2 a 3 células, oblongas o ligeramente curvadas. La especie presenta abundantes microconidios de cabeza falsa, con clamidosporas oscuras, terminales, formadas a expensas del micelio o de los macroconidios, la mayoría de las células son uni o

binucleadas, los núcleos son individuales y contienen 12 cromosomas (Domsch *et al.*, 1980, Romero, 1988 Straathof *et al.*, 1997b).

3.3.4.- Síntomas

La pudrición del cormo tiene tres diferentes formas: vasculares, raíz café y raíz basal seca (Anónimo, 1983). En cormos presenta pequeñas pudriciones húmedas, irregulares; varían de color según al esporular. Dentro de los daños notables, baja el rendimiento de la flor y cuando los daños son severos se pierde la producción de cormos (CESVMOR, 2009a). Cuando los cormos infectados son plantados, los cormos más severamente enfermos no germinan en el suelo, o germinan pero producen hojas débiles y amarillas que pronto mueren. Los cormos menos infectados pueden producir plantas que crecen normalmente hasta la última temporada. Eventualmente, sin embargo, las puntas de las hojas se tornan de un color amarillo y estas comienzan a morir gradualmente hasta que la planta entera esta muerta (Anónimo, 1983). En hojas causa un amarillamiento que comienza por los extremos hasta secar la planta completamente, otro síntoma común en los primeros estadios de desarrollo, es un encurvamiento de las hojas tomando el aspecto de "cuerno torcido" (CESVMOR, 2009a).

3.3.5.- Ciclo de vida y Epidemiología

Wilfret y Woltz (1973), realizaron un experimento en la cual encontraron que la temperatura optima para el desarrollo de la enfermedad de la pudrición del cormo era de 26.6 °C. Observaciones en campo mostraron que la enfermedad fue más evidente a principios del otoño y después de primavera cuando las temperaturas del suelo eran de aproximadamente 26.6 °C, que corresponde al optimo desarrollo y crecimiento de *Fusarium* (Wilfret y Woltz, 1973). Las condiciones que favorecen el desarrollo de esta enfermedad son la alta humedad del suelo, días cortos, mucho nitrógeno y poco potasio. Asimismo, aunque el óptimo desarrollo de la enfermedad es de 25 a 26°C, a los 21.1 °C es menos severa y a los 15.5 °C ya no se presenta. El pH favorable va de 5 a 6, los abonos orgánicos y estiércol fresco ayudan a la producción de *Fusarium* (Bigre, 1990). A temperaturas mas altas y mayor concentración de inóculo dan una alta incidencia de la enfermedad (Van Rijbroek *et al.*, 1997). Bautista (2002) reporto que las temperaturas del suelo de

29 a 35 °C, durante el día, y 24 a 29 °C durante la noche, son las más favorables para la infección, colonización y desarrollo de síntomas.

Según Magie (1980a), menciona que las infecciones de cormos tienden a permanecer en dormancia hasta activarse por el clima caliente, fertilizantes de amonio y altos niveles de nitrógeno. Muchas variedades de gladiolo son tolerantes pero ninguna es resistente a la enfermedad producida por *Fusarium* (Magie, 1980a).

Cuando los cormos se plantan en el suelo infestado con el patógeno, el hongo infecta las raíces y coloniza la zona de elongación en el área de tejido no diferenciado que se convertirá en el tejido vascular. Los vasos del xilema se colonizan antes de expresar los síntomas. Cuando alcanza a diferenciarse, se mueve dentro de los vasos del xilema y se dispersa en la planta, siempre y cuando la temperatura del suelo y el ambiente le sean favorables (Bautista, 2002).

El tamaño de los cormos de gladiolo no tiene un efecto significativo en el nivel de infección de *F. oxysporum gladioli* (Van Rijbroek *et al.*, 1997). La existencia de infecciones latentes de *Fusarium* en los bulbos de gladiolo puede causar serios problemas en la práctica. Cuando los cormos aparentemente sanos son plantados a veces presentan síntomas severos de *Fusarium*, incluso cuando un tratamiento fungicida adecuado se ha dado a los cormos (Roebroek *et al.*, 1990).

3.3.6.- Toxinas

Las fitotoxinas son bien caracterizadas como simples moléculas para la resistencia del hongo. Entre estos metabolitos, el ácido fusárico y el deoxinivalenol juegan un papel importante en el desarrollo de la enfermedad (Nasir y Riazuddin, 2008a). Las variedades de gladiolo "Friendship", "Peter Pears", "Victor Borge" y "Novalux" son altamente susceptibles al ácido fusárico (Nasir y Riazuddin, 2008b).

3.3.7.- Control

El control de *F. oxysporum* f. sp. *gladioli* se ha estudiado desde el punto de vista preventivo y curativo.

3.3.7.1.- Control cultural

El cultivo del gladiolo, por diversos aspectos fitosanitarios, se ha desarrollado en forma rotacional en las regiones productoras. Se debe evitar el cultivo de esta especie en vecindad con plantas que son susceptibles a las enfermedades y que pueden transmitir infecciones. Entre las plantas ornamentales que se deben evitar, se encuentran las siguientes: aster (*Aster* sp), pensamiento (*Viola tricolor*), zinnia (*Zinnia* sp.), violeta (*Viola* sp.), perritos (*Antirrhinum majus*), y hortalizas tales como calabazas (*Cucurbita* sp.), frijol (*Phaseolus vulgaris*), chícharo (*Physalis sativum*), zanahoria (*Daucus carota*), pepino (*Cucumis sativus*), jitomate (*Lycopersicum esculentum*), apio (*Apium graveolens*). Leszczyńska (1994), menciona que es necesario llevar a cabo una rotación del cultivo por lo menos cada seis o siete años.

La biofumigación ha sido comúnmente usada para el control de patógenos de suelo, desafortunadamente algunos fumigantes poseen atributos negativos como peligros o riesgos a la salud humana, la contaminación ambiental y la reducción de la capa de ozono. Ante esto Riaz *et al.* (2009b), evaluaron la co-cultivación y rotación de cultivos para el manejo de esta enfermedad. Ellos utilizaron en la co-cultivación a la cebolla (*Allium cepa*), nabo silvestre (*Brassica campestris*), chile (*Capsicum annum*), nabo o mostacilla (*Eruca sativa*), girasol (*Helianthus annuus*), zempazuchitl (*Tagetes erectus*) y maíz (*Zea mays*). Estos cultivos redujeron la incidencia de la enfermedad al ser rotado con el cultivo de gladiolo.

3.3.7.2.- Control térmico

El propósito de este tratamiento es reducir la posibilidad de pudrición de los cormos. Las esporas de *Fusarium* se eliminan a temperaturas mayores (55 a 57 °C). Pero a temperaturas mayores de 57 °C se dañan los cormos. Este método fue diseñado en Holanda y fue utilizado desde 1950 por los productores de gladiola en Florida. Principalmente se aplica a los cormos de 2 a 6 cm de diámetro y cormillos. Para aplicar este método, los cormillos deben de estar en dormancia (Leszczyńska, 1994).

Un primer tratamiento con agua caliente en el manejo de *F. oxysporum* f. sp. *gladioli* fue realizado por Bald *et al.* (1956), en el cual el porcentaje de

germinación y el vigor de los cormillos tratados fueron incrementados por el tratamiento de agua caliente a 57.2 °C por 30 min.

Algunos de los tratamientos térmicos de pre-acondicionamiento de los cormos se han hecho empíricamente causando una emergencia irregular y baja calidad de las flores. Ramos-García *et al.* (2009), realizó un experimento utilizando la plantación de bulbos de gladiolo var. "Blanca Borrego" los cuales fueron sumergidos en quitosano (quitosano grado reactivo y quitosano comercial Biorend®) y en agua caliente a diferentes temperaturas y en tratamientos combinados con Biorend® a 1,5%. Los resultados mostraron que la incidencia de *F. oxysporum* en los cormos infectados en forma natural fue de 0% a temperaturas de 55 °C y 50 °C. Los tiempos de inmersión (0, 10, 15 y 20 min) en agua caliente a 50 °C no mostraron efectos significativos en el desarrollo de plantas y vida de anaquel. Los cormos sumergidos en Biorend® a 1,5% y agua caliente a 50 °C aceleraron su emergencia alrededor de 1-7 días, el número de flores aumentó en dos, se amplió el período de conservación para 1-3 días y se aumentó el número de cormillos.

3.3.7.3.- Control genético

No hay una variedad resistente a la pudrición por *F. oxysporum* f. sp. *gladioli* (Leszczyńska, 1994). Van Rijbroek *et al.* (1997), mencionaron que existen diez variedades moderadamente resistentes a este hongo, entre las que destacan la variedad "Amsterdam", "Applause", "Eurovision", "Jacksonville Gold", "Jester2", "Prana", "Rose Supreme", "Victor Borge", "White Goddess" y "Wing Song".

3.3.7.4.- Control biológico

Un número de factores técnicos, ambientales y económicos estimulan el uso de agentes de biocontrol de patógenos del suelo. Después de décadas de investigación en el campo del control biológico únicamente algunos microorganismos están disponibles en el mercado y son aplicados exitosamente en la práctica. Un caso diferente en la historia es el de *Trichoderma* como el ingrediente activo de bioplaguicidas. Cepas de *Trichoderma* sp. se han aplicado exitosamente contra pudriciones basales y de raíces causados por *Phytium ultimum*, *Phytophthora* spp., *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia* spp, y pudriciones

ocasionadas por *Fusarium* en un gran número de cultivos (Vannacci y Gullino, 2000).

El control biológico sólo o integrado con otros métodos de control es un atractivo para el manejo de esta enfermedad. La integración de los agentes microbianos de control biológico con dosis sub-letales de fungicidas se considera una vía prometedora para el control de este agente patógeno con una interferencia mínima con el equilibrio biológico (Mishra *et al.*, 2000). El aislamiento de *Trichoderma virens* y una combinación de *T. virens* con carboxin fueron evaluados por Mishra *et al.* (2000), para el control de *F. oxysporum* f. sp. *gladioli* en experimentos bajo condiciones de invernadero y campo. Todos los tratamientos redujeron significativamente la incidencia de la enfermedad bajo condiciones de invernadero y campo. *T. virens* dio un control de menor a bueno comparado con el carboxin en los experimentos. La incidencia de la enfermedad se redujo de 42.5% en el testigo sin tratar a 8.5% y 11% con los tratamientos probados. En el primer año del ensayo de campo los tratamientos químicos simples y biológicos dieron una reducción similar en la incidencia de la enfermedad de 66% en el testigo tratado a 21-23.5%. La combinación de los tratamientos dio una reducción significativa en la incidencia de la enfermedad de 16-18% en comparación con los tratamientos individuales. En el segundo año se obtuvo una incidencia de la enfermedad similar a la del primer año.

La efectividad de los agentes de biocontrol *T. harzianum* (T014) y *Pseudomonas fluorescens* (PS07) se compararon con carbendazim (200 ppm) por Khan y Mustafa (2005), contra la pudrición ocasionada por *F. oxysporum* f. sp. *gladioli*, estos agentes de biocontrol mostraron la reducción de la pudrición de cormo el amarillamiento y la población del patógeno en el suelo, además de incrementar el crecimiento y floración del gladiolo. Los patógenos del suelo infectado redujeron significativamente la altura de las plantas en todas las variedades excepto en la variedad "White Prosperity", la reducción fue del 20% en la variedad "Her Majesty" (en comparación con el testigo), seguido de "King Lear" (15%), "American Beauty" (11%) y "Friendship" (10%). *T. harzianum* disminuyó significativamente el crecimiento del hongo, aumentó la altura de las plantas de la variedad "American Beauty" en un 11%, "Her Majesty" en un 10%, y de "King Lear" en un 8% por

encima del control. *P. fluorecens* aumentó significativamente la variable de crecimiento en las variedades "American Beauty", "King Lear" y "Her Majesty" (8-12%) en comparación con el testigo. El fungicida carbendazim también aumentó la altura de las plantas en estas tres variedades.

En otra investigación, cormos de gladiolo se sumergieron en una suspensión de esporas de *Fusarium* no-patogénico (*Fusarium oxysporum* y *F. proliferatum*), algunos cormos se plantaron directamente o se incubaron por periodos de hasta 8 días bajo condiciones de 20 °C antes de ser plantados en el suelo infestado con *F. oxysporum* f. sp. *gladioli* raza 1 (patogénica). Los resultados mostraron que se redujo la severidad de la enfermedad con el tratamiento de *F. oxysporum* no patogénico en comparación con el testigo que tuvo un 100% de incidencia, los tratamientos de los aislamientos no-patogénicos de *F. oxysporum* se aplicaron en un periodo de incubación de 0 días de incubación (0% de control), 1 día (90% de control), 2 días (70% de control), 4 días (30% de control) y 8 días (80% de control) de incubación después de haberse sembrado los cormos en suelos infestado con *F. oxysporum* f. sp. *gladioli* raza 1 (Roebroek y Mes, 1992)

En algunos experimentos de campo realizados por Magie *et al.* (1980b), se mostró que la inoculación de cormos de gladiolo con algunos aislamientos de *F. moniliforme* y *F. solani* protegieron a los cormos de la infección causada por *F. oxysporum* f. sp. *gladioli*. La protección con el aislamiento *F. moniliforme* M-685 fue igual al que se obtuvo con benomil en los diferentes tratamientos de inmersión de cormos. Los resultados indicaron que para el manejo de *F. oxysporum* f. sp. *gladioli* se deben de considerar las condiciones de suelo y las inoculaciones de cormos de gladiolo con *F. moniliforme* y *F. solani* pueden proporcionar un control efectivo de este hongo, *F. moniliforme* M-685 tuvo un 7.5% de incidencia, *F. solani* 3505A obtuvo un 8% de incidencia y los fungicidas tuvieron un 5.5% de incidencia en comparación con el testigo que obtuvo un 30.5% de incidencia (Magie *et al.*, 1980b).

Se realizó un experimento bajo condiciones de invernadero con gladiolos de la variedad "Fany Roja", el propósito fue evaluar el efecto de la micorriza arbuscular en el control de pudrición radical causada por *F. oxysporum* f. sp. *gladioli*. Se

aplicaron tres tratamientos de micorriza (*Glomus* sp. Zac. 19, *G. aggregatum* y sin micorriza) en dos niveles de suelo (infestado naturalmente y pasteurizado). Los resultados mostraron que los mayores índices de la pudrición radical (IPR) correspondieron al suelo infestado y sin micorriza (testigo), mientras que la utilización de micorriza permitió disminuir la pudrición radical (IPR) en el suelo infestado, reduciendo el daño al aplicar *Glomus* sp. Zac-19 de 3.30 hasta 1.35 y a 0.90 al usar *Glomus aggregatum*. La utilización de micorriza arbuscular, tanto *Glomus* sp. Zac. 19 y *G. aggregatum* favoreció el control biológico del daño ocasionado por *F. oxysporum* f. sp. *gladioli* en gladiolo con suelos contaminados por este patógeno (Khalil *et al.*, 2001).

3.3.7.4.1.- Aplicación de extractos vegetales y aceites esenciales

3.3.7.4.1.1.- Extractos vegetales

La actividad antifúngica de diferentes extractos de hojas de trigo (*Triticum aestivum*), maíz (*Zea mays*), girasol (*Helianthus annuus*), chile (*Capsicum annum*), cebolla (*Allium cepa*) y zempazuchitl (*Tagetes erectus*) se evaluó por Riaz *et al.* (2008), en estudios *in vitro* sobre el crecimiento de *F. oxysporum* f. sp. *gladioli*. Los resultados mostraron que los extractos de zempazuchitl, girasol y chile fueron altamente efectivos al reducir significativamente la biomasa del hongo con 54-79%, 33-85% y 45-57%. En el caso de la cebolla, la concentración más alta del extracto (8%) suprimió la biomasa del hongo de manera significativa en un 73%.

En otros experimentos se evaluó la eficacia de extractos acuosos de seis especies de plantas por Riaz *et al.* (2009a), entre las especies de plantas que se evaluaron fueron del árbol del neem (*Azadirachta indica*), alstonia (*Alstonia scholaris*), henna (*Lawsonia alba*), cebolla (*Allium cepa*), ajo (*A. sativum*) y jengibre (*Zingiber officinale*) y un fungicida (carbendazim). Los tratamientos de los extractos acuosos de plantas exhibieron efectos variables en la incidencia y severidad de la enfermedad. *Allium cepa*, *A. sativa* y *Z. officinale* fueron los mejores extractos para el manejo de la enfermedad en comparación con el carbendazim (Riaz *et al.*, 2009a). Los extractos de algunas plantas incluso mostraron mejor potencial en el manejo de la enfermedad que la de la dosis recomendada de carbendazim. El efecto antifúngico más pronunciado se registró en el tratamiento con extracto de ajo, en diferentes concentraciones, se redujó

significativamente la incidencia de la enfermedad de 3-20%, el nivel de severidad de la enfermedad de 0-1 y el número de lesiones de 1 a 6 por cormo. Mientras que los extractos de cebolla redujeron la incidencia de la enfermedad de 7-27%, el nivel de severidad de la enfermedad de 0-2 y el número de lesiones infección de de 3-12 por cormo. Bajas concentraciones del extracto de ajo (5 y 10%) resultaron ser más efectivas que a las concentraciones mayores de este (15 y 20%).

3.3.7.4.1.2.- Aceites esenciales

En otro ensayo Barrera-Necha *et al.* (2009), evaluó el efecto inhibitorio en el crecimiento micelial en bioensayos *in vitro* de aceites esenciales y sus compuestos (timol, mentanol y mentona) para el control de *F. oxysporum* f. sp. *gladioli*. De manera general, se observó que los extractos de epazote (*Teloxys ambrosioides*), hierbabuena (*Mentha piperita*) y limón mexicano (*Citrus aurantifolia*) tuvieron una inhibición en el crecimiento micelial de *F. oxysporum* f. sp. *gladioli*. No se encontraron diferencias significativas entre tratamientos. Los extractos de canela (*Cinnamomum zeylanicum*) tomillo (*Thymus vulgaris*) y clavo (*Syzygium aromaticum*) ejercieron una inhibición total del crecimiento micelial en las concentraciones de 100, 150, 200, 250 y 300 mg ml⁻¹. La reducción del crecimiento fue de 5.4 a 6 mm⁻¹ día en el aceite de epazote (*Teloxys ambrosioides*), menta (*Mentha piperita*) y lima (*Citrus aurantifolia*) cuando se aumento la dosis de 100 a 300 mg ml⁻¹.

Se evaluó *in vitro* el efecto de los aceites esenciales de las hojas de Chan (*Hyptis suaveolens* L.) en el crecimiento y morfogénesis de *F. oxysporum* f. sp. *gladioli*. La toxicidad antifúngica del aceite de este se midió en la inhibición del crecimiento radial micelial, la cual se inhibió a las concentraciones de 0.998 y 0.748 µg ml⁻¹. La inhibición de la germinación de conidios fue a una concentración de 0.450 µg ml⁻¹ (Tripathi *et al.*, 2009).

3.3.7.4.2.- Suelos supresores

Se ha descrito la existencia de suelos que suprimen la enfermedad de *F. oxysporum* a pesar de la presencia del patógeno. Los suelos supresores que inhibieron la pudrición del gladiolo causada por *Fusarium* se han reportado en

muchos estudios. Su inhibición sobre *Fusarium* ha sido atribuida a la influencia de las propiedades físico-químicas del suelo. Entre los microorganismos del suelo, las poblaciones de *F. oxysporum* no patogénico están particularmente implicadas en los mecanismos de supresión del suelo a las pudriciones causadas por *Fusarium* (Abadie *et al.*, 1998). De acuerdo con Forsyth *et al.* (2006), la variación en los niveles de supresión, la especificidad del hospedero y el espectro de la supresión de la enfermedad pueden depender de los mecanismos mediante los que el suelo actúa para reducir la enfermedad. Asimismo, mencionaron que los mecanismos a través de cual los suelos supresores actúan para reducir la enfermedad dependen de factores abióticos y bióticos. En los suelos supresores, las interacciones entre las cepas patógenas y no patógenas dieron como resultado el control de la enfermedad. Por lo tanto, las cepas no patógenas se desarrollan como agentes de biocontrol. Las cepas no-patógenas de *F. oxysporum* mostraron varios modos de acción que contribuyeron a su capacidad de control biológico. Estas cepas fueron capaces de competir por los nutrientes en el suelo, afectando la tasa de germinación de clamidosporas del patógeno. También pudieron competir por los sitios de infección en la raíz, y pudieron provocar reacciones de defensa en plantas, induciendo resistencia sistémica. Estos mecanismos son más o menos importantes dependiendo de la cepa (Fravel *et al.*, 2003).

3.3.7.5.- Control químico

El tratamiento del suelo con químicos específicos para eliminar o reducir *F. oxysporum* fue el primer intento en el siglo diecinueve. Después de la primera guerra mundial, la cloropicrina fue usada para fumigar el suelo. Después el bromuro de metilo, 1,3 dicloropropeno y otros hidrocarburos halogenados también tuvieron éxito en el control de nemátodos y patógenos del suelo (Rees, 1992).

En 1969 se desarrollo el etridiazol como fungicida para el control de patógenos de suelo, siendo efectivo contra hongos del suelo como *Pythium*, *Phytophthora*, *Rhizoctonia* y *Fusarium*, además de considerarse un inhibidor de bacterias y tener propiedades nematicidas. Este fungicida esta formulado en una mezcla con el pentacloronitrobenceno (PCNB) para aumentar su actividad de control y tener un amplio espectro para el control de *Fusarium* y otros patógenos (Rees, 1992).

El amarillamiento y la pudrición basal de gladiolo causada por *F. oxysporum* f. sp. *gladioli* Snyd y Hans se trató con la inmersión de cormos en tiabendazol y benomil, los fungicidas redujeron el número de plantas enfermas a 4.3 y 5.1% en comparación con el testigo 13.1%, además de que el tiabendazol obtuvo el 60.5% y benomil el 61.6% de flores cosechadas en comparación con el testigo que obtuvo solo el 22% (Paulus *et al.*, 1971).

La eficacia de tratamientos de inmersión de cormos pre-plantados se estudió por Šmit y Ševar (1986), en la cual se utilizaron los fungicidas captan, tiram, folpet, benomil, tiabendazol, procloraz y una combinación de los primeros con captan y benomil, los cuales dieron un control efectivo contra *F. oxysporum* f. sp. *gladioli*. La reducción en las pérdidas se obtuvo con la combinación de captan + benomil ya que se obtuvo un 43.3% de pérdidas en comparación con el testigo que tuvo un 93% después de tres meses de haber sido plantados. De manera general, en cada tratamiento bajo inmersión de fungicidas se obtuvo una protección efectiva evidente por un gran número de cormos sanos, el vigor de las plantas fue mayor, el número de cormillos formados y una alta incidencia en el gran tamaño de los cormos se obtuvieron.

Para incrementar la eficacia de los fungicidas Ram *et al.* (2004), mencionaron que se debe bajar el pH de la solución fungicida. En este estudio tres grupos químicos se usaron en este ensayo para bajar el pH entre ellos están el ácido acético, ácido ascórbico, y etefon, el pH se bajó a 3.2 y sumergiendo los cormos durante 30-60 min. Los mejores resultados se obtuvieron por el uso de ácido acético (60 min) al obtener un 6.6% de incidencia de la enfermedad seguido por el ácido ascórbico (60 min) con un 10.92% de incidencia, con el etefón (60 min) se obtuvo un 6.83% de incidencia en comparación con el testigo que tuvo un 20.53% de incidencia.

3.3.8.- Métodos de inoculación de patógenos de suelo

En donde sea posible, la inoculación con patógenos de raíces debería de tener lugar utilizando el curso natural de la infección y los niveles naturales del inoculo. Por consiguiente, un conocimiento previo de los niveles de inóculo y la capacidad del inóculo en suelos infestados de manera natural, el tipo de estructuras

infectivas del patógeno (por ejemplo zoosporas, clamidosporas etc.) y la localización del curso de toda la infección contribuye al desarrollo de ensayos de patogenicidad que estimulan la infección natural (Hillocks y Waller, 1997).

El inóculo puede ser adicionado directamente al medio de las macetas ya sea en pre-siembra o cuando las plantas se encuentran en varias etapas de crecimiento después de ser sembradas. Las zoosporas, oosporas, conidios y otros propágulos pueden ser aplicados en niveles cuantificables en términos de números por gramo de peso seco de mezcla. Alternativamente el micelio de cultivos puros puede ser cosechado, lavado, el exceso de agua puede ser removido por la presión entre el papel absorbente y puede ser aplicado a un peso dado fresco por gramo de peso seco de la mezcla (Hillocks y Waller, 1997).

El control de los parámetros ambientales, incluidos la temperatura y los niveles de humedad del suelo, pueden ser críticos en proveer las condiciones favorables para el desarrollo de la enfermedad (Hillocks y Waller, 1997).

3.3.9.- Métodos de inoculación de *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli*

Pruebas de inoculación en numerosas variedades con aislamientos de *Fusarium* han demostrado un amplio rango de niveles de susceptibilidad por variedad. Wilfret y Woltz (1973), realizaron un experimento para observar la susceptibilidad de diferentes variedades de gladiolos para *F. oxysporum* f. sp. *gladioli* preparado por una mezcla de 7 aislamientos de *Fusarium*, el crecimiento del hongo en caldo dextrosa de papa usando constante agitación del medio y diluido a 1×10^6 microconidios por mililitro. Aproximadamente 0.1 ml de la suspensión de esporas se pusieron en la superficie cortada de cada mitad de 25 cormos de cada variedad y se colocaron en bolsas de polietileno cubiertas con vermiculita húmeda. Los cormos se evaluaron tres semanas después de la inoculación para obtener el desarrollo de la enfermedad por el corte vertical de los cormos y estimar el porcentaje de tejido enfermo. Los resultados indicaron que se obtuvo una incidencia de la enfermedad en los cormos inoculados que varió del 21.2% al 79.2%, en los cuales estuvieron en los extremos las variedades "Beverly Ann" y "Friendship", en los cormos no inoculados se encontró incidencia de la

enfermedad indicando infecciones naturales latentes, la temperatura en la que se encontró una alta incidencia fue de 26.6 °C (Wilfret y Woltz, 1973).

Jones y Jenkins (1974), evaluaron la resistencia en gladiolo a *F. oxysporum* f. sp. *gladioli*, en 25 variedades de gladiolo que se sembraron en macetas de plástico, los cormos de estas variedades se dañaron con un cepillo de alambre rígido en dos sitios, después se inocularon al vertirse 50 ml del inóculo que consistía de esporas y micelio preparado del crecimiento del hongo en caldo dextrosa papa de 10 días de edad (el medio se mantuvo en un cuarto oscuro a 25 °C). Después de la inoculación, los cormos se sembraron. Los resultados mostraron que en las plantas no inoculadas se observó la presencia de infecciones latentes de *Fusarium* en los cormos, los síntomas en follaje de *F. oxysporum* no siempre correspondieron con las reacciones del cormo y raíz. En las plantas con cormos gravemente dañados y raíces, a menudo se produjeron menos síntomas en follaje, en muchos casos, los síntomas en follaje aparecieron como resultado de la pudrición de la raíz. De manera general la incidencia de la enfermedad fue del 61-100% (heridos e inoculados) en la variedad "Frienship". En la variedad "Valeria" la incidencia fue del 31-61% (heridos no inoculados, heridos inoculados), la variedad "Beverly Ann" mostró un 31-61% (heridos no inoculados, heridos inoculados) y la variedad "Fiat Lux" tuvo un 6-30% (heridos no inoculados) y un 31-60% (heridos inoculados). Sin embargo, el follaje de algunas plantas no mostraron síntomas de la enfermedad aunque las raíces estuvieran destruidas. Algunas variedades fueron resistentes en la inoculación cuando fueron heridas e inoculadas, mientras que otras variedades fueron resistentes si estas no fueron heridas.

Magie (1980b), realizó varios experimentos con aislamientos de *F. oxysporum* f. sp. *gladioli*, los cuales consistieron en la aplicación de suspensiones de conidios de 800,000 a 1,200,000 ml⁻¹ de 5 días de edad. Los cormos se sumergieron por dos segundos y posteriormente se sembraron en bolsas de plástico. Los resultados mostraron que el testigo (no inoculado) obtuvo un 30.5% de pudriciones de cormos comparados con el 30.5% (*F. moniliforme* M-669), 7.5% (*F. moniliforme* M-685), 8% (*F. solani* 3505A), 40% (*F. solani* CF-12), 41.5% (*F. solani* 3505A) y 5.5% (benomil + captan por 10 min).

En otro experimento realizado por Barrow-Broadbent y Dwinell (1980), el inóculo de *F. oxysporum* f. sp. *gladioli* se cultivo en medio Czapek, después de 4 días de haber sido sembrado a 25 °C la concentración se ajustó a 1×10^6 conidios ml^{-1} , la superficie de los cormos se esterilizó, después se hicieron orificios en los cormos con un horador del # 3 a una profundidad de 1.25 cm, el inóculo (0.1 ml) se adicionó dentro del orificio con una micropipeta, los orificios se taparon con algodón estéril y los cormos se colocaron en bolsas de polietileno con suelo estéril. Los resultados mostraron un promedio del 4% en el índice de pudrición del aislamiento O-700 y un 2.75% del aislamiento O-706 de *F. oxysporum* f. sp. *gladioli* en comparación con el testigo que obtuvo el 1%.

En otro experimento con *F. oxysporum* f. sp. *gladioli* en el cultivo de *Fressia*, Rattink (1986), se aisló este hongo y se sembró en una solución Richard's a 23 °C por diez días. El contenido de un matraz fue homogenizado, 50 ml de la suspensión se adicionó al suelo de las macetas en donde se sembraron plantas de *Fressia*. Los resultados mostraron que después de la inoculación en *Fressia* con diferentes aislamientos de *F. oxysporum* f. sp. *gladioli* se obtuvo una incidencia de síntomas en plantas desde los 3.5% a 13%, indicando la transmisión de *F. oxysporum* f. sp. *gladioli* del suelo a los cormos sanos, sin embargo, plantas de *Fressia* no inoculadas mostraron un índice de pudrición cercanas al 60% en suelo estéril. En el caso de cormos sanos plantados en suelo no esterilizado se obtuvo un 48% de incidencia. Estos resultados indicaron infecciones latentes en la superficie de los cormos de *Fressia*.

Roebroeck *et al.* (1990), obtuvieron cultivos monospóricos de *F. oxysporum* f. sp. *gladioli* para la inoculación de cormos de gladiolo, los cultivos monospóricos se hicieron en agar papa dextrosa (PDA) y se incubaron a 25 °C por dos semanas. Las suspensiones de esporas se realizaron al verter 0.02% de Tween 80 en los medios de cultivo PDA raspando la superficie del agar con una espátula. Las suspensiones se filtraron para remover los fragmentos de micelio y las esporas se midieron con una cámara de Neubauer, la concentración de esporas se calculó en 100 esporas ml^{-1} y en otro tratamiento fue de 20 esporas ml^{-1} , ambas suspensiones fueron vertidas en diferentes bolsas de plástico antes de sembrar los cormos. Los resultados mostraron que de 25 bolsas sembradas a las que se

les adiciono la primer suspensión (100 esporas ml^{-1}) resultaron en 100% de infección, en contraste a las bolsas que se les adicionó la segunda suspensión de esporas (20 esporas ml^{-1}) en donde se obtuvo sólo el 46% de infección.

Roebroek y Mes (1992), realizaron un experimento con *F. oxysporum* f. sp. *gladioli* en gladiolo, ellos prepararon una suspensión de esporas de *F. oxysporum* f. sp. *gladioli* provenientes de medio PDA incubado por dos semanas a 27 °C bajo condiciones de obscuridad. A la suspensión de esporas se le adicionó 0.02% de Tween 80, se filtró en papel No. 269 para remover fragmentos de micelio, y se ajustó la concentración a 10^6 esporas ml^{-1} . Posteriormente, se mezclaron con el suelo (10 ml de la suspensión por litro de suelo) antes de sembrar los cormos. Los cormos de la variedad "Peter Pears" se sembraron en el suelo inoculado y se ubicaron en invernadero a temperaturas de 23-30 °C. Los resultados de la inoculación después de seis semanas de haberse plantado mostraron un 100% de incidencia de la enfermedad en los testigos comparado con los tratamientos de aislamientos no-patogénicos de *F. oxysporum* que se aplicaron en un periodo de incubación de 1 (10% de incidencia), 2 (30% de incidencia), 4 (70% de incidencia) y 8 días (20% de incidencia) después de haberse sembrado los cormos

Van Rijbroek *et al.* (1997), realizaron un ensayo para observar la resistencia de variedades de gladiolo a *F. oxysporum* f. sp. *gladioli* con diferentes concentraciones de inóculo, la manera de realizar la inoculación fue en el suelo. Para la infestación del suelo se utilizó una mezcla de dos aislamientos agresivos de *F. oxysporum* f. sp. *gladioli*. Los hongos se mantuvieron en medio de crecimiento Czapek para la preparación del inóculo. El hongo se vació en jarras de vidrio y se mezcló con una mezcla de tierra-avena estéril a 23 °C por dos semanas. Todo el crecimiento micelial de la mezcla se molió y se mezcló con el suelo a una concentración de 0.1%, posteriormente se sembraron los cormos de gladiolo. Tres concentraciones de la mezcla de *F. oxysporum* f. sp. *gladioli* se calcularon en 37,000, 24,000 y 11,000 propágulos por gramo de suelo. Los resultados mostraron que únicamente el nivel alto del inóculo (37,000 propágulos por gramo de suelo) dio un alto nivel de infección para todas las variedades del gladiolo.

Straathof *et al.* (1997a), realizaron el mismo método de inoculación antes mencionado por Van Rijbroek *et al.* (1997). La concentración de propágulos fue de 11.10^4 propágulos por gramo de suelo. Los resultados mostraron que el porcentaje de infección varió dependiendo del tipo de variedad, ellos mostraron que en variedades tolerantes únicamente se obtuvo el 11% de infección (Roselind+*G. dalenii* 031-3), y 14% (*G. dalenii* 031-3 + Roselind). La severidad de la enfermedad fue baja, en contraste con las variedades susceptibles se obtuvieron incidencia de 92% (Applause+Hunting Song) y 87% (Petear Pears+Applause).

Shakir *et al.* (1998), aislaron al patógeno de raíces y cormos con síntomas de la enfermedad. Piezas de los cormos infectados se cortaron y se colocaron en medio PDA y se incubaron a 25 °C. Los cormos sanos se sumergieron en una solución de *F. oxysporum* f. sp. *gladioli*, la cual consistió en que a todo el contenido de medio de cultivo PDA de 15 días de edad se le adicionó 200 ml de agua esterilizada para después hacer la inmersión por 24 h de los cormos. Después se sembraron en suelo estéril, y se incubaron a diferentes temperaturas. Los resultados mostraron que hubo la incidencia de la enfermedad fue de 72% a 25 °C, 64% a 30 °C, 36% a 20 °C, 8% a 15 °C y 0% a 10 °C después de 90 días de haber sido inoculados.

Straathof *et al.* (1998), utilizaron los aislamientos agresivos de *F. oxysporum* f. sp. *gladioli* con la finalidad de seleccionar variedades resistentes de gladiolo a esta enfermedad. Ellos utilizaron el mismo método de inoculación que Van Rijbroek *et al.* (1997), el número de propágulos fue de 13.10^4 por gramo de suelo y después de preparar la mezcla del inóculo y el suelo, los cormos se sembraron. Después de dos semanas de inoculación el índice promedio de la enfermedad en la variedad "Advance" fue de 5%, "Ámsterdam" 2.6%, "Applause" 2.1%, "Flower Song" 5%, "Hopmans Glory" 3.8%, "Hunting Song" 5%, "Jessica" 4.7%, "Jessie M Corner" 1.2%, "Maureen" 2.4%, "Oscar" 4.9%, "Meter Pears" 5.0%, "Ravissante" 2.3%, "Roselind" 1.0%, "Rougex" 4.3%, "Saxony" 2.4%, "White Prosperity" 4.4%, "177J" 4%, "Alice" 3.8%, "Charmer" 4.4%, "Georgette" 3.9%, "Harrógate" 4.3%, "Kryptos" 5.0%, "Richmond" 4.8%, "Harlekyn" 1.3%, "Mirella" 4.8%, "Perseus" 2.6%, "Yellows Special" 1.9%, "Albus" 5%, "Nymph" 5%, "Robinetta" 5%, "Rose

Charm" 4.8%, y "Cornelius" 1.3%. Se encontraron altos niveles de tolerancia a *F. oxysporum* f. sp. *gladioli* en tres especies (*G. calianthus*, *G. ganierii* y *G. dalenii*), en cuanto a *G. dalenii* 10 de las 15 variedades inoculadas no produjeron síntomas.

Haan *et al.* (2000), realizaron la inoculación en cormos de gladiolo en las variedades "Peter Pears" y "Nymph" de acuerdo al método reportado por Roebroek y Mes (1992). Ellos obtuvieron 132 aislamientos de los cuales 74 aislamientos correspondieron a *F. oxysporum* f. sp. *gladioli*, 38 aislamientos correspondieron a *F. oxysporum* f. sp. *asparagi*, *pisi*, *lupini*, y *cepa*e y 20 aislamientos de otros cultivos (tulipan, narciso, ciclamen y clavel). Los cormos de gladiolo se sumergieron en una suspensión de esporas 1×10^6 y se mezclaron con el suelo. Después de seis semanas de haberse sembrado los cormos y con una temperatura promedio de 23 °C el índice de patogenicidad se obtuvo. De los 132 aislamientos de *F. oxysporum* f. sp. *gladioli*, 44 aislamientos fueron patogénicos para ambas variedades ("Peter Pears" y "Nymph") y se clasificaron como raza 1, 23 de los aislamientos de *F. oxysporum* f. sp. *gladioli* fueron patogénicos a la variedad "Nymph" y fueron asignados como raza 2. Un grupo de 65 aislamientos no causaron síntomas.

Mishra *et al.* (2000), evaluaron un método diferente de inoculación, ellos inocularon a *F. oxysporum* f. sp. *gladioli* en granos de sorgo, los granos colonizados se secaron y se molieron hasta hacer un polvo fino. La concentración del inóculo de la preparación del polvo fino se ajustó por el uso de polvo fino como relleno para dar una concentración de 10^7 conidios por gramo de producto final. El polvo se vertió en suelo estéril (3 g kg⁻¹ de suelo) para que después se plantaran los cormos de gladiolo. El porcentaje de pudrición de cormos a los 60 días fue del 42.5% en el testigo, el tratamiento con *T. virens* obtuvo el 10% incidencia de cormos podridos y el carboxin con el 11% de incidencia, la combinación de ambos obtuvo un 8.5% de incidencia.

Ram *et al.* (2004), realizaron un experimento para evaluar diferentes fungicidas para el control de *F. oxysporum* f. sp. *gladioli*. En este estudio se seleccionaron cormos provenientes de campo sanos y cormos con daños visuales de síntomas

de *F. oxysporum* f. sp. *gladioli*, después se sumergieron en diferentes soluciones de fungicidas. Los resultados mostraron que en los testigos la incidencia de la enfermedad fue el primer año 35.47%, el segundo año 34.45% y el tercer año 40.73%. La incidencia de la enfermedad en cormos tratados con fungicidas fue en un rango del 9.9% al 33% en tres años de investigación.

En otro experimento llevado a cabo por Khan y Mustafa (2005), se inoculó semillas de sorgo con cultivos puros de *F. oxysporum* f. sp. *gladioli* durante 8 días a 25 °C. Las semillas de sorgo colonizado por *F. oxysporum* f. sp. *gladioli* se maceraron con agua destilada y un molino eléctrico para preparar una suspensión del inóculo. Una suspensión de 25 ml con 4 g de semilla de sorgo colonizado se mezclaron con 2 kg de suelo estéril, se colocaron en macetas para posteriormente sembrar cormos de gladiolo. Después de cuatro meses los resultados mostraron que la infestación del suelo con *F. oxysporum* f. sp. *gladioli* causaron síntomas característicos de la pudrición café y amarillamiento en todas las plantas. Las variedades "King Lear", "Frienship", y "Her Majesty" mostraron amarillamiento de hojas y pudrición en el centro de los cormos, la excepción fue la variedad "White Prosperity" que no mostró síntomas. Los índices de severidad de la enfermedad se determinaron con una escala en la cual la variedad "White Prosperity" obtuvo un 19% de pudrición y amarillamiento, la variedad "King Lear" un 20-39%, "Friend Ship" un 40-59%, "Her Majesty" con 40-59% y "American Beauty" 20-39%.

Sharma y Tripathi (2008), utilizaron la variedad "Frienship Pink". Antes de la aplicación de los tratamientos (agua caliente, radiación UV-C, aceite esencial o tratamientos integrados), los cormos se hirieron con un alfiler en distintos lados (aprox. 25 por cada cormo, cada pinchazo de 3 mm de profundidad con un diámetro 1.5 mm de diámetro). Se inocularon bajo inmersión en una suspensión de conidios 10^6 del patógeno durante 30 min. y se incubaron a 25 ± 2 °C durante 24 h. Los resultados mostraron que después de 4 semanas los testigos inoculados obtuvieron un 47.22% de incidencia y posteriormente a las 12 semanas se obtuvo un 57.37% en comparación con el tratamiento del aceite esencial "*H. suaveolens*" que obtuvo de 0% a 1.13% después de 12 semanas con la mayor concentración del mismo .

Para la preparación del inóculo de *F. oxysporum* f. sp. *gladioli* González (2009), preparó 13 aislamientos de *F. oxysporum* f. sp. *gladioli* en agar papa-zanahoria los cuales se incubaron a 28 °C bajo condiciones de luz blanca. La suspensión conidial fue de 2.4×10^6 en 50 ml de agua destilada. Cuatro cormos se inocularon con cada aislamiento (dos cormos con heridas en la periferia basal y dos con heridas). La suspensión conidial se añadió al tallo basal de todas las plantas sembradas. Los síntomas de la enfermedad se evaluaron 30 días después de la inoculación. Los resultados mostraron que todos los aislamientos fueron patogénicos principalmente en tejidos heridos mostrando pudrición basal y pudrición de nuevos cormos, el porcentaje del área del corno infectada con *F. oxysporum* f. sp. *gladioli* fue del 40%-50%.

IV.- MATERIALES Y MÉTODOS

4.1.- Lugar de muestreo

La zona de muestreo comprendió el municipio de Cuautla, que es uno de los principales municipios productores del cultivo de gladiolo en el estado de Morelos. Se realizó un recorrido de campo, llevándose a cabo la colecta en el campo denominado “Puxtla” donde había áreas infestadas de *F. oxysporum* f. sp. *gladioli* (Fig. 1). Se colectaron cormos de gladiolo y plantas de diferentes variedades, los cuales presentaron síntomas característicos de la infección causada por *F. oxysporum* f. sp. *gladioli* (Fig. 2). La toma de muestras se realizó en diferentes puntos de cada parcela en donde se observaron plantas con amarillamiento, marchitamiento y muerte total de la planta. Las muestras se sacaron con una pala recta y se colocaron en bolsas de plástico previamente etiquetadas (lugar, fecha), las cuales fueron llevadas al laboratorio de Fitosanidad del Centro de Desarrollo de Productos Bióticos (CEPROBI) del Instituto Politécnico Nacional en Yautepec Morelos. Además de colectar plantas y cormos de gladiolo, se colectó suelo de la zona cercana a la raíz de las plantas de gladiolo que presentaban síntomas característicos de amarillamiento y muerte causado por *F. oxysporum* f. sp. *gladioli*.



Fig. 1.- Colecta de plantas enfermas y suelo en la región de Cuautla.

4.2.- Colecta de cormos

Los cormos colectados pertenecían a la variedad “Roja borrega”, los cuales fueron utilizados en el experimento.



Fig. 2. Síntomas de la fusariosis en plantas colectadas de campo.

4.3.- Aislamiento y purificación de *Fusarium*

Los cormos y plantas de gladiolo con los síntomas anteriormente descritos se colocaron en una solución con hipoclorito de sodio al 1% durante 3 min, se enjuagaron con agua destilada estéril y se colocaron en cámaras húmedas durante 24 h para promover el crecimiento de micelio (Fig. 3). Una vez que se manifestó la enfermedad se usaron porciones de micelio las cuales se colocaron en cajas Petri con PDA y se incubaron a temperatura ambiente durante 7 días. Para obtener cultivos monoconidiales, las cepas se purificaron con la técnica de punta de hifa, transfiriendo el micelio en cajas Petri nuevas con PDA. El suelo colectado se puso bajo condiciones de oscuridad y humedad (30 días).



Fig. 3. Plantas de gladiolo enfermas en cámara húmeda.

4.4.- Identificación del patógeno

Para la identificación taxonómica de los aislamientos de *Fusarium* a nivel de género se utilizó la metodología de clasificación de Barnett y Hunter (1998); la cual toma en cuenta la forma y el color de la colonia, este último consiste en un crecimiento algodonoso con coloraciones rosas, púrpuras y blancas (Fig. 4). Para la identificación a nivel de especie de *F. oxysporum* se consideraron las descripciones de Booth (1971), Smiley *et al.*, 1992 y Domsch *et al.*, (1980), las cuales consideran estructuras como microconidios, macroconidios y clamidosporas, los macroconidios de forma curvados o encorvadas y la punta de forma típica de canoa (Fig. 5).

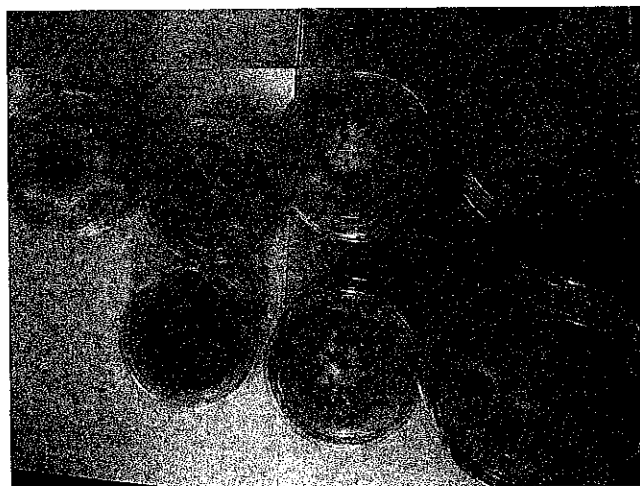


Fig. 4. Crecimiento algodonoso de *F. oxysporum* en cajas Petri con coloraciones rosas, púrpuras y blancas.

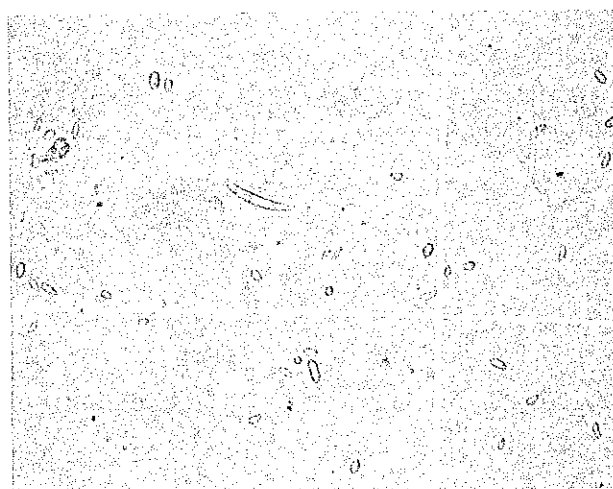


Fig. 5. Microconidios y macroconidios característicos de *F. oxysporum*

4.5.- Evaluación de diferentes métodos de inoculación

En todos los tratamientos los cormos se sembraron en dos tipos de suelo: estéril (121°C, 15 lb de presión durante 3 h) y con inóculo (suelo colectado de las áreas infestadas). Una vez identificado el hongo se realizaron los diferentes métodos de inoculación que se describen a continuación:

4.5.1.- Siembra directa de cormos con lesiones

El primer método de inoculación fue de manera directa al seleccionar cormos que presentaban lesiones o síntomas característicos de *F. oxysporum* f. sp. *gladioli* (pequeñas pudriciones húmedas, irregulares, que variaban de color de café a rojizo y hundidas) (Fig. 6).



Fig. 6. Cormos con síntomas de pudrición por *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli*.

4.5.2.- Siembra directa de cormos sanos

Una vez obtenidas la cepa puras de *F. oxysporum* f. sp. *gladioli*, se realizó un segundo método de inoculación que consistió en sembrar cormos aparentemente sanos en suelo estéril y suelo infestado. Una vez emergida la raíz de aproximadamente 3 cm de longitud se les agregó una solución de esporas a la raíz. Para la preparación de la solución de esporas se agregó primeramente agua estéril a la caja Petri con el inóculo de 10 días de edad y se raspó todo el contenido (Fig. 7). Después se realizó el conteo de esporas en la cámara de Neubauer, ajustando la concentración final a 10^6 esporas ml^{-1} . A la solución de

esporas se le adicionó Tween 20 ($20 \mu\text{l ml}^{-1}$). Una vez obtenida la solución, se adicionaron 10 ml en los 3 primeros cm de profundidad del suelo en plántulas emergidas, previamente sembradas. Después de 5 días de la primera inoculación se realizó una segunda inoculación con 5 ml de la solución citada anteriormente (Fig. 8).



Fig. 7. Preparación de la solución de esporas de *F. oxysporum* f. sp. *gladioli*.



Fig. 8. Aplicación de la segunda inoculación de la solución de esporas de *F. oxysporum* f. sp. *gladioli*.

4.5.3.- Siembra directa de cormos sanos dañados con punciones e inoculados

El tercer método de inoculación consistió en sumergir cormos, previamente dañados de forma manual, en la solución de esporas de la cepa de *F. oxysporum* f. sp. *gladioli*. Los cormos se dañaron mediante punciones realizadas con una aguja de disección estéril, cerca de la zona de raíz (20 punciones) (Fig. 9). La solución de esporas se realizó siguiendo la metodología antes descrita utilizando la misma concentración. Se sumergieron los cormos dañados en forma manual en la solución de esporas durante 24 h (Fig. 10).

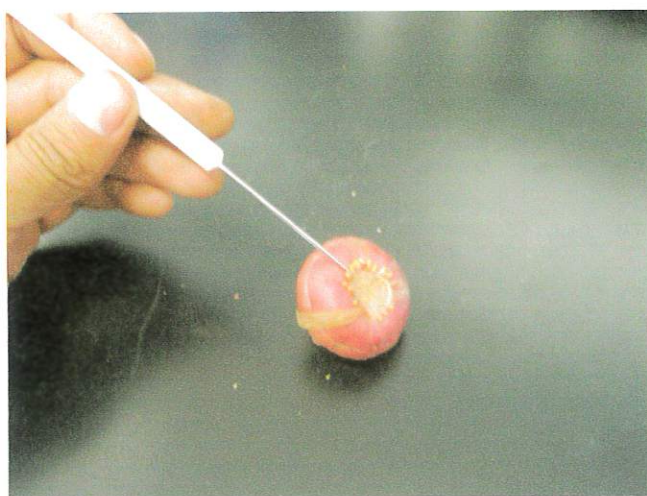


Fig. 9. Daño mecánico a los cormos de gladiolo mediante punciones.



Fig.10. Inmersión de cormos en la solución de esporas (10^6) de *F. oxysporum* f. sp. *gladioli*.

4.5.4.- Siembra directa de cormos sanos dañados con bisturí e inoculados

Previo a la inoculación se sembraron cormos sanos de gladiolo en suelo estéril para su germinación. Una vez emergido el tallo y la raíz de aproximadamente 3 cm de longitud, se realizaron heridas con bisturí en la zona de crecimiento de la raíz y se sumergieron en la solución de esporas (10^6) de *F. oxysporum* f. sp. *gladioli* durante 48 h (Fig. 11), después se sembraron nuevamente en suelo estéril y con inoculo.



Fig. 11. Heridas mecánicas realizadas con bisturí en la zona de raíz del cormo de gladiolo.

4.5.5.- Siembra directa de cormos sanos y posteriormente dañados e inoculados

Otro método de inoculación consistió en sembrar cormos sanos en suelo estéril. Una vez emergida la raíz de aproximadamente 3 cm de longitud se realizaron heridas mecánicas sobre ésta en la zona de crecimiento de la raíz y en la misma raíz. Se sumergieron los cormos en solución de esporas de *F. oxysporum* f. sp. *gladioli* (10^6) y en otra solución con esporas y micelio (200 ml de agua destilada/caja) durante 24 y 48 h cada uno de los anteriores tratamientos, y obteniéndose por tanto 4 tratamientos. Los cormos se sembraron nuevamente en suelo estéril y con inoculo.

4.5.6.- Siembra de cormos heridos y posteriormente inoculados

El ultimo método de inoculación consistió en realizar orificios con un sacabocados en la parte inferior de los cormos y cercanos al corazón del cormo (aproximadamente de 3.9 mm de diámetro y 1.50 cm de profundidad) (Fig. 12). Una vez que se hizo el orificio en el corazón del cormo, se colocó micelio de *F. oxysporum* f. sp. *gladioli* bajo condiciones asépticas (Fig. 13). El orificio se selló con cera de abeja para evitar la entrada de otros posibles patógenos.



Fig. 12. Daño mecánico en el cormo de gladiolo hecho con un sacabocado.

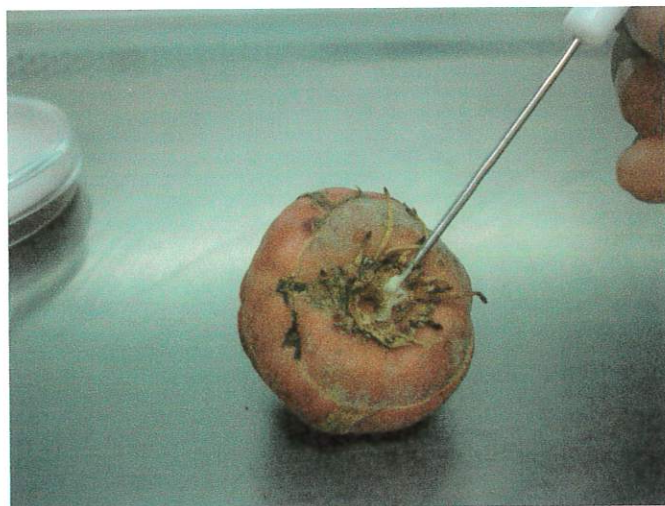


Fig. 13. Inoculación del cormo con micelio de *F. oxysporum* f. sp. *gladioli*.

4.5.7.- Testigo

El testigo consistió en sembrar cormos sin inocular, a los cuales únicamente se les agregó agua destilada esterilizada.

4.6.- Diseño experimental

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con 10 repeticiones por tratamiento (10 tratamientos y 2 niveles para suelo (estéril e inoculado). En el cuadro 1 se resumen los tratamientos evaluados.

Cuadro 1.- Tratamientos evaluados.

Simbología	Tratamiento	Condiciones	
A	Siembra directa de cormos con lesiones	Suelo estéril	Suelo inoculado
B	Siembra directa de cormos sanos	Suelo estéril	Suelo inoculado
C	Siembra directa de cormos inoculados previamente dañados con punciones	Suelo estéril	Suelo inoculado
D	Siembra directa de cormos inoculados dañados con bisturí	Suelo estéril	Suelo inoculado
E 1 c	Siembra directa de cormos sanos y posteriormente dañados	Suelo estéril (24 h) conidios	Suelo inoculado (24 h) conidios
F 1 c y m	Siembra directa de cormos sanos y posteriormente dañados	Suelo estéril (24 h) conidios y micelio	Suelo inoculado (24 h) conidios y micelio
G 2 c	Siembra directa de cormos sanos y posteriormente dañados	Suelo estéril (48 h) conidios	Suelo inoculado (48 h) conidios
H 2 c y m	Siembra directa de cormos sanos y posteriormente dañados	Suelo estéril (48 h) conidios y micelio	Suelo inoculado (48 h) conidios y micelio
I	Siembra de cormos heridos y posteriormente inoculados	Suelo estéril	Suelo inoculado
T	Testigo	Suelo estéril	Suelo inoculado

c: se refiere a la solución de conidios 10^6 . c y m: Se refiere a la solución de conidios y micelio sin filtrar. 1:

se refiere al tiempo de 24 horas en el que se sumergieron los cormos de gladiolo. 2: se refiere al periodo de tiempo de 48 horas en que se sumergieron los cormos de gladiolo.

Todas las plantas se regaron y se mantuvieron en a una temperatura de 28-30 °C y a 80-85% de humedad relativa. Para medir la temperatura del suelo se utilizó un

Termómetro digital modelo RTD 45519, marca TR di Turrón & C, la temperatura ambiental y la humedad relativa se midieron con un higrómetro digital modelo HD 8501, marca Delta OHM. Las evaluaciones se realizaron a los 7, 14, 21 y 28 días después de la inoculación.

Dado que en el invernadero en un ciclo anterior se observó que existieron temperaturas altas lo cual no permitió diferenciar el desarrollo del hongo en estudio y confundió los efectos de los tratamientos, se consideró conveniente hacerlo a campo abierto, bajo condiciones de sombra, en donde las temperaturas se mantuvieron más o menos constantes (26-28 °C) para el óptimo desarrollo de *F. oxysporum* f. sp. *gladioli*.



Fig. 14. Tratamientos a campo abierto.

4.7.- Variables evaluadas

Las variables evaluadas fueron: (i) periodo de incubación, (ii) incidencia y severidad de la enfermedad. El periodo de incubación se consideró como el periodo de tiempo que transcurrió desde la siembra del cormo hasta la aparición de los primeros síntomas en él. La incidencia de la enfermedad se evaluó a través del número de plantas que presentaron los síntomas de amarillamiento con respecto al número total de plantas que se inocularon y se expresó en porcentaje. La severidad de la enfermedad se determinó a través de una escala de daños

siguiendo la metodología propuesta por Unterstenhofer (1976) citado por Mendoza (1997) (Cuadro 2). Estos autores demostraron que para algunas enfermedades hay una alta relación de significancia entre la incidencia y la severidad. En consecuencia, es posible estimar la severidad a partir de los datos de incidencia, facilitando así la estandarización de las fuentes y evaluaciones de la enfermedad. Se realizaron algunas adecuaciones en las escalas para describir esta enfermedad y se utilizó finalmente la siguiente escala (Cuadro 2 y Fig. 15):

Cuadro 2.- Escala recomendada para evaluar hongos del suelo.

Valor	Síntoma
0 =	Plántulas no infectadas (0%)
1 =	Plántulas con daño ligero (1-20%)
2 =	Plántulas que muestran un amarillamiento (<21-40%)
3 =	Plántulas que muestran un daño moderado (41-60%)
4 =	Plántulas con amarillamiento severo (61-80%)
5 =	Plántulas completamente marchitas (>81%).

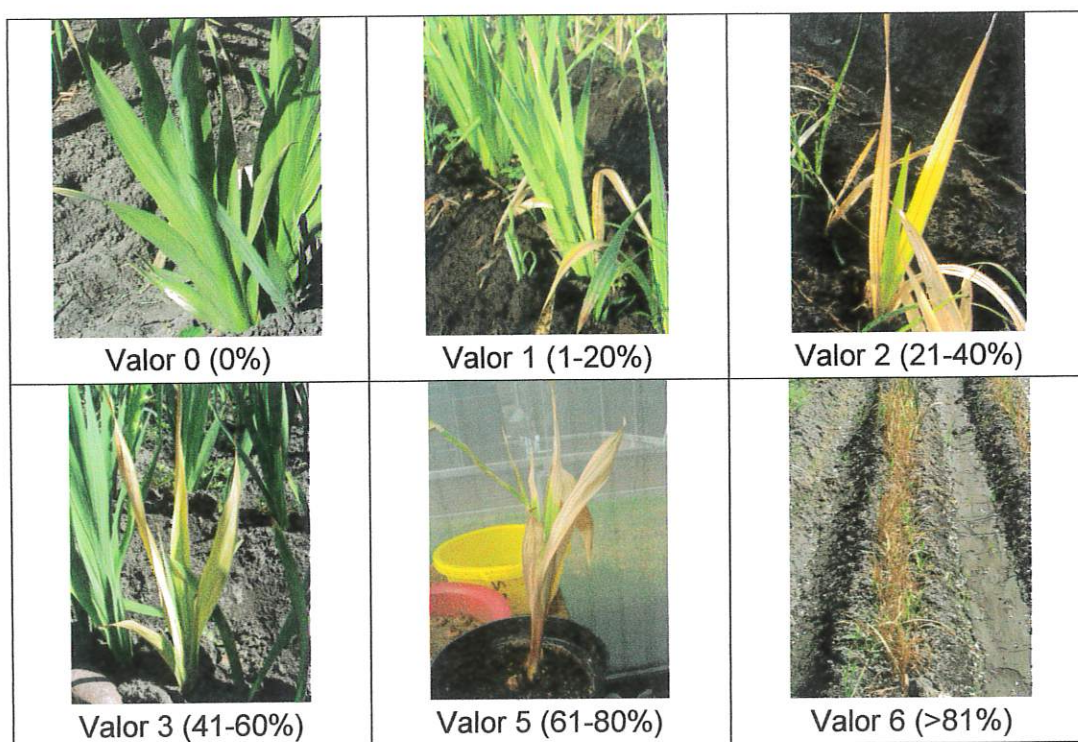


Fig. 15. Grado de severidad en plantas de gladiolo.

Para medir el grado de severidad en cormos de gladiolo infectados se propuso la siguiente escala (Cuadro 3 y Fig. 16):

Cuadro 3.- Escala para evaluar pudriciones de cormo.

Valor	Síntoma
0 =	Cormos no infectados (0%)
1 =	Cormos con daño ligero (1-20%)
2 =	Cormos con daño moderado (21-41%)
3 =	Cormos que muestran daño avanzado (41-60%)
4 =	Cormos con daño severo (>61%).

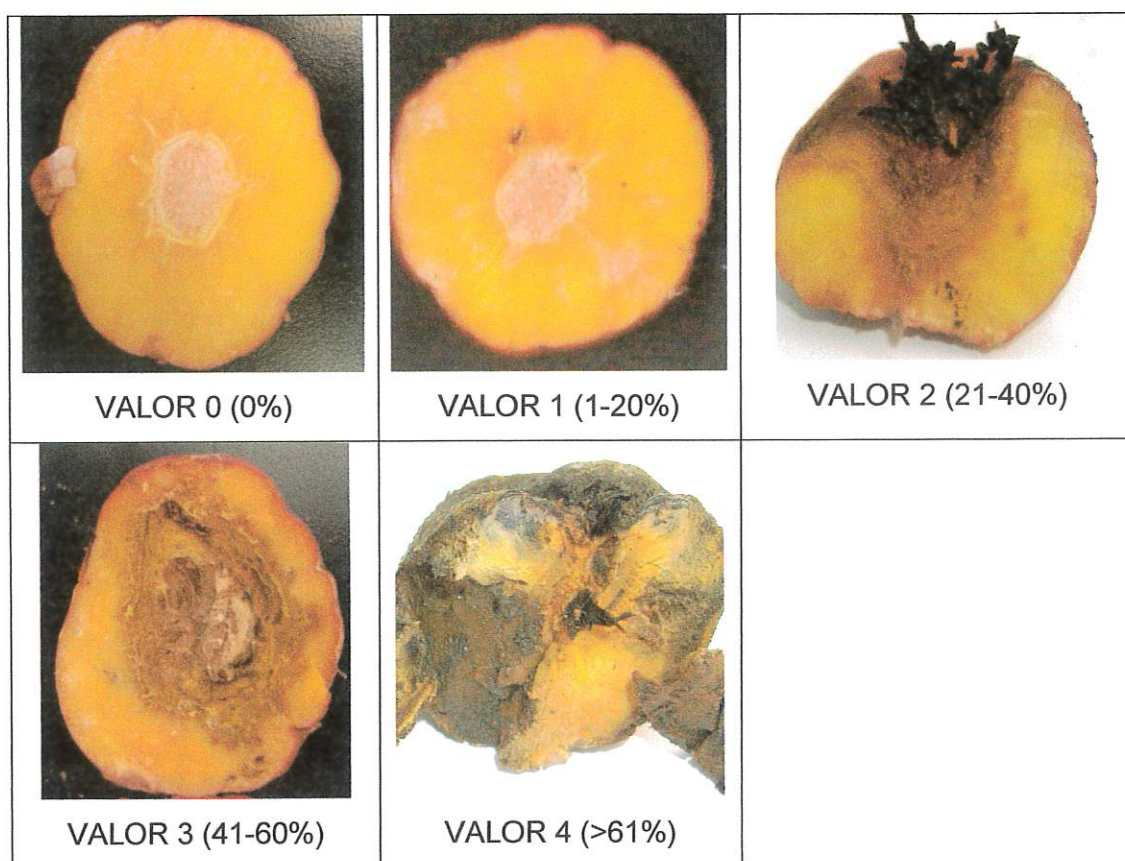


Fig. 16. Grado de severidad en cormos de gladiolo.

4.8.- Modelo Estadístico

El modelo estadístico utilizado para evaluar las diferentes variables de respuesta evaluadas en este estudio, fue el asociado al diseño en completamente al azar, el cual tiene la forma:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij}, \quad \text{con} \quad i = 1, 2, 3 \dots t \quad j = 1, 2, 3 \dots r$$

Donde:

Y_{ij} = Variable respuesta en tratamiento i , repetición j .

μ = Media general.

τ_i = Efecto del tratamiento i .

ε_{ij} = Error aleatorio $\varepsilon_{ij} \sim N(0, \sigma^2)$

4.9.- Análisis estadístico

Los datos obtenidos para la infestación bajo los diferentes tratamientos y bajo las dos condiciones de suelo estéril e inoculado fueron expresados simplemente con valores binarios, 1 y 0 para representar infestación y no infestación, respectivamente. Igualmente la variable severidad fue medida en base a una escala basada en valores enteros multiestado (0, 1, 2, 3, 4) y en porcentaje. Por lo anterior, no se debe realizar un análisis de varianza clásico usando estadística paramétrica, la cual está basada en el modelo lineal general, porque obviamente no se satisface la suposición de normalidad implícita en los residuales. Como se trata de variables categóricas, las alternativas para este tipo de datos son emplear: a). Modelos Categóricos, usando el Procedimiento CATMOD de SAS (SAS versión 9.15, 2008), b).- Regresión Logística (usando el procedimiento LOGISTIC de SAS), y c).- Modelo Lineal Generalizado con función de distribución binomial y función de enlace el Logit (usando el procedimiento GENMOD de SAS) (Márquez, 2004). En este caso se reportan los resultados empleando un modelo para variables categóricas. Para la variable amarillamiento se presentó solo un valor de todas las 200 observaciones, razón por la cual no tiene sentido realizar análisis estadísticos.

Los análisis se realizaron para las dos siguientes alternativas:

1. Análisis individuales para cada condición de suelo y considerando en el modelo solo a los tratamientos.

-
2. Análisis combinados a través de las dos condiciones de suelo y considerando en el modelo a los suelos, los tratamientos y la interacción suelo por tratamiento.
-

V.- RESULTADOS

5.1.- Periodo de incubación, incidencia y severidad

Los primeros síntomas de pudrición de los cormos aparecieron a los 14 días después de que se sembraron. Esto se observó con el tratamiento "siembra de cormos heridos y posteriormente inoculados (I)" y bajo la condición de suelo inoculado, en donde se obtuvo un 10% de incidencia y 80% de severidad (Cuadro 4, Fig. 17).

Cuadro 4.- Periodo de incubación, incidencia y severidad a los 14 días en suelo con inoculo.

Tratamiento	% de incidencia	% de severidad
I	10%	80%

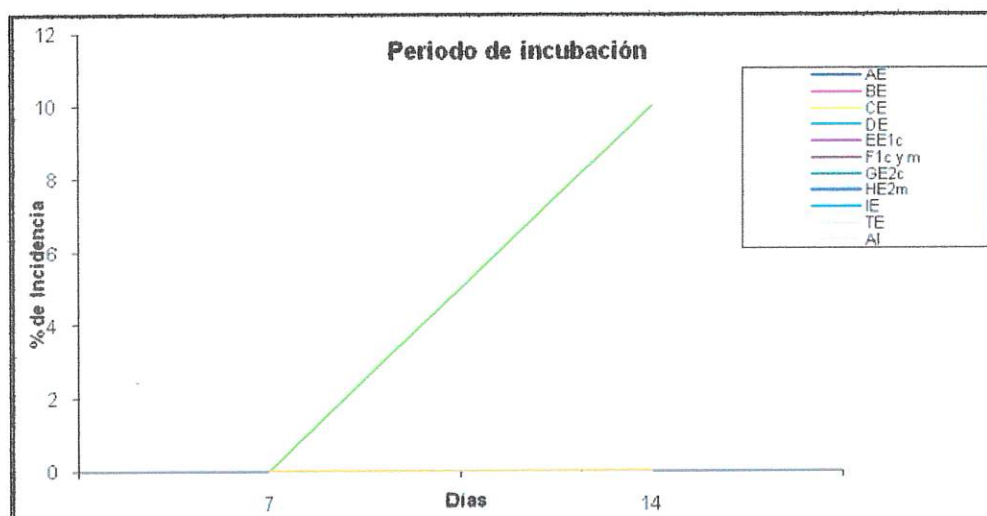


Fig. 17. Incidencia de *F. oxysporum* f. sp. *gladioli* a los 14 días de incubación en suelo con inoculo.

En la tercera semana de incubación (21 días) se incrementó la pudrición en cormos, la incidencia de la enfermedad se dio únicamente en suelo inoculado. Los resultados indican que en el tratamiento "siembra directa de cormos con lesiones (A)" se obtuvo un 20% de incidencia y la severidad fue en un rango de 80-84%. En el tratamiento "siembra directa de cormos sanos dañados con punciones e

inoculados (C)” se obtuvo un 20% y 40% de incidencia y severidad, respectivamente. Mientras que en el tratamiento “siembra de cormos heridos y posteriormente inoculados (I)” la incidencia fue de 30 % y la severidad del 90%. En el testigo se observó un 10% de incidencia y 30% de severidad (Cuadro 5, Fig. 18).

Cuadro 5.- Periodo de incubación, incidencia y severidad a los 21 días en suelo con inoculo.

Tratamiento	% de incidencia	% de severidad
A	20%	80-84%
C	20%	40%
I	30%	30-90%
T	10%	30%

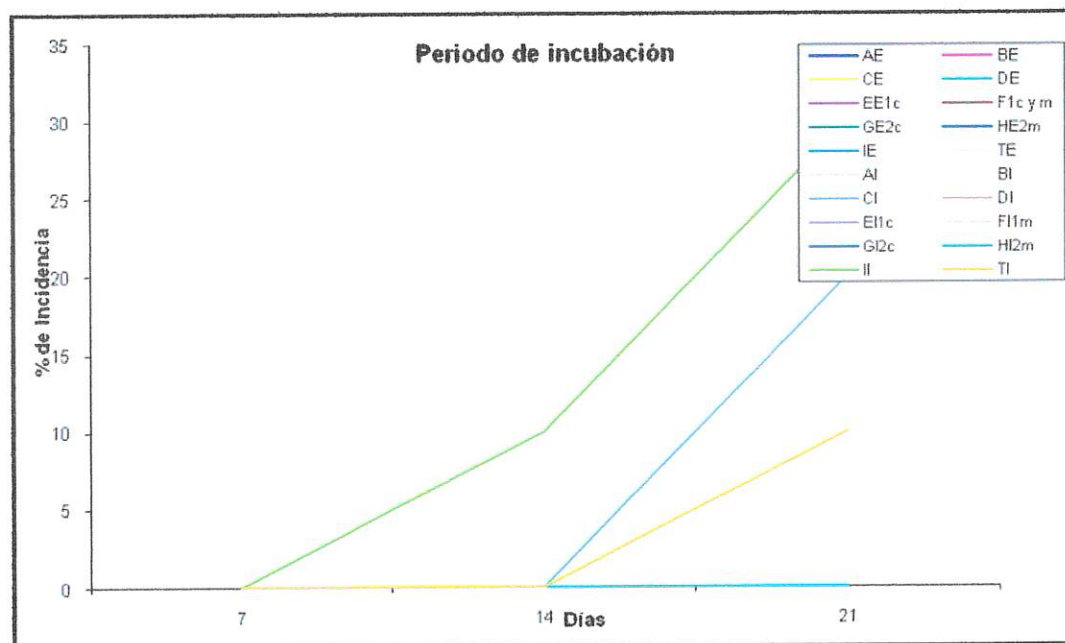


Fig. 18. Incidencia de *F. oxysporum* f. sp. *gladioli* a los 21 días de incubación en suelo con inoculo.

En la cuarta semana de incubación (28 días), en suelo estéril, los resultados mostraron que en el tratamiento “siembra directa de cormos con lesiones (A)” se obtuvo un 50% de incidencia y la severidad estuvo en un rango entre 40-55%, el

tratamiento "siembra directa de cormos sanos dañados con punciones e inoculados (C)" se obtuvo un 30% de incidencia y la severidad fue de 25% a 30%, mientras que en el tratamiento "siembra de cormos heridos y posteriormente inoculados (I)" se obtuvo un 30% de incidencia y la severidad estuvo en un rango del 10 al 40% (Cuadro 6, Fig. 19).

Cuadro 6.- Periodo de incubación, incidencia y severidad de *F. oxysporum* a los 28 días en suelo estéril.

Tratamiento	% de incidencia	% de severidad
A	50%	40-55%
C	30%	25-30%
I	30%	10-40%

Los resultados en suelo con inóculo a la cuarta semana (28 días), mostraron que en el tratamiento "siembra directa de cormos con lesiones (A)" se obtuvo un 60% de incidencia y la severidad fue de 60% a 90%, en el tratamiento "siembra directa de cormos sanos dañados con punciones e inoculados (C)" se obtuvo un 20% de incidencia y la severidad fue de 30 a 40%. El tratamiento "siembra directa de cormos sanos y posteriormente dañados e inoculados (G2c a las 48 horas)" se obtuvo un 10% de incidencia y la severidad fue del 19%, el tratamiento "siembra de cormos heridos y posteriormente inoculados (I)" se obtuvo un 10% de incidencia y la severidad fue del 80%. El testigo en ambos casos tuvo 10% de incidencia y de severidad. En este tratamiento también se observó síntomas de amarillamiento con valor 2 de severidad (Cuadro 7, Fig. 19).

Cuadro 7.- Incidencia de pudrición de cormos en la cuarta semana en suelo con inóculo.

Tratamiento	% de incidencia	% de severidad
A	60%	60-90%
C	20%	30-40%
G 2 c	10%	19%
I	10%	80%
T	10%	10%

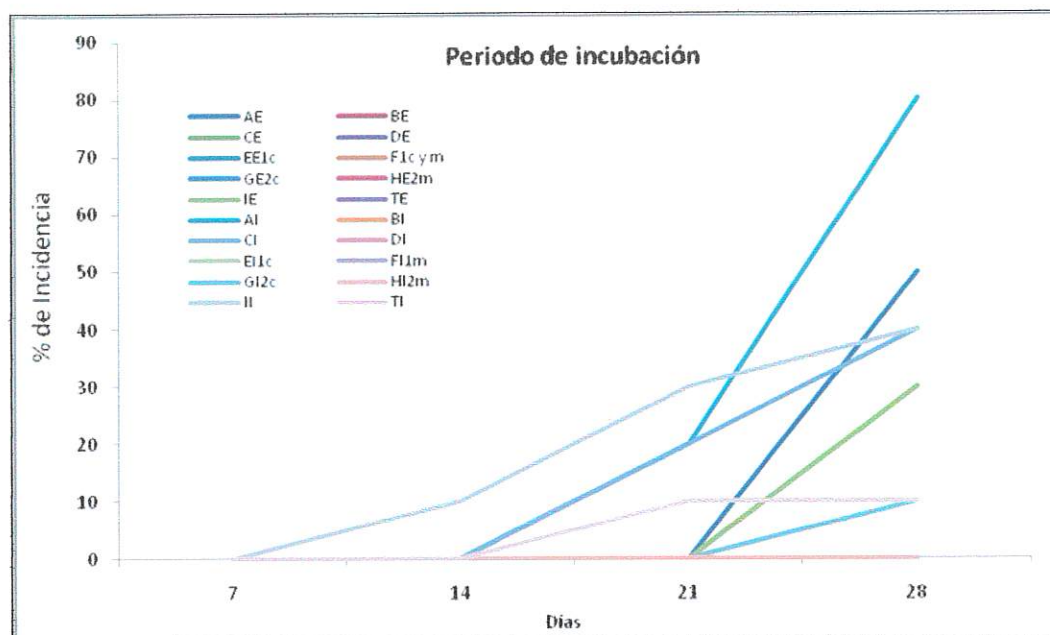


Fig. 19. Incidencia de *F. oxysporum* f. sp. *gladioli* a los 28 días de incubación en suelo estéril y con inoculo.

5.2.- Análisis estadístico

Se realizaron análisis categóricos individuales y combinados, cuyos resultados se presentan en el Cuadro 8: Dichos resultados indicaron que no hubo diferencias significativas en los análisis individuales, mientras que en los análisis combinados, si hubo diferencias significativas, entre suelos, tratamientos, y para la interacción tratamiento por suelo.

Cuadro 8. Análisis de varianza individuales y combinados para cada uno de los suelos, utilizando Modelos Categóricos (CATMOD, SAS) para los términos Suelo, Tratamientos y la Interacción Suelo*Tratamiento.

Análisis	Suelo/Factor	Evaluación 28 días	Escala de severidad	Porcentaje de Severidad
Individual	Estéril	0.3185*	0.6156	0.2172
	Inoculado	0.0174	0.0001	0.0001
	Suelo	0.0002**	0.0001	0.0001
Combinado	Trat	0.0001	0.0001	0.0001
	Trat*suelo	0.0262	0.0001	0.0001

*: Probabilidad de Error Tipo I asociada a la hipótesis nula de igualdad de efectos de los tratamientos,

**: Probabilidad de Error Tipo I asociada a la hipótesis nula de igualdad de efectos para cada factor en estudio.

En el cuadro 8, se mostró que para el análisis individual por suelo, para el caso del suelo estéril no hubo diferencias en ninguna de las variables evaluadas, mientras que en el suelo inoculado si hubo diferencias entre tratamientos para todas las variables. Para investigar cuales tratamientos fueron diferentes se realizó una comparación múltiple de medias utilizando el método de la diferencia mínima significativa (LSD) con alfa igual al 5% (Cuadro 9). En el suelo estéril se muestra que no hubo diferencias entre ninguno de los tratamientos. En el suelo inoculado a los 28 días se encontraron diferencias entre tratamientos, mostrando 3 categorías, la primera de ellas, correspondió únicamente al tratamiento A (siembra directa de cormos con lesiones), indicando que este tratamiento fue diferente de todos los demás (letra A), la segunda categoría correspondió a los tratamientos C (siembra directa de cormos inoculados previamente dañados con punciones) (letra B), quienes fueron iguales entre sí, pero diferentes de los demás tratamientos. Finalmente los restantes tratamientos fueron iguales estadísticamente (letra C).

Cuadro 9. Comparaciones múltiples de medias, método de la diferencia mínima significativa (LSD), alfa al 5%.

Tratamiento	Evaluación 28 días	Evaluación 28 días
	Suelo estéril	Suelo inoculado
A	0.5 A*	0.8 A
C	0.3 A	0.4 B
I	0.3 A	0.5 B
B	0.0 A	0.0 C
D	0.0 A	0.0 C
F1 c y m	0.0 A	0.0 C
G2c	0.0 A	0.0 C
H2 c y m	0.0 A	0.1 C
E1 c	0.0 A	0.0 C
T	0.0 A	0.1 C

*: Medias con la misma letra no son estadísticamente diferentes

En el análisis combinado se muestra que para el factor suelos hubo diferencias entre ellos, por lo que se realizó también de forma complementaria una prueba

de comparaciones múltiples de medias, método de la diferencia mínima significativa (LSD), con alfa al 5%. En los resultados se encontró una severidad e incidencia más alta en el suelo inoculado en comparación con el suelo estéril (Cuadro 10).

Cuadro 10. Comparaciones múltiples de medias, método de la diferencia mínima significativa (LSD) con alfa al 5%.

Suelo	Evaluación 28 días	Escala de severidad	Porcentaje de severidad
Inoculo	0.1919 A*	0.5960 A	11.545 A
Estéril	0.1111 B	0.2323 B	3.889 B

*: Medias con la misma letra no son estadísticamente diferentes

VI.- DISCUSIÓN

Durante el desarrollo de esta investigación, no se encontraron estudios publicados que reporten como objetivo de estudio evaluar metodologías de inoculación de *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli*. Tal vez dándose por hecho la reproducibilidad de los métodos de inoculación reportados en las investigaciones sobre este hongo (Wilfret y Woltz, 1973, Jones y Jenkins, 1974, Magie, 1980b, Barrow-Broadbush y Dwinell, 1980, Rattink, 1986, Roebroek *et al.*, 1990, Roebroek y Mes, 1992, Van Rijbroek *et al.*, 1997, Straathof *et al.*, 1997a, Shakir *et al.*, 1998, Straathof *et al.*, 1998, Haan *et al.*, 2000, Mishra *et al.*, 2000, Ram *et al.*, 2004, Khan y Mustafa, 2005, Sharma y Tripathi, 2008, González, 2009). Se hace notar que los objetivos de las investigaciones previamente reportadas se enfocaron a evaluar aspectos de control del hongo, tales como efectividad biológica de productos biológicos y químicos, así como la búsqueda de variedades resistentes entre otras. Sin embargo, cuando en la presente investigación, estas metodologías se reprodujeron bajo condiciones ambientales reportadas como adecuadas para el desarrollo de *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli* en cormos de gladiolo, no se obtuvieron resultados alentadores, es decir no se lograba la infección.

Cuando se realizan estudios de efectividad biológica tanto de productos biológicos como químicos contra esta enfermedad, la estimación de la incidencia y severidad se muestran muy variables y con pocas coincidencias entre sí. En la revisión de literatura realizada, numerosos autores (Wilfret y Woltz, 1973, Jones y Jenkins, 1974, Magie, 1980b, Barrow-Broadbush y Dwinell, 1980, Rattink, 1986, Roebroek *et al.*, 1990, Roebroek y Mes, 1992, Van Rijbroek *et al.*, 1997, Straathof *et al.*, 1997a, Shakir *et al.*, 1998, Straathof *et al.*, 1998, Haan *et al.*, 2000, Mishra *et al.*, 2000, Ram *et al.*, 2004, Khan y Mustafa, 2005, Sharma y Tripathi, 2008, González, 2009), reportan valores de incidencia en un rango del 1% al 100% y en algunos casos sin llegar a obtener la infección (Haan *et al.*, 2000).

Fusarium oxysporum f. sp. *gladioli* es un microorganismo diverso, cosmopolita y con un amplio rango de hospedantes, se puede aislar de campo en formas especiales patógenas, en formas que son antagónicas de otras que son patogénicas, debido a la gran variabilidad genética existente dentro de este

género (Alexopoulos, 1985). Esta variabilidad ocasiona que la respuesta a los tratamientos aplicados sea muy variada.

En esta investigación, el periodo de incubación coincidió con lo reportado en la literatura por varios autores (Wilfret y Woltz, 1973, Roebroek *et al.*, 1990, Straathof *et al.*, 1998, Sharma y Tripathi, 2008, González, 2009), los cuales mencionan como el periodo de incubación o la aparición de síntomas a partir de la segunda y cuarta semana después de haberse inoculado de manera artificial, en ambos, cormo y suelo.

La incidencia obtenida varió de acuerdo al tratamiento. La incidencia dependerá del hospedero, el patógeno, en este caso *Fusarium*, la cantidad de inóculo presente en el suelo, el tipo de suelo y las condiciones ambientales encontradas al momento que se encuentre el cultivo. Otro factor que contribuye es el manejo que el hombre le da, no solamente al cultivo sino al suelo en donde se llevará a cabo el ciclo del cultivo (Leszczyńska, 1994). En esta investigación, la mayor incidencia se obtuvo con suelo sin esterilizar, el cual fue colectado en la zona cercana a la raíz de plantas de gladiolo, esto pudo deberse a que este tipo de suelo contenía una mayor población o propágulos infectivos de *F. oxysporum* en comparación con el suelo estéril. Bautista (2002), menciona que cuando los cormos se plantan en el suelo infestado con el patógeno, el hongo infecta las raíces y coloniza la zona de elongación en el área de tejido. Otra probable razón para estas diferencias entre el suelo inoculado y estéril es la interacción entre organismos presentes en el suelo, tanto bacterias, nematodos y ácaros, que al convivir de manera natural pueden interactuar con el hospedero (gladiolo), utilizando el curso natural de la infección y los niveles naturales del inóculo en el suelo como lo reportó Hillocks y Waller (1997).

Diferentes autores mencionan que el inóculo puede ser adicionado directamente al sustrato de las macetas, ya sea en pre-siembra o cuando las plantas se encuentran en varias etapas de crecimiento después de ser sembradas, lo cual para el caso de *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli* no fue del todo repetible ya que en esta investigación la infección no se llevó a cabo bajo estos tratamientos.

En esta investigación, el tratamiento que consistió en “siembra directa de cormos con lesiones visibles (A)” encontramos que desde los 21 días en suelo inoculado, hubo un alto grado de incidencia y severidad de aproximadamente 80% y 90%, respectivamente, mientras que en suelo estéril fue de 50% aproximadamente. Coincidiendo con nuestros resultados, Rattink (1986), mostró que después de la inoculación en *Fressia* con diferentes aislamientos de *F. oxysporum* f. sp. *gladioli* hubo una incidencia de síntomas en plantas, indicando la transmisión de *F. oxysporum* f. sp. *gladioli* del suelo a los cormos sanos, sin embargo, en ese mismo estudio, plantas de *Fressia* no inoculadas mostraron un índice de pudrición, 48% de incidencia, lo que indicó infecciones latentes en la superficie de los cormos de *Fressia*. Magie, (1980a), y Roebroek *et al.* (1990), indicaron que la incidencia de la enfermedad se dio de manera natural por infecciones latentes en los cormos.

Al realizar heridas en la raíz y sumergir los cormos en la solución de esporas (10^6) no se garantizó la infección de este patógeno, aun cuando la cantidad de inóculo fue la misma reportada por otros autores (Barrow-Broadbent y Dwinell, 1980, Roebroek y Mes, 1992, Sharma y Tripathi, 2008, González, 2009).

En este estudio, el hongo se aisló de plantas jóvenes o en sus primeras etapas de crecimiento, lo que nos hace suponer que al inocularlo de manera artificial en cormos de gladiolo, la manifestación de síntomas ocurriría en la misma etapa fenológica de las plantas de que fue aislada. Mishra *et al.* (2000), menciona que evaluó la incidencia y la severidad de *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli* en granos de sorgo a los 60 días después de la inoculación, ya que el inóculo aplicado se aisló igualmente después de 60 días. Tal vez sea importante considerar la etapa fenológica de la planta en la que se aísla el inóculo para evaluar en un futuro el éxito de la infección.

VII.- CONCLUSIONES

- ✓ El periodo de incubación de *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli* se manifestó en los cormos de gladiolo a los 14 días después de la inoculación, únicamente en suelo con inóculo del hongo.
- ✓ El periodo de incubación dependió del tratamiento aplicado.
- ✓ La manifestación de la enfermedad fue mayor en suelo inoculado que en suelo estéril.
- ✓ En el tratamiento "siembra directa de cormos con lesiones", se logró la mayor severidad e incidencia.

VIII.- PERSPECTIVAS

En futuras investigaciones se propone:

- ✓ Probar estas metodologías con otras variedades de gladiolo, ya que en este estudio únicamente se utilizó la variedad "Roja borrega".
- ✓ Evaluar diferentes aislamientos colectados de diversas zonas productoras de gladiolo para observar su capacidad infectiva bajo los diferentes métodos de inoculación aquí probados.

IX. - LITERATURA CITADA

- Abadie C., Edel V., Alabouvette C. 1998. Soil suppressiveness to *Fusarium* wilt: influence of a cover-plant on density and diversity of *Fusarium* populations. *Soil Biology and Biochemistry* 30 (5): 643-649.
- Agrios, N. G. 1997. *Plant Pathology*. Fourth Edition. Elsevier Academic Press. 635 p.
- Agrios, N. G. 2005. *Plant Pathology*. Fifth Edition. Elsevier Academic Press. 522 p.
- Alexopoulos, C.J., Mims, C. W. 1985. *Introducción a la micología*. Barcelona España: Ediciones Omega. Segunda traducción al español. 638 p.
- Anónimo. 1983. *Gladiolus* corm rot. Report on plant disease. University of Illinois. RPD No. 651: 1-6.
- Anónimo. 1988. *Fusarium* wilt diseases of herbaceous ornamentals. University of Illinois. RPD No. 650: 1-9.
- Baayen P.R. 2000. Diagnosis and detection of host-specific forms of *Fusarium oxysporum*. *Bulletin OEPP/EPPO* 30: 489-491.
- Bald G.J. Ferguson J. Markley B.B. 1956. Treatment of gladiolus cormels hot water bath treatment of planting stock shows promise as means of controlling serious corm-borne fungus diseases. *California Agriculture* 6 (10): 15-16.
- Barnett L.H., Hunter B.B. 1998. *Illustrated genera of imperfect fungi*. The American Phytopathological Society; 4th edition. U.S.A. 240 p.
- Barrera-Necha L.L., Garduño P.C., García Barrera L.J. 2009. *In vitro* Antifungal activity of essential oils and their compounds on mycelial growth of *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli* (Massey) Snyder and Hansen. *Plant Pathology Journal* 8 (1): 17-21.
- Barrows-Broad J., Dwinell D.L. 1980. Decay and colonization of *Gladiolus* corms by the pine pitch canker fungus. Etiology. *American Phytopathological Society* 70 (9): 847-850.
- Bautista M. N. 2002. *Manejo fitosanitario de ornamentales*. Instituto de Fitosanidad. Colegio de Postgraduados, México. 237 p.
- Beckman H.C., Roberts M.E. 1995. On the nature and genetic basis for resistance and tolerance to fungal wilt diseases of plants. *Advances in Botanical Research* 21: 35-77.

-
- Bigre P.J., Morand J.C., Tharaud M. 1990. Patología de los cultivos florales y ornamentales. Ed. Mundi-Prensa, Madrid España. 233 p.
 - Booth, C. 1971. The genus *Fusarium*. CAB-Commonwealth Mycological Institute. England. 237 p.
 - Buschman C.J., M. 2005. Globalisation-Flower-Flower-Bulbs-Bulb Flowers. In IXth International Symposium on Flower Bulbs. Acta Horticulturae 673: 27-33.
 - Buxton, W.E., Robertson, F.N. 1953. The *Fusarium* yellows disease of gladiolus. Plant Pathology 2 (2): 61-64.
 - Campbell T. B. and Bower J.P. 2003. *Gladiolus scabridus*-the Road to Conservation and Commercialization. In International Horticultural Congress: Elegant Science in Floriculture. Acta Horticulturae 624:67-72.
 - CESVMOR. 2009a. Guía fitosanitaria del cultivo del gladiolo. Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Morelos, México. 26 p.
 - CESVMOR. 2009b. Evaluación de un insecticida orgánico para el control de mosquita blanca (*Trialeurodes vaporariorum*) en el cultivo de gladiolo en Cuautla Morelos. Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Morelos. Monitor Agrícola 3 (6):10-12.
 - Chung, W.H. Chung, C.C., Ting, P.F., Changchien, C.R., Huang, H.C., Huang, J.W. 2009. Nature of resistance to methyl benzimidazole carbamate fungicides in *Fusarium oxysporum* f. sp. *lilii* and *F. oxysporum* f. sp. *gladioli* in Taiwán. The Fungicide Resistance of *Fusarium* spp. in *Lily* and *Gladiolus*. Biotechnology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Wufeng, Taichung, Taiwan. Journal of Phytopathology 157 (11-12): 742-747.
 - Ciotola M. Di Tommaso A. Watson A.K. 2000. Chlamydospore production, inoculation methods and pathogenicity of *Fusarium oxysporum* M12-4A, a biocontrol for *Striga hermonthica*. Biocontrol Science and Technology 10 (2): 129-145.
 - Deacon J.W. 2006. Fungal biology. 4th edition. Institute of cell and molecular biology. University of Edinburg, UK. Ed. Madison Blackwell Publishing Ltd. 371p.
 - Domsch H.K., Gams W., Anderson T.H. 1980. Compendium of soil fungi. Ed. London Academic Press. 859 p.
-

-
- Espinosa F.A., Manzo G.A., Mejía M. J., Rodríguez E. M.A., Colinas L. M.T. 2008. El cultivo de las gladiolas. Extensión al campo. Universidad Autónoma Chapingo. 2 (9): 27-29.
 - Forsyth M.L., Smith J.L., Aitken B.A.E. 2006. Identification and characterization of non-pathogenic *Fusarium oxysporum* capable of increasing and decreasing *Fusarium* wilt severity. *Mycological Research* 110 (8): 929-935.
 - Fox V.T.R. 1997. *Gladiolus* dry rot. Fungal foes in your garden. *Mycologist* 11 (1): p. 40.
 - Fravel D., Olivain C., Alabouvette C. 2003. *Fusarium oxysporum* and its biocontrol. *New Phytologist* 157 (3): 493-502.
 - Gómez B., J. G. 2009. El gladiolo para bulbo o flor cortada. Flores y follajes ornamentales 3 (21): 32-36.
 - González P.E., Yañez M.M.J., Ortega E.H.M. 2009. Comparative analysis among Pathogenic fungal species that cause gladiolus (*Gladiolus grandiflorus* Hort.) corm rot in Mexico. *In* Revista Mexicana de fitopatología 27 (1):45-52.
 - Groenewald S. 2005. Biology, pathogenicity and diversity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. Tesis de Maestría de la Universidad de Pretoria, Sudáfrica. 156 p.
 - Hann M.A.L., Numansen A., Roebroek A.J.E., Van Doorn J. 2000. PCR detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli* race 1, causal agent of *Gladiolus* yellows disease, from infected corms. *Plant Pathology* 49 (1): 89-100.
 - Herrera T., Ulloa M. 1998. El reino de los hongos: Micología básica y aplicada. 2a Edición. Ed. UNAM, México. 552 p.
 - Hillocks, R.J. and Waller J.M. 1997. Soilborne diseases of tropical crops. Wallingford, U.K.CAB International. 452 p.
 - Jones K.R. Jenkins M.J. 1974. Evaluation of resistance in *Gladiolus* sp. to *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli*. *Phytopathology* 65: 481-484.
 - Kamenesky R., 2005. Production of Flower Bulbs in Regions with Warm Climates. IXth Intl. Symp. on Flower Bulbs. *Acta Hort.* 673: 59-66.
 - Khalil G.A., Centina A.V.M., Ferrara C.R., Velásquez M.J., Pérez M.C.A. Larqué S.M. 2001. Hongos micorrizicos arbusculares como componente de

-
- control biológico de la pudrición causada por *Fusarium* sp. en gladiola. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. In Terra Latinoamericana 19 (3):259-264.
- Khan R.M., Mustafa U. 2005. Corm rot and yellows of gladiolus and its biomanagement. *Phytopathologia Mediterranea* 44 (2): 208-215.
 - Leszczyńska B.H. Michal W.B. 1994. Gladiola. Editorial EDAMEX. 166p.
 - Leyva M. S.G. 1992. Enfermedades del gladiolo. In Memoria del curso de acreditación técnica en el manejo y certificación fitosanitaria de ornamentales. Chapingo, México. pp: 61-73.
 - Linde M., Yan Z., Debener T. 2007. Ornamentals, Chapter 3.. Ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Technical Crops. Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants 6: 77-92.
 - Loeffler M.J.H., Mouris R.J., van Harmelen J.M., van Tuyl M.J. 2000. Transformation of gladioli for *Fusarium* resistance. In Proceedings 19th International Symposium Improvement Ornamental Plants. *Acta Horticulturae* 508: 313-314.
 - Lorbeer W.J., Seyb M.A., de Boer M., van den Ende E.J., 2007. *Botrytis* species on bulb crops. Chapter 15. *Botrytis: Biology, Pathology and Control* Ed. Springer Netherlands. pp: 273-294.
 - Lucas J.A. 1998. Plant pathology and plant pathogens 3rd Ed. Blackwell science. 274 p.
 - Magie R.O. 1980a. *Fusarium* disease of gladioli controlled by inoculation of corms with non-pathogenic Fusaria. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society* 93: 172-175.
 - Magie R.O. 1980b. Biological control of *Fusarium* disease of *Gladiolus*. In III International Symposium on Flower bulbs. *Acta Horticulturae* 109: 415-420.
 - Marquez C.L.E. 2004. Introducción al SAS para windows. Segunda edición. Universidad Autónoma Chapingo. Parasitología Agrícola. 240 p.
 - Massey L.M. 1926. *Fusarium* rot of gladiolus corms. *Phytopathology* 16: 509-523.
 - McCulloch L. 1944. A vascular disease of *Gladiolus* caused by *Fusarium*. *Phytopathology* 34: 263-287.

-
- Mendoza Z.C. 1997. Certificación de estudios de efectividad biológica de plaguicidas. Universidad Autónoma Chapingo. Departamento de Parasitología Agrícola. 279 p.
 - Mengden K., Hahn M., Deising H. 1996. Morphogenesis and mechanisms of penetration by plant pathogenic fungi. Annual Review of Phytopathology 34: 367-386.
 - Mishra K.P., Mukhopadhyay N.A., Fox V. R.T. 2000. Integrated and biological control of gladiolus corm root and wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli*. Annals of Applied Biology 137 (3): 361-364.
 - Murguía G. J., Lee E.H., Landero T.I. 2007. La horticultura ornamental en el estado de Veracruz, México. In XI Congreso SECH. Albacete . Sociedad Española de Ciencias Hortícolas. Actas de Horticultura 48: 485-488.
 - Nasir A.I., Riazuddin S. 2008a. *In vitro* Selection for Fusarium wilt resistance in gladiolus. Journal of Integrative Plant Biology 50 (5): 601-612.
 - Nasir A.I., Riazuddin S. 2008b. New approaches to generate disease-resistant gladiolus. World Journal Microbiology Biotechnology 24 (3): 367-373.
 - Orozco H., M.E. 2007. Between local and global competitiveness: commercial floriculture in the State of México. Convergencia. Revista de Ciencias Sociales UAEMéx 45: 100-150.
 - Paulus O.A., Besemer S. Shibuya F., Nelson J. 1971. Systemic fungicides for control of fusarium corm rot of gladiolus. California Agriculture 25 (1): 14-15.
 - Peterson L.G., Berner K.D. 2009. Effects of temperature and humidity on the survival of uredinospores of gladiolus rust (*Uromyces transversalis*). European Journal of Plant Pathology 125 (3): 509-513.
 - Powell C.C. 1994. El manejo integrado de los insectos, ácaros, y enfermedades en los cultivos ornamentales. Batavia, Ill.: Ball. 118p.
 - Ram R., Manuja S., Dhyani D., Mukherjee D. 2004. Evaluations of fortified solutions in managing corm rot disease of gladiolus caused by *Fusarium oxysporum*. Crop Protection 23 (9): 783-788.
 - Ramos G.M., Ortega C.S., Hernández L.A.N., Alía T.I. Bosques M.E., Baños B.S. 2009. Response of gladiolus (*Gladiolus* spp) plants after exposure

-
- corms to chitosan and hot water treatments. *Scientia Horticulturae* 121 (4): 480–484.
- Rattink H. 1986. Some aspects of the epidemiology of *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli* on *Freesia*. In IV International Symposium on Flower Bulbs . *Acta horticulturae* 177: 85-91.
 - Rees A.R.1992. Ornamental bulbs, corms and tubers. Wallingford, UK,: CAB International. 220 p.
 - Riaz T., Nawaz K.S., Javaid A. 2008. Antifungal activity of plant extracts against *Fusarium oxysporum*- the cause of corm-rot disease of *Gladiolus*. *Mycopath* 6 (1&2): 13-15.
 - Riaz T., Nawaz K.S., Javaid A. 2009a. Management of corm-rot disease of *Gladiolus* by plant extracts. Ed. Taylor & Francis Natural product research part A. pp: 1-8.
 - Riaz T., Nawaz K.S., Javaid A. 2009b. Effect of co-cultivation and crop rotation on corm rot disease of gladiolus. *Scientia Horticulturae* 121 (2): 218-222.
 - Roebroeck, A J.E., Groen, A.P.N, Mes, J.J. 1990. Detection of latent *Fusarium oxysporum* in *Gladiolus* corms. In V International Symposium on Flower Bulbs. *Acta Horticulturae* 266:469-476.
 - Roebroeck, A J.E. Mes J.J. 1992. Biological control of *Fusarium* in gladiolus with non-pathogenic *Fusarium* isolates. In VI International Symposium on Flower Bulbs. *Acta Horticulturae* 325: 769-779.
 - Romero, C.S. 1988. Hongos Fitopatógenos. Universidad Autónoma Chapingo. Dirección Patronato Universitario. Chapingo, Méx. 347 p.
 - Roncero G.M.I., Hera C., Ruiz R.M., Garcia M.F.I., Madrid P.M., Caracuel Z., Calero F., Delgado J. J., Roldán R.R., Martínez R., A.L., Velasco C., Roa J., Martin U.M., Córdoba D., di Pietro A. 2003. *Fusarium* as a model for studying virulence in soilborne plant pathogens. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 62 (2): 87-98.
 - SAS Institute Inc. 2008. SAS/STAT user's guide. North Carolina, U.S.A.
 - Shakir S.A., Haq E., Ayub M. 1998. Studies on pathogenecity and eradication of some fungal diseases of gladiolus in Pakistan. *Pakistan Journal of biological sciences* 1 (1): 23-26.
-

-
- Sharma N., Tripathi. 2008. Integrated management of postharvest *Fusarium* rot of gladiolus corms using hot water, UV-C and *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. essential oil. *Postharvest Biology and Technology* 47 (2): 246–254
 - Shivas R.G., Beasley D. 2005. Management of plant pathogen collections. Canberra: Department of Agriculture, Fisheries and Forestry. Australian Government. 82 p.
 - SIAP. 2010. Producción agrícola cíclicos y perennes 2008. Sistema de Información Agropecuaria de consulta. Anuario Estadístico de producción agrícola, disponible en: <http://www.siap.gob.mx> consultada el 14 de Enero de 2010.
 - Sivan A. Chet I. 1989. Cell wall composition of *Fusarium oxysporum*. Short communication. *Soil Biology & Biochemistry* 21 (6): 869-871.
 - Smiley, W.R., Dernoeden, H.P., Clarke, B.B. 1992. Compendium of Turfgrass diseases. 2nd edition. APS Press. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, U.S.A. 98 p.
 - Šmit K.Z., Ševar J.M. 1986. *Gladiolus* rot control experience. In IV International Symposium on Flower Bulbs. *Acta Horticulturae* 177: 503-508.
 - Stevens, S. 1993. Commercial specialty cut flower production: *Gladiolus*. Kansas State University. Kansas State Cooperative Extension MF-1080: 1-8.
 - Straathof P.T., Jansen J., Roebroek A.J.E., Loeffler M.J.H. 1997a. *Fusarium* resistance in *Gladiolus*: Selection in seedling populations. *Plant breeding* 116 (3): 283-286.
 - Straathof P.T., Loeffler M.J.H., Linfield A.C., Roebroek A.J.E. 1997b. Breeding for resistance to *Fusarium oxysporum* in flower bulbs. In VII International Symposium on Flowerbulbs. *Acta Horticulturae* 430: 477-486.
 - Straathof P.T., Roebroek A.J.E., Loeffler M.J.H. 1998. Studies on *Fusarium-Gladiolus* interactions. *Journal of Phytopathology* 146 (2-3): 83-88.
 - Tlahuextl, T., C. Ávila S., J.M., Leszczyńska B., H. 2005. Flores de corte y follaje en florerías y mercados de Puebla, México. Universidad Autónoma Chapingo, Chapingo México. *Revista Chapingo. Serie Horticultura* 11 (2): 323-327.
 - Tripathi A., Sharma N. Sharma V. 2009. *In vitro* efficacy of *Hyptis suaveolens* L. (Poit.) essential oil on growth and morphogenesis of *Fusarium*

-
- oxysporum* f. sp. *gladioli* (Massey) Snyder & Hansen. World Journal Microbiology and Biotechnology 25 (3): 503-512.
- Unterstenhofer G. 1976. The basic principles of crop protection field trials. *In* Pflanzenschutz-Nachrichten. Bayer Germany 29(2):83-180.
 - Van Rijbroek L.C.P., Loeffler M.J.H., Van Eeuwijk A.F., Straathof P.T. 1997. *Fusarium* resistance in *Gladiolus*: effects of plant material testing conditions on the infection of cultivars. *In* VII International Symposium on Flowerbulbs. Acta Horticulturae 430: 711-718.
 - Vannacci G., Gullino L.M. 2000. Use of biocontrol agents against soil-borne pathogens: results and limitations. *In* International Symposium on Chemical and Non-Chemical Soil and Substrate Disinfection. Acta Horticulturae 532: 79-88.
 - Wilfret G.J., Woltz S.S. 1973. Susceptibility of corms of gladiolus cultivars to *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli* Snyder & Hans. at different temperatures. Proceedings of the Florida State Horticultural Society 86: 376-378.
 - Woltz S.S., Magie R.O., Switkin C., Nelson P.E., Toussoun A. 1978. Gladiolus disease responses to prestorage corm inoculation with *Fusarium* species. Plant Disease report 62:134-137.