

PATOGENICIDAD DE *FUSARIUM SOLANI* (MART.) SACC. Y *ALTERNARIA ALTERNATA* (FRIES) KEISSLER EN *THEVETIA PERUVIANA* (PERS.) K. SCHUM. Y SU CONTROL *IN VITRO*

Elizabeth Herrera Parra,² Imelda Maricela Bacab Pérez,¹ Jairo Cristóbal Alejo,¹ José María Tun Suárez¹ y Esaú Ruíz Sánchez¹

¹ Instituto Tecnológico de Conkal Antigua Carretera Mérida-Motul Km 16.3, Conkal, Yucatán, México, C. P. 97345, jairoca54@hotmail.com

² Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), Campo Experimental Mocochoá. Antigua Carretera Mérida-Motul Km 25, Mocochoá, Yucatán, México, C. P. 97454

RESUMEN

Se diagnosticaron los agentes causales de alteraciones de origen fúngico provenientes de plántulas y hojas de *Thevetia peruviana* (Pers.) K. Schum. Con los fitopatógenos aislados se realizaron pruebas de patogenicidad y de sensibilidad *in vitro* con los fungicidas químicos fosetyl Al, azoxystrobin, imazalil, procloraz, benomilo y tiabendazol. Se observó la presencia de *Fusarium solani* en plántulas que indujo necrosis en la base del tallo y cotiledones. Las plantas inoculadas presentaron síntomas a los ocho días y al reaislarlos se confirmó al mismo patógeno. Los fungicidas evaluados para este hongo presentaron el 100% de efectividad. En hojas se identificó a *Alternaria alternata* como el patógeno que induce manchas foliares. Al realizar las pruebas de patogenicidad los síntomas se presentaron a los dos días posteriores a la inoculación. Los fungicidas imazalil y procloraz fueron los únicos que demostraron el 100% de efectividad para el control de este hongo.

Palabras claves: fungicidas, *Thevetia peruviana*, hongos fitopatógenos

ABSTRACT

Causal agents of fungal diseases were identified in plants and leaves of *Thevetia peruviana* (Pers.) K. Schum. (Lucky nut) The fungi isolated were used for pathogenicity tests and for *in vitro* sensibility tests to the chemical fungicides fosetyl-Al, azoxystrobin, imazalil, procloraz, benomil and tiabendazole. The presence of *Fusarium solani* causing necrosis in the hypocotyl and cotyledons of seedlings was observed. Seedlings inoculated with pathogen showed symptoms eight days after inoculation, pathogen was isolated then and its identity was confirmed. All chemical fungicides were 100% effective to control it. Another fungus, *Alternaria alternata* was identified in foliar spots. The pathogenicity test showed that symptoms were visible two days after inoculation. Fungicides imazalil and procloraz showed 100% effectiveness to control this fungus.

Keywords: fungicides, *Thevetia peruviana*, pathogenic fungi

INTRODUCCIÓN

La campanilla de oro o cabalonga (*Thevetia peruviana* Persoon K. Schum) es una planta perteneciente a la familia Apocynaceae, originaria del centro y sur de América. Se encuentra distribuida desde México a Perú; sin embargo, se considera una especie nativa de estos países. Es un árbol o arbusto pequeño de 2-6 m de altura, con látex blanco en todas las partes de la planta. Las hojas son de color verde, más oscuras en su cara superior, lineares lanceoladas [Stevens *et al.*, 2001]. Las

inflorescencias presentan pocas flores de coloración amarilla o anaranjada en forma de campana [Alvarado y Ochoterena, 2007]. Los frutos son transversalmente oblongos, generalmente más o menos obtriangulares, verdosos, amarillentos o purpúreos [Stevens *et al.*, 2001]. En su interior se encuentra una nuez o almendra conocida localmente en algunas regiones como *codo de fraile*, triangular o con forma de almeja, y que contiene en su interior de dos a cuatro semillas [Torres, 2003].

Recibido: 2/10/2011

Aceptado: 7/11/2011

Se utiliza con fines ornamentales, aunque también se le atribuye usos medicinales con propiedades antibacterianas [Aular de González *et al.*, 2003; Torres, 2003; Ravikumar *et al.*, 2007] y con efecto fungicida [Ambang *et al.*, 2010]; sin embargo, su principal importancia radica en las propiedades del aceite que se obtiene de sus semillas, el cual se utiliza como lubricante, y recientemente como materia prima para la generación de biodiesel [Oluwaniyi e Ibiyemi, 2003; Díaz *et al.*, 2010]. Esta propiedad le confiere alta importancia como alternativa al uso de combustibles fósiles, ya que estos generan altos índices de contaminación de aire, agua, suelo y enfermedades respiratorias causadas por la emisión de CO₂ [Demirbas, 2008].

Debido al potencial que tiene esta especie, se han iniciado estudios para su propagación; pero durante las colectas y su multiplicación en vivero se han observado alteraciones y muerte de plántulas y hojas hasta del 20 %, atribuible a hongos fitopatógenos que representan un factor limitativo para su posterior establecimiento en parcelas experimentales o comerciales. Como en México no existen reportes sobre la presencia de fitoparásitos en esta especie, se hace imperante describir el síndrome y agentes causales para establecer tácticas de prevención y de control.

El objetivo del presente estudio consistió en identificar y determinar la patogenicidad de los hongos aislados en *Thevetia peruviana* y evaluar fungicidas químicos comerciales *in vitro* para su control.

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se realizó a partir de colectas de material vegetal provenientes del vivero del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Campo Experimental Mochochá y en municipios del estado de Yucatán, México. Las colectas consistieron en plántulas con síntomas de necrosis en tallo, así como en cotiledones y hojas con presencia de manchas. Para el aislamiento de los patógenos se realizaron cortes de 0,5 cm² del tejido infectado que incluyó parte enferma y sana, se desinfectaron con hipoclorito de sodio comercial al 2 % durante un minuto y se enjuagaron dos veces con agua destilada estéril; luego se colocaron en papel absorbente estéril para eliminar residuos de humedad de las muestras; posteriormente en la campana de flujo laminar se sembraron en medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA) cinco cortes por cada placa Petri y se incubaron en la estufa de crecimiento microbiano a

una temperatura de 28 ± 1°C hasta observar crecimiento micelial del hongo. Para la purificación se reaisló al patógeno a partir de una porción de micelio que se tomó con una aguja de disección estéril y se colocó en el centro de placas Petri con medio de cultivo PDA. Para el caso del hongo aislado de hojas y favorecer su esporulación, se reaisló en los medios agar-jugo de verduras y agar-papa-tomate-zanahoria [Tutte, 1998], ya que al reaislarlo en medio PDA se limitó solo a un crecimiento micelial.

La identificación de los hongos a nivel de género se realizó mediante taxonomía tradicional [Barnett y Hunter, 1999]. La identificación de la especie se hizo mediante características morfotaxonomías. Para verificar que los hongos aislados e identificados eran los responsables inductores de los síntomas en las plantas enfermas, se realizaron pruebas de patogenicidad.

Para el caso del hongo aislado de plántulas se seleccionaron 20 plantas aparentemente sanas de cuatro meses de edad; 10 plantas se inocularon a través de una incisión en la base del tallo con un bisturí estéril, luego se colocó sobre esta área un disco del medio PDA de 5 mm de diámetro con micelio del hongo. Posteriormente se cubrió con papel absorbente estéril húmedo, el cual se humedeció constantemente con agua destilada estéril. Cada segundo día se monitoreó la aparición de síntomas. Como testigo se utilizaron 10 plantas, en las que se realizaron incisiones en la base del tallo y se colocaron discos del medio PDA estéril sin el hongo.

Para el hongo aislado de manchas foliares se seleccionaron y colectaron 30 hojas aparentemente sanas de plantas de vivero de cuatro meses de edad, se limpiaron con papel absorbente húmedo con agua destilada estéril y se desinfectaron superficialmente con hipoclorito de sodio comercial al 1 %. Posteriormente se limpiaron de nuevo con agua destilada estéril, y por último se introdujeron en placas Petri de 15 cm de diámetro que contenían papel absorbente húmedo estéril. Para esta prueba se inocularon 15 hojas en las que se depositó un disco de micelio del hongo cultivado en medio agar-jugo de verduras. Para los testigos se colocó medio agar-jugo de verduras estéril sin el hongo. Las placas se sellaron y se dejaron a temperatura ambiente. Diariamente se verificó la aparición de síntomas.

Para determinar la efectividad *in vitro* de los fungicidas químicos se adicionaron los productos a los medios de cultivo. Para el hongo aislado en plántulas se utilizó medio de cultivo PDA, y para el patógeno de hojas agar-

jugo de verduras, ya que en estos medios de cultivo se observaron los mejores crecimientos y la mayor formación de esporas de los hongos en estudio, respectivamente.

Los medios de cultivo PDA y agar-jugo de verduras V-8 se prepararon en matraces con capacidad de 100 mL y se esterilizaron en una olla de presión a 1 atm por 15 min. Luego en la campana de flujo laminar se agregaron las dosis de fungicidas a los medios (1 g o mL/L), se agitaron con el propósito de homogenizar los fungicidas en el medio de cultivo y se dosificaron en placas Petri estériles de 8,5 cm de diámetro. Las placas se mantuvieron en observación durante 24 h para asegurarse que no estuvieran contaminadas [Nieto *et al.*, 2001; Herrera, 2004].

Para la siembra de los hongos se hicieron discos de aproximadamente 9 mm de diámetro del micelio de cada cultivo puro y se colocaron en el centro de las placas Petri provistas del medio de cultivo, adicionadas con los fungicidas a prueba; se sellaron y se incubaron en estufa de crecimiento microbiano a una temperatura de $28 \pm 1^\circ\text{C}$.

En la *Tabla 1* se presentan los tratamientos evaluados *in vitro*, equivalentes a las dosis aplicadas en campo para el control de hongos causantes de ahogamientos, pudriciones radicales y manchas foliares según la alteración. El propósito de evaluar estas dosis *in vitro* se debió al señalamiento de baja efectividad de los fungicidas empleados para el control de agentes inductores de estos síntomas.

Tabla 1. Tratamientos de fungicidas químicos comerciales para el control *in vitro* de hongos en *Thevetia peruviana*

Ingrediente activo	Dosis (p.p.m.)
Fosetyl aluminio	800
Azoxystrobin	500
Imazalil	750
Procloraz	450
Benomilo	500
Thiabendazol	600
Testigo (sin fungicida)	0

La variable de crecimiento micelial se determinó con la ayuda de una regla graduada en centímetros. Se midió el diámetro del micelio del hongo de manera longitudinal cada 24 h hasta que el testigo sin fungicida cubrió por completo la placa Petri. La efectividad de cada fungicida se estimó con la fórmula de Abbott (1925):

$$E = (\text{Test} - \text{Trat}/\text{Test}) \times 100$$

Donde:

E: Efectividad (%)

Test: Crecimiento micelial del testigo (cm)

Trat: Crecimiento micelial del tratamiento (cm)

Para la efectividad de los fungicidas se empleó un diseño completamente al azar. Cada fungicida consistió de cinco réplicas conformada cada una por una placa Petri. Con los datos obtenidos se realizó un análisis de varianza previa transformación de datos mediante la función de

arcoseno $y = \arcsin \sqrt{\frac{y}{100}}$; la separación de medias se estimó por la prueba de Tukey ($p = 0,05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De las muestras de plántulas con síntomas de necrosis en tallos y cotiledones, así como de amarillamientos y muerte de plántulas, se aisló e identificó a *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. como agente causal de esta enfermedad. Estos síntomas típicos se han reportado en crisantemo (*Chrysanthemum* sp.) por Cabrera *et al.* (2004) y en Chile (*Capsicum annuum* L.) por Escalona *et al.* (2006).

La colonia de *F. solani* en medio de cultivo PDA presentó micelio algodonoso, de color crema-naranja; sin embargo, se observó en sucesivos reaislamientos cambios de coloración (blanco, blanco-amarillo, crema). Presentó micelio septado y microconidios abundantes

con 2,7-8,9 µm de largo por 2-4 µm de ancho, 0-1 septos presentes, de forma ovoide producidos en conidióforos largos. Se observaron pocos macroconidios, estructuras largas, septadas, en forma de media luna o de canoa, con una dimensión de 9,1-38,9 µm por 2,2-4,4 µm, con 1-4 septos y clamidosporas globosas, con diámetro de 6,2-11,1 µm, características morfológicas peculiares de este fitopatógeno reportados por Barnett y Hunter (1999) y Montealegre *et al.* (2003).

En hojas, donde se manifestaron síntomas a manera de manchas de color marrón oscuro, se identificó a *Alternaria alternata* (Fries) Keisler como el agente causal. Estos síntomas se han observado en plantas anuales y perennes, tanto comestibles como de ornato [Fernández, 2005; Arias y Jerez, 2008; Madrigal, 2009]. *A. alternata* presentó micelio de color gris en el medio de cultivo agar-jugo de verduras. Al reverso de las cajas se observó una tonalidad gris. Este hongo se caracterizó por presentar conidios obclavados, muriformes, con un extremo más estrecho, de color marrón oscuro y con septación transversal y longitudinal variable de 3-8 y 0-2, respectivamente, y un tamaño de 12-42 por 6,7-13 µm. Los conidios crecieron de forma acropétala y dieron lugar a largas cadenas, frecuentemente de 5-10 conidios simples o ramificadas. Estas características morfológicas corresponden a la especie de *A. alternata* [Rotem, 1994; Simmons, 1995]. Es importante indicar que las características taxonómicas observadas en los aislamientos realizados concordaron con las reportadas por Cova y Rodríguez (2003), así como Fraire-Cordero *et al.* (2010) para este hongo.

Con respecto a la prueba de patogenicidad, todas las plantas inoculadas con *F. solani* presentaron necrosis en la región de la incisión del tallo a los ocho días posteriores a la inoculación (DPI); sin embargo, en dos plantas no avanzó el área necrosada, y en el resto avanzó la

lesión. En las que presentaron necrosis en todo el tallo se observaron hojas cloróticas, ausencia de turgencia y posteriormente se tornaron a una coloración café, lo que causó que las plantas se marchitaran a los 40 DPI; se observó la presencia de micelio externo superficial de color blanco. Al realizar los reaislamientos correspondientes en cultivos puros, las características observadas coincidieron con el hongo inoculado inicialmente. En plántulas empleadas como testigos no se observaron síntomas, en cumplimiento con los postulados de Koch.

Los síntomas descritos anteriormente concuerdan con lo reportado por Quilambaqui *et al.* (2004) para el declinamiento del espárrago (*Asparagus officinalis* L.) ocasionado por tres especies del género *Fusarium* spp. Martínez *et al.* (2004), al realizar un estudio sobre la patogenicidad de aislamientos de especies de *Fusarium* en 10 variedades de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) encontraron al grupo de *F. solani* como los más agresivos.

La inoculación con *A. alternata* durante los postulados de Koch indujo la aparición de síntomas a los 2 DPI, los cuales se caracterizaron por presentar pequeñas manchas circulares, de color marrón claro que posteriormente se tornaron oscuro hasta extenderse hacia toda la hoja. Al realizar el reaislamiento correspondiente en cultivos puros, las características observadas coincidieron con el hongo aislado. Síntomas similares vieron Cúndom y Cabrera (2002) al inocular *A. alternata* en el cultivo de *Celosia argentea* L., donde manifestó manchas pequeñas, circulares, oscuras, de aspecto húmedo que progresaron a lesiones grandes, irregulares, de color castaño, la cual abarcó gran parte de la lámina foliar.

En la prueba de efectividad *in vitro* todos los productos evaluados contra *F. solani* mostraron el 100 % de efectividad, ya que no permitieron crecimiento micelial (Tabla 2).

Tabla 2. Efectividad de fungicidas químicos en la inhibición del crecimiento micelial de hongos patógenos en *T. peruviana*

Ingrediente activo	Efectividad (%) de fungicidas a <i>F. solani</i>	Efectividad (%) de fungicidas a <i>A. alternata</i>
Fosetyl aluminio	100 a	93,39 b
Azoxystrobin	ne	93,61 ab
Imazalil	100 a	100 a
Procloraz	100 a	100 a
Benomilo	100 a	35,63 c
Tiabendazol	100 a	36,61 c
Testigo (sin fungicida)	0 b	0 d

Medias con la misma literal son estadísticamente iguales (Tukey, $p = 0,05$).
ne: No evaluado.

Al respecto, López *et al.* (2005), al evaluar la efectividad de tiabendazol a una concentración de 600 p.p.m., obtuvieron el 100 % de inhibición sobre el crecimiento micelial *in vitro* de *F. oxysporum*, lo cual concuerda con lo obtenido en este trabajo.

En la efectividad de los fungicidas en la inhibición del crecimiento micelial de *A. alternata*, la comparación múltiple de medias (Tukey, $p = 0,05$) separó como los mejores productos a imazalil y procloraz con el 100 % de efectividad, los cuales fueron estadísticamente iguales al azoxystrobin, con el cual se obtuvo el 93,61 % de efectividad. Los fungicidas benomilo y tiabendazol fueron menos efectivos (Tabla 2).

Al evaluar el efecto inhibitorio del azoxystrobin a las dosis del ingrediente activo en un rango de 0-10 p.p.m. contra *A. alternata* en el desarrollo micelial *in vitro*, Félix y Gálvez (2002) observaron un efecto mínimo, ya que a los 10 DPI las colonias habían alcanzado los 80 mm de diámetro con las diferentes dosis del fungicida, mientras que en el testigo las colonias requirieron ocho días para alcanzar el diámetro mencionado.

En este estudio el fosetil aluminio registró el 100 %, y 93,39 % de efectividad contra *F. solani* y *A. alternata*, respectivamente. Es posible que también el grupo fosfito interfiera en el transporte de fósforo en la fisiología de estos hongos, como ocurre en los Oomycetes [Mc. Donald *et al.*, 2001], lo que afecta el desarrollo micelial y la germinación de esporas.

CONCLUSIONES

- Los agentes causales de alteraciones de origen fúngico aislados en plántulas de *Thevetia peruviana* (Pers.) K. Schum. correspondieron a *Fusarium solani*, y en hojas se encontró a *Alternaria alternata* que indujo manchas foliares.
- Ambos casos constituyen el primer reporte de estos hongos anamórficos, al afectar plantas de *Thevetia peruviana* en Yucatán, México.
- Los fungicidas evaluados para el control de *Fusarium solani* presentaron el 100 % de efectividad en la inhibición del crecimiento micelial.
- Para *Alternaria alternata* destacaron los fungicidas imazalil y procloraz al presentar el 100 % de efectividad.

AGRADECIMIENTOS

Al FOMIX-CONACYT Gobierno del Estado de Yucatán, México por el financiamiento del proyecto 107806, del cual forma parte esta investigación.

REFERENCIAS

- Abbott, W. S.: «A method of computing the effectiveness of an insecticide» *J. Econ. Entomol.* 18: 265-267. EE. UU. 1925.
- Alvarado, C. L. O.; H. Ochoterena: «A Phylogenetic Analysis of the *Cascabela-Thevetia* Species Complex (Plumeriaceae, Apocynaceae) Based on Morphology», *Annals of the Missouri Botanical Garden* 94 (2): 298-323, EE. UU., 2007.
- Ambang, Z.; D. J. P. Ngoh; G. Essono; N. Bekolo; G. Chewachong; C. C. Asseng: «Effect of *Thevetia peruviana* Seeds Extract on *in vitro* Growth of Four Strains of *Phytophthora megakarya*», *Plant Omics Journal* 3 (3): 70-76, Australia, 2010.
- Arias, T. J. K.; R. A. P. Jerez: «Elaboración de un atlas para la descripción macroscópica y microscópica de hongos fitopatógenos de interés en especies de flores de corte cultivadas en la sabana de Bogotá», trabajo de grado en Microbiología Industrial, Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias, Colombia, 2008.
- Aular de González, Y.; M. Peña; A. J. Pérez; M. Díaz: «Intoxicación por la administración de tabletas de *Thevetia peruviana* como tratamiento para bajar de peso: presentación de un caso», *Rev. Toxicol* 20: 221-223, España, 2003.
- Barnett, H. L.; B. B. Hunter: *Illustrated General of Imperfect Fungi*, 4th edition, Burgess Publishing Company, Minnesota, EE. UU., 1999.
- Cabrera, M. G.; R. E. Álvarez; N. T. Sosa de Castro; L. A. Sosa: «Patógenos de *Chrysanthemum* sp. en cultivos de las provincias de Corrientes y Chaco, Argentina», *Comunicaciones Científicas y Tecnológicas*, Universidad Nacional del Nordeste, Argentina, 2004.
- Cova, J.; D. Rodríguez: «Hongos asociados con el quemado foliar de la cebolla (*Allium cepa* L.) en el Estado Lara, Venezuela», *Bioagro* 15 (3): 157-163, Venezuela, 2003.
- Cúndom, M. A.; M. G. Cabrera: «Tizón foliar de *Celosia argentea* en el nordeste de Argentina», *Prod. Prod. Veg.* 17 (3): 463-466, España, 2002.
- Demirbas, A.: «Current Technologies in Biodiesel Production», *Biodiesel*, Ed. Springer London, Cap. 7, Reino Unido, 2008, pp. 161-173.
- Díaz, B. L.; S. J. F. López; T. Vega-Lizama; D. M. López: «Characterization of Soil from Plant Growth in Mexico as a Feedstock to Produce Biodiesel», XIX International Materials Research Congress (IMRC XIX), 15-19 agosto, Cancún, México, 2010.
- Escalona, Y.; D. Rodríguez; N. Contreras; N. Jiménez: «Patógenos del suelo en el cultivo del pimentón en la zona baja del municipio Jiménez, Estado Lara, Venezuela», *Bioagro* 18: 3-13, Venezuela, 2006.
- Félix, G. R.; F. C. A. Gálvez: «Control de moho negro *Alternaria alternata* en el fruto de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) considerando unidades calor y variables ambientales para la aplicación de Azoxystrobin en Sinaloa, México», *Revista Mexicana de Fitopatología* 20: 72-76, México, 2002.
- Fernández, G. J.: «Incidencia y caracterización: morfológica, patogénica y genética de *Alternaria* spp. en cultivos de cebolla del sur de Puerto Rico», Tesis de Maestría en Ciencias en Protección de Cultivos, Universidad de Puerto Rico, Recinto Universitario de Mayagüez, Puerto Rico, 2005.
- Fraire-Cordero, M. L.; D. Nieto-Ángel; E. Cárdenas-Soriano; G. Gutiérrez-Alonso; R. Bujanos-Muñiz; H. Vaquera-Huerta: «*Alternaria tenuissima*, *A. alternata* y *Fusarium oxysporum*, hongos causantes de la pudrición del florete de brócoli», *Revista Mexicana de Fitopatología* 28: 25-33, México, 2010.
- Herrera, P. E. A.: «Sensibilidad *in vitro* de *Fusarium oxysporum* Schlecth y *Alternaria solani* Jones & Grout a fungicidas de contacto y sistémicos», Tesis de Licenciatura en Biología, Instituto Tecnológico Agropecuario Conkal, Yucatán, México, 2004.
- López, B. A.; B. S. R. López; M. E. Vázquez-Badillo; H. S. A. Rodríguez; E. M. Mendoza; C. E. Padrón: «Inhibición del crecimiento micelial de

- Fusarium oxysporum* Schlechtend. f. sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder y Hansen, *Rhizoctonia solani* Kühn y *Verticillium dahliae* Kleb. mediante extractos vegetales acuosos», *Revista Mexicana de Fitopatología* 23 (2): 183-190, México, 2005.
- Madrigal, V. M.: «Control biológico de la mancha negra (*Alternaria alternata*) como alternativa de prevención en el manejo poscosecha del mango», Tesis de Maestría Tecnológica en Agroindustria, Institución de Enseñanza e Investigación en Ciencias Agrícolas, Colegio de Posgraduados, Córdoba, Veracruz, México, 2009.
- Martínez, G. M.; D. S. Hernández; R. J. S. Padilla; P. N. Mayek: «Diversidad patogénica y genética de aislamientos de *Fusarium* de Aguascalientes, México», *Revista Mexicana de Fitopatología*, 22 (3): 321-327, México, 2004.
- McDonald, A. E.; B. R. Grant; V. C. Plaxton: «Phosphite (Phosphorous acid): its Relevance in the Environment and Agriculture and Influence on Plant Phosphate Starvation», *Journal of Plant Nutrition* 24 (10): 1505-1519, EE. UU., 2001.
- Montealegre, J.; S. Donoso; R. Herrera; X. Besoain: «Identificación de *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. como agente causal de la podredumbre del pie de tomate», *Boletín Micológico* 18: 53-55, Chile, 2003.
- Nieto, A. D.; R. M. Acosta; A. M. Valencia; N. G. Mena: «Estudio de efectividad biológica con fungicidas», *Bases para realizar estudios de efectividad biológica de fungicidas*, Colegio de Posgraduados, Montecillo, Texcoco, Estado de México, México, 2001.
- Oluwaniyi, O. O.; S. A. Ibiyemi: «Efficacy of Catalysts in the Batch Esterification of the Fatty Acids of *Thevetia peruviana* Seed Oil», *J. Appl. Sci. Environ. Mgt.* 7 (1): 15-17, Nigeria, 2003.
- Quilambaqui, J. M.; M. E. Zavaleta; A. G. Mora; S. F. Delgadillo; J. A. Marín: «Patogenicidad de tres especies de *fusarium* asociadas con el declinamiento del espárrago (*Asparagus officinalis* L.) en Guanajuato, México», *Revista Mexicana de Fitopatología* 22 (1): 30-36, México, 2004.
- Ravikumar, P. H. S.; H. K. Makari; H. Gurumurthy: «*In vitro* Antimicrobial Activity of Ethanol Extract of *Thevetia peruviana*», *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and food Chemistry* 6 (9): 2318-2322, España, 2007.
- Rotem, J.: «The Genus *Alternaria*: Biology, Epidemiology and Pathogenicity», *American Phytopathology Society*, St. Paul, MN, EE. UU., 1994.
- Simmons, E. G.: «*Alternaria* Themes and Variations», *Mycotaxon* 55: 55-163, EE. UU., 1995.
- Stevens, W. D.; U. C. Ulloa; A. Poll; O. M. Montiel: «Flora de Nicaragua», *Missouri Botanical Garden Press*, EE. UU., 2001.
- Torres, N.: «Actualización sobre intoxicación con *Thevetia peruviana*», *Retel, Revista de Toxicología en Línea*, http://www.sertox.com.ar/img/item_full/19001.pdf Argentina, 2003, pp. 2-19.
- Tutte, J.: «Media and Nutrient Solutions Used by Plant Pathologist and Mycologist», *Plant pathologhycal methods fungi and bacteria*, Burgess Publishing Company Minneapolis, Menn, EE. UU., 1998.