

DIAGNÓSTICO Y CONTROL DE HONGOS FITOPATÓGENOS EN EL LISIANTHUS (*EUSTOMA GRANDIFLORUM*)

DIAGNOSTIC AND CONTROL OF PATHOGENIC FUNGI IN LISIANTHUS (*EUSTOMA GRANDIFLORUM*)

Felicia Amalia Moo Koh, Jairo Cristóbal Alejo*, Arturo Reyes Ramírez, Genny Alejandra Salazar Chian, José María Tun Suárez y Eduardo Villanueva Couoh

Instituto Tecnológico de Conkal. Avenida Tecnológico s/n, C.P. 97345, Conkal, Yucatán, México,

*email: jairoca54@hotmail.com

RESUMEN

En Yucatán, México, la producción de *Eustoma grandiflorum* es afectada por hongos fitopatógenos que inducen síntomas en hojas y flores sin que se conozcan los agentes causales. El objetivo del presente estudio fue realizar un diagnóstico de especies de hongos fitopatógenos en la parte aérea del cultivo y su control *in vitro* con dos fungicidas, uno químico sintético y otro de origen biológico; imazali y *Bacillus subtilis*, respectivamente. Se aislaron e identificaron molecularmente cuatro especies: *Alternaria alternata*, *Curvularia lunata*, *Helminthosporium speciferum*, las cuales se asociaron con tizones en follaje y *Fusarium equiseti*, con pudriciones en inflorescencias. En los cuatro hongos el imazalil fue efectivo al 100 % en dosis de 0,5; 1,0 y 1,5 mL • L⁻¹, mientras que la efectividad de *B. subtilis* estuvo en el rango del 87 al 100 % en dosis del 3, 4 y 5 g • L⁻¹.

Palabras claves: identificación molecular, síntomas, *Alternaria alternata*, *Curvularia lunata*, *Fusarium equiseti*, *Helminthosporium speciferum*.

ABSTRACT

In Yucatan, Mexico, the production of *Eustoma grandiflorum* is affected by phytopathogenic fungi that induce symptoms in leaves and flowers, without knowing the causative agents. The objective of this study was to diagnostic phytopathogenic fungal species in the aerial part of the culture and *in vitro* control with two fungicides one synthetic chemical and other biological; imazali and *Bacillus subtilis*, respectively. There were isolated and identified four species: *Curvularia lunata*, *Alternaria alternata*, *Helminthosporium speciferum*; associated with spots in leaves and *Fusarium equiseti* associated to rots in inflorescences. In the four fungi, the imazalil was 100 % effective in doses of 0.5, 1.0 and 1.5 mL • L⁻¹ while the effectiveness of *B. subtilis* was in the range of 87 to 100 %, at doses of 3, 4 and 5 g • L⁻¹.

Key words: molecular identification, symptoms, *Alternaria alternata*, *Curvularia lunata*, *Fusarium equiseti*, *Helminthosporium speciferum*.

INTRODUCCIÓN

En la producción de ornamentales se considera a la flor de corte el principal cultivo de mayor comercialización. Dentro de estas se encuentra el lisianthus (*Eustoma grandiflorum*), una flor con potencial de exportación comercial. Esta planta es nativa de los estados del norte de México y sur de Estados Unidos. A diferencia de las flores de corte comunes, el lisianthus puede adaptarse a condiciones de baja humedad relativa y temperaturas extremas (Fang *et al.*, 2018; Hernández *et al.*, 2015). El cultivo de *E. grandiflorum* es afectado por diversas enfermedades de etiología fungosa, entre las que destacan cenicillas polvorientas, pudriciones en raíces, tizones en hojas y flores (Fernández-Pavía y Trejo-Téllez, 2018).

En el estado de Yucatán, México, se introdujo en años recientes su cultivo en condiciones protegidas; sin embargo, se presentan pérdidas de producción de al menos el 50 % por la presencia de tizones foliares y pudriciones en flores, cuyos agentes causales se desconocen. Con base a lo anterior, el presente trabajo tuvo como objetivo hacer un diagnóstico y evaluar *in vitro* el control de hongos fitopatógenos asociados con el cultivo de *E. grandiflorum*, con el propósito de establecer la etiología y su control fitosanitario.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las muestras de *E. grandiflorum* se colectaron en el vivero Lol Pak'al S.P.R. de R.L. de C.V. en la localidad

de Dzununcán, municipio de Mérida, Yucatán, México. Los muestreos se realizaron periódicamente, y conforme se observó en el cultivo la presencia de síntomas característicos de agentes fúngicos, como manchas foliares y pudriciones en flores. Las muestras que se colectaron se trasladaron al laboratorio. Para el aislamiento e identificación de los hongos las muestras fueron separadas por síntomas y se desinfectaron con hipoclorito y sembraron en medios de cultivo selectivos (PDA, V8 y agar-avena) para inducir la esporulación de los hongos. Los aislamientos se mantuvieron a 25 °C (fotoperíodo de 12/12, en una estufa de cultivo (Felisa, Mod. 143) por ocho días. La identificación preliminar a nivel de género se realizó mediante el apoyo de claves dicotómicas (Barnett y Hunter, 2006; Leslie y Summerell, 2006), en las que se consideraron los tipos de esporas, la coloración y el crecimiento micelial en el medio de cultivo. Posteriormente se realizaron pruebas de patogenicidad y evaluaciones *in vitro* para su control.

Las pruebas de patogenicidad consistieron en la reproducción de los síntomas con la inoculación de los hongos aislados. La inoculación de hojas sanas de *E. grandiflorum* se realizó con una previamente desinfección con hipoclorito de sodio al 2 % y un doble lavado con agua estéril, y finalmente puestas en cámaras húmedas, donde se colocaron discos de micelio de 7 mm de cada hongo obtenidos de cultivos monospóricos. Las cámaras húmedas se mantuvieron a 25 °C y se observaron cada 24 h hasta que se observaron síntomas para reaislar los patógenos en medio de cultivo papa-dextrosa-agar.

La identificación específica molecular de los hongos se basó en un análisis de la secuencia de región ITS1 e ITS2 del ADN ribosomal. La extracción de ADN se realizó de acuerdo a Liu *et al.* (2002) con modificación por Moo-Koh *et al.* (2014) a partir de micelio de tres días de crecimiento. Con un portaobjeto estéril fue raspado el micelio de la caja de Petri y se depositó en un tubo de microcentrífuga de 2 mL con solución amortiguadora de lisis; también se utilizó el Kit ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep TM para extracción de ADN. La integración del ADN se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 %.

Se utilizó la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) convencional para la amplificación del ADN, con los iniciadores ITS1 (5' CCGTAGGTGAACCTGCG G 3') e ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3') se amplificó las regiones internas ITS1 e ITS2 entre los genes ribosomales (rADN) 18S, 5.8S y 28S. La mezcla de reacción consistió en: iniciadores ITS1 e ITS4 (1 mM),

MgCl₂ (3 mM), dNTP (0.2 mM), Taq DNA polimerasa (2.5 unidades), y ADN (100 ng) para un volumen final de 50 µL, bajo las siguientes condiciones de reacción: desnaturalización inicial de 2 min a 95 °C, seguido de 30 ciclos (desnaturalización a 94 °C por 1 min, alineación a 54 °C por 30 s y una extensión de 1 min a 2 °C) con una extensión final de 5 min a 72 °C (White *et al.*, 1990).

Los productos finales de la amplificación se visualizaron en gel de agarosa al 2 % (Ultra Pure™). Para su secuenciación los fragmentos amplificados se enviaron a la empresa MacroGen USA; las secuencias obtenidas fueron analizadas y editadas para la obtención de las secuencias complementarias. Estas, para su identificación, se compararon con ayuda del programa Blast con las secuencias del banco de genes de NCBI (National Center for Biotechnology Information). Las secuencias complementarias de cada hongo identificado se depositaron en el banco de genes del NCBI.

Los ensayos de efectividad *in vitro* con los fungicidas se realizaron en dilución con el medio de cultivo PDA estéril. Los fungicidas empleados fueron dos: uno sintético, el imazail (presentación líquida, 75 % i. a) y otro de origen biológico *Bacillus subtilis* (presentación polvo, 1 x 10⁹ ufc/g); estos se mezclaron con el medio PDA previamente estéril, en dosis de 0,5; 1 y 1,5 mL · L⁻¹ para el imazail, y de 3, 4, y 5 g · L⁻¹ para *B. subtilis* (Tabla 1). Posteriormente se agitaron para homogenizar las mezclas y se dosificaron en cajas de Petri en condiciones asépticas, y se incluyó un testigo de cada hongo sin fungicida. Cada dosis, incluido el testigo, tuvo cuatro réplicas, distribuidas en un diseño experimental completamente al azar.

En cada caja de Petri se sembró un disco de micelio de 7 mm diámetro de los hongos aislados; posteriormente las cajas se sellaron para conservarlas en la estufa de cultivo a 27 °C, se midió el crecimiento micelial cada 24 h hasta que el testigo sin aplicación del producto cubrió por completo la caja Petri. La efectividad o porcentaje de inhibición de crecimiento micelial de los dos fungicidas se calculó con la fórmula de Abbott (1925). Con esta información se realizó un análisis de varianza previa transformación de los datos mediante la función $y = \arcsin(\sqrt{y/100})$; la separación de medias se realizó con el método de Tukey ($p \leq 0,05$). Los análisis estadísticos se realizaron con ayuda del paquete estadístico SAS Ver. 9. 4.

Tabla 1. Fungicidas y dosis para la efectividad *in vitro* con hongos fitopatógenos
Table 1. Fungicides and doses for *in vitro* effectiveness with phytopathogenic fungi

Tratamiento	Dosis*		
	Baja	Recomendada	Alta
Imazalil	0,5	1	1,5
<i>Bacillus subtilis</i>	3	4	5
PDA	0	0	0

* El fungicida Imazalil fue evaluado a dosis en mL · L⁻¹ y *B. subtilis* en g · L⁻¹.
* The fungicide it was evaluated in doses of mL · L⁻¹ and *B. subtilis* in g · L⁻¹.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con la sintomatología encontrada en lisianthus se realizaron los aislamientos y cámaras húmedas para la identificación de los patógenos causales; y con las pruebas de patogenicidad se reprodujeron los mismos síntomas en hojas y flores observados en las plantas enfermas muestreadas en vivero, lo que demostró la virulencia de los hongos aislados.

Como primer síndrome se observó en hojas manchas cloróticas, circulares a ovales, pardas con el borde marrón rojizo, pudriciones de color café a oscuro en los sépalos y pétalos, hasta dejarlos secos. La pudrición

se observó inicialmente en la flor hasta el tallo, con partes de los sépalos aparentemente sanos (Fig. 1). De esta sintomatología se aisló a *Curvularia* sp., la cepa en medio de cultivo PDA, al inicio se desarrolló de color café a oscuro, conidios con puntas ovaladas con cuatro células, una más grande en forma de curva (Barnett y Hunter, 2006; García-Aroca *et al.*, 2018). Con el análisis de secuencias genéticas se identificó al agente causal con un 100 % de homología con la especie de *Curvularia lunata*. Esta especie se consideró el agente causal de los síntomas descritos y su secuencia se depositó en banco de genes del NCBI (Tabla 2).

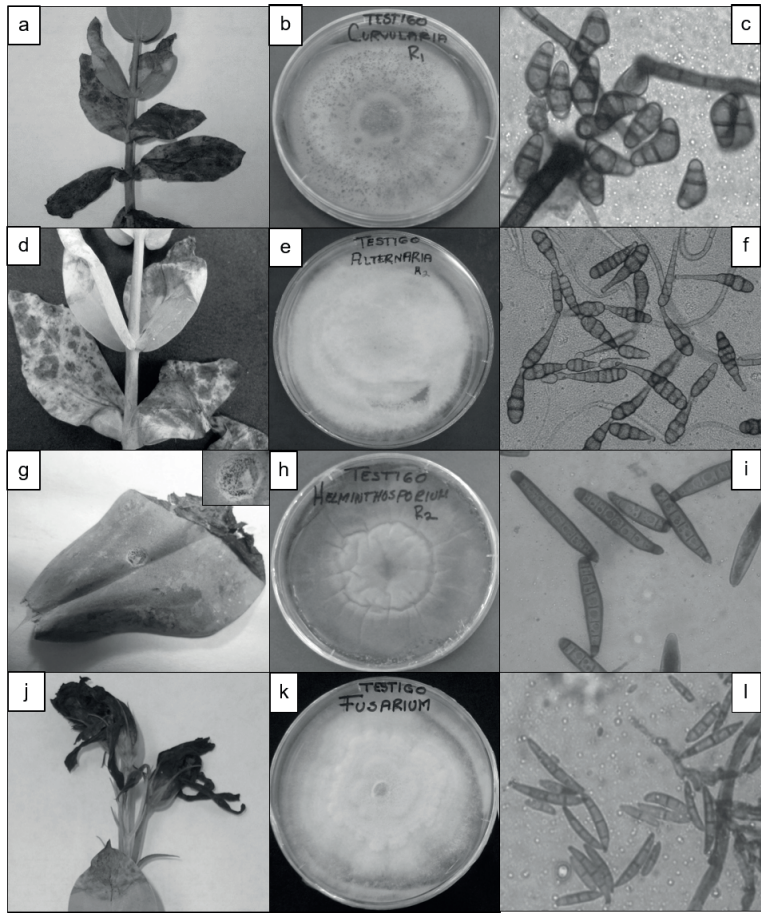


Figura 1. Hongos fitopatógenos aislados de *E. grandiflorum*. *C. lunata*(a-c), *A. alternata*(d-f), *H. speciferum* (g-i), y *F. equiseti* (j-l).
Figure 1 Phytopathogenic fungi isolated from *E. grandiflorum*. *C. lunata*(a-c), *A. alternata*(d-f), *H. speciferum* (g-i), y *F. equiseti* (j-l).

El segundo síndrome encontrado fue la presencia de tizones foliares, que conforme progresaron, el tejido se tornó clorótico y con presencia de conidios de color obscuro (Fig. 1). La identificación con claves dicotómicas coincidió con *Helminthosporium* sp., que en medio de cultivo creció de color gris oscuro a negro, con conidios oscuros cilíndricos, largos con tres o más segmentos (Barnett y Hunter, 2006). La comparación de la secuencia complementaria de este aislado con las secuencias del banco de genes del NCBI permitió identificar con un 100 % de homología con *Helminthosporium speciferum* como agente causal de los tizones foliares (Tabla 2).

Un tercer síndrome en hojas maduras fueron manchas concéntricas y de color marrón a café oscuro. Los síntomas progresaron hasta alcanzar las hojas jóvenes, en cuyos ápices se desarrolló micelio en el haz de las hojas; también se observaron hojas quebradizas de color café claro con manchas oscuras, para finalmente abarcar la totalidad de las hojas y coalescer (Fig. 1). De manera morfológica se identificó a *Alternaria* sp. como agente causal, que tuvo un crecimiento en medio de cultivo esponjoso de color gris a negro y con centro de color

blanco, con dictiosporas de color oscuro, en forma de mazos, en cadenas y algunos alargados (Barnett y Hunter, 2006; Domínguez-Serrano *et al.*, 2016). La identificación molecular permitió identificar con el 100 % de homología con *Alternaria alternata* como el causante de estos síntomas (Tabla 2).

Por último, se observó una clorosis general de la planta, necrosis en hojas y pudrición de la inflorescencia. También se observó marchitamiento desde el ápice hasta el peciolo con desprendimiento de hojas (Fig. 1). En este síntoma se identificó a *Fusarium* sp. En medio de cultivo PDA, presentó micelio color blanco, con hifas aéreas en el medio; cuando se encontró en la fase de esporulación la coloración cambió a naranja. Se observaron conidios con una curva dorsiventral pronunciada, alargados, septados (5-7 septos) en forma acanalada y células apicales cónicas (Leslie y Summerell, 2006). La identificación molecular permitió identificar con un 99 % de homología con *Fusarium equiseti*. Por lo que se considera a esta especie como principal agente patógeno que indujo la clorosis general de la planta y pudrición, y cuya secuencia se encuentra depositada en el banco de genes del NCBI (Tabla 2).

Tabla 2. Identificación morfológica y molecular de hongos fitopatógenos en *E. grandiflorum*
Table 2. Morphological identification and molecular of phytopathogenic fungi in *E. grandiflorum*

Cepa	Identificación morfológica	Identificación molecular		
		Homología*	Identidad (%)	Nº de Acceso GenBank
ITC20	<i>Alternaria</i> sp.	<i>Alternaria alternata</i> (KF039678)	100	KX987252
ITC14	<i>Curvularia</i> sp.	<i>Curvularialunata</i> (GQ280375)	100	KX987253
ITC17	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Fusarium equiseti</i> (JX896997)	99	KX987254
ITC18	<i>Helminthosporium</i> sp.	<i>Helminthosporium-speciferum</i> (KC999916)	100	KX987255

* Especies y claves de acceso del Genbank con las que se obtuvo la homología.
* Species and access number of the Genbank with which the homology was obtained.

La producción de *E. grandiflorum* como cultivo de flor de corte tiene potencial en ambientes tropicales; sin embargo, su introducción en estas condiciones la hace susceptible a enfermedades inducidas por hongos principalmente (Fang *et al.*, 2018). Las especies identificadas en el presente estudio han sido reportadas en otros cultivos de interés ornamental, como *C. lunata* en *Strelitzia reginae* y *Chamaedorea elegans* (Meenatchi

et al., 2016), en *Polianthes tuberosa* (Cristóbal *et al.*, 2013) y en *Thrinax radiata* (Moo-Koh *et al.*, 2014), mientras que *Helminthosporium* está presente en *Axonopus* spp., *Cynodon dactylon*, *Stylosanthes guianensis*, *Brachiaria decumbens*, *Panicum máximum* y en otros cultivos de interés comercial como avena, centeno, arroz, caña de azúcar y sorgo (Cuervo *et al.*, 2016). El hongo *A. alternata* es considerado cosmopolita, induce

tizones foliares en *Heliconia* spp., *Polianthes tuberosa*, *Rosa floribunda*, *Rumex vesicarius*, *Syringa vulgaris*, *Thevetia ahouai* y *Thevetia peruviana* (Cristóbal *et al.*, 2013), así como en cultivos de interés alimenticio como *Solanum lycopersicum* y *Capsicum annuum* (Martínez-Ruiz *et al.*, 2016), cuya presencia se reconoce por sus síntomas en frutos poscosecha, principalmente.

En el cultivo de *E. grandiflorum* solo se ha reportado a *F. avenacearum*, *F. solani* (Xiao *et al.*, 2018) y *F. oxysporum* (Firmino *et al.*, 2017) como patógenos causantes de pudrición de raíz y tallo, por lo que ahora *F. equiseti* se incluye a lista de especies que afectan a

este cultivo ornamental, además de otros hospedantes reportados como *Dracaena marginata*, *Gusmania lingulata*, *Philodendron erubescens*, *Aechmea fasciata*, *Agave americana* y *Ficus pumila* y en cucurbitáceas, solanáceas, frutales y gramíneas (Kiecana *et al.*, 2014). La presencia de *F. equiseti* en *E. grandiflorum* constituye el primer reporte para esta ornamental.

Las evaluaciones de sensibilidad *in vitro* con los fungicidas fueron un 100 % efectivas con las tres dosis evaluadas, excepto con el fungicida biológico; en su dosis de 3 g • L⁻¹ en *F. equiseti* presentó un 87 % de efectividad (Tabla 3).

Tabla 3. Inhibición del crecimiento micelial de hongos fitopatógenos con dos fungicidas
Table 3. Inhibition of the mycelial growth of phytopathogenic fungi with two fungicides

Tratamientos	Dosis*	Inhibición (%)			
		<i>C. lunata</i>	<i>F. equiseti</i>	<i>H. speciferum</i>	<i>A. alternata</i>
Imazalil	1,5	100 a	100 a	100 a	100 a
	1	100 a	100 a	100 a	100 a
	0,5	100 a	100 a	100 a	100 a
<i>B. subtilis</i>	5	100 a	100 a	100 a	100 a
	4	100 a	100 a	100 a	100 a
	3	100 a	87 b	100 a	100 a
Testigo	PDA	0 c	0c	0c	0c

Nota: Medias con la misma letra entre columnas son iguales (Tukey, P≤0,05). * El fungicida imazalil fue evaluado a dosis en mL • L⁻¹ y *B. subtilis* g • L⁻¹.

Note: Means with the same letter between columns are equal (Tukey, P ≤ 0,05). * The imazalil fungicide was evaluated at doses in mL • L⁻¹ and *B. subtilis* g • L⁻¹.

Diversos estudios han demostrado el potencial de los fungicidas para incluirlos en los programas de protección en los cultivos, por lo que se realizan evaluaciones previas de efectividad *in vitro*. Reportes del uso del imazail en *Colletotrichum musae* resultó efectiva en dosis de 0,5 mL • L⁻¹ (Rodrigues *et al.*, 2019), contra *Penicillium expansum* fue de 0,2 mL • L⁻¹ (El Guiche *et al.*, 2016). En *Cylindrocarpon liriodendri* y *C. macrodidymum* las dosis efectivas fueron 100, 10, 1 y 0,1 mg i. a • L⁻¹ (Alaniz *et al.*, 2011); contra *Curvularia* sp., *Alternaria* sp. y *Helminthosporium* sp. la mejor dosis de efectividad correspondió a 1 mL • L⁻¹ (Cristóbal *et al.*, 2013). Finalmente en *P. digitatum* se consideró las dosis de 2 mg • L⁻¹ como mejor para inhibir al hongo (Sepúlveda *et al.*, 2015). El imazalil es un fungicida de la familia de los imidazoles, de acción sistémica, que afecta la síntesis del ergosterol, componente principal de la membrana celular (Erasmus *et al.*, 2015).

Por las propiedades antifúngicas, *B. subtilis* se le ha empleado como ingrediente activo de fungicidas biológicos. Estudios con *B. subtilis* reportan actividad *in vitro* contra *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum*, con un 60 % de inhibición del crecimiento micelial (Gua-to-Molina *et al.*, 2019); así mismo en *F. oxysporum* f. sp. *gladioli*, *B. subtilis* mostró una inhibición del crecimiento micelial del 58,89 % (Michel *et al.*, 2014) y en *F. oxysporum* f. sp. *ciceri*, *B. subtilis* causó el 75 % de inhibición del crecimiento del hongo (Suthar *et al.*, 2017).

En otros trabajos se reportó la actividad de *B. subtilis* en combinación con el fungicida imazalil (0,5 y 1 mL • L⁻¹) sobre *P. digitatum*, causante de enfermedades poscosecha en cítricos. La combinación redujo la infección en un rango del 42 al 27 % (Moretto *et al.*, 2014). También *B. subtilis* ha ejercido efecto inhibitorio sobre

el crecimiento de otros fitopatógenos como *Pythium* spp., *Phytophthora* spp., *Botrytis* spp., *C. gloeosporioides*, *Penicillium* spp., *Rhizoctonia* spp., *A. solani*, *Fusarium* spp., *Monilinia* spp. (Reinoso et al., 2007; Tucuch-Pérez et al., 2018).

En la literatura se encuentra pocos experimentos exitosos relacionados con el uso de *Bacillus* en lisianthus y otros géneros afines para el biocontrol práctico; lo que puede deberse a que actualmente existe la tendencia de emplear estos microorganismos para la inducción de resistencia sistémica en plantas, como mecanismo de control biológico que provee una protección efectiva frente al ataque de hongos fitopatógenos.

CONCLUSIÓN

- El presente trabajo constituye un primer reporte de las especies *C. lunata*, *H. speciferum*, *A. alternata* y *F. equiseti*, como especies inductoras de enfermedades en *Eustoma grandiflorum* en condiciones protegidas. El fungicida imazalil en dosis del $0,5 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$ tiene un efecto potencial para el control de los hongos fitopatógenos en estudio.

REFERENCIAS

- Abbott W S, 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology*. 18, 265-267.
- Alaniz S., Abad-Campos P, García-Jiménez J, and Armengol J. 2011. Evaluation of fungicides to control *Cylindrocarpon liriodendri* and *Cylindrocarpon macrodidymum* in vitro, and their effect during the rooting phase in the grapevine propagation process. *Crop Protection*, 30(4), 489-494.
- Barnett H L, and Hunter B B, 2006. Illustrate Genera of Imperfect Fungy, 4th Ed. St Paul, Minnesota, USA: The American Phytopathological Society. 197 pp.
- Cristóbal A J, Navarrete M Z, Herrera P E, Mis M M, Tun S J M, Ruiz S E, 2013. Hifomicetos asociados a plantas tropicales del estado de Yucatán, México: Identificación genérica y evaluación de fungicidas para su control. *Revista Protección Vegetal*. 28, 138-144.
- Cuervo M, Ramírez J C, Balcázar M D S, Muñoz L, Hernández A M, González D, Martínez J, Debouck D G, 2016. Manual de Procedimientos del laboratorio sanidad de germoplasma. Certificación sanitaria del germoplasma de frijol, pastos tropicales y leguminosas forrajeras. 2da. Ed., Cali, Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical. 33 pp.
- Domínguez-Serrano D, Yáñez-Morales M J, García-Velasco R, Alanís-Martínez I, Segura-León O, 2016. First report of *Chrysanthemum morifolium* leaf spot caused by *Alternaria* species in Mexico. *Plant Disease*. 100, 647-647.
- El Guiche R, Amri O, Tahrouch S, Zekhnini A, and Hatimi A, 2016. Antifungal activity of extracts of eleven medicinal and aromatic plants from Morocco against *Penicillium digitatum*, the causal agent of citrus green mold. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*. 8, 322-325.
- Erasmus A, Lennox C L, Korsten L, Lesar K, Fourie P H, 2015. Imazalil resistance in *Penicillium digitatum* and *P. italicum* causing citrus postharvest green and blue mould: Impact and options. *Postharvest Biology and Technology*. 10, 66-76.
- Fernández-Pavía Y L., Trejo-Téllez L I, 2018. Biología, importancia económica y principales líneas de investigación en Lisianthus: una especie ornamental nativa de México *Agroproductividad*. 11, 177-182.
- Fang F, Oliva M, Ehi Eromosele S, Zaccari M, Arazi T, Oren Shamir M, 2018. Successful floral dipping transformation of post anthesis lisianthus (*Eustoma grandiflorum*) flowers. *The Plant Journal*. 96, 869-879.
- Firmino A C, Dourado F A, Furtado E L, 2017. *Fusarium oxysporum* causing wilt in *Eustoma grandiflorum* in Brazil. *Summa Phytopathologica*. 43, 250.
- García-Aroca T, Doyle V, Singh R, Price T, Collins K, 2018. First report of *Curvularia* leaf spot of corn, caused by *Curvularia lunata*, in the United States. *Plant health progress*. 19, 140-142.
- Guato-Molina J J, Auhing-Arcos J A, Crespo-Ávila J A, Esmeraldas-García G A, Mendoza-León A F, Canchignia-Martínez H F, 2019. Bacterias promotoras del crecimiento en plantas con potencial agente biocontrolador a *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici*, y *Moniliophthora roreri*. *Scientia Agropecuaria*. 10, 393-402.
- Hernández P A, Villegas T O G, Valdez A L A, Alia T I, López M V, Domínguez P M L, 2015. Tolerancia de Lisianthus (*Eustoma grandiflorum* (Raf.) Shinn.) a elevadas concentraciones de amonio en la solución nutritiva. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 6, 467-482.
- Kiecana I, Cegiello M, Mielniczuk E, Pastucha A, 2015. Fungi infecting ornamental grasses and the pathogenicity of *Fusarium culmorum* (W.G.Sm.) Sacc. and *Fusarium equiseti* (Corda) Sacc. to selected species. *Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus*. 13, 61-75.
- Leslie J F, and Summerell B A, 2006. The Fusarium laboratory manual. USA. John Wiley & Sons.
- Liu D, Pearce L, Lilley G, Coloe S, Baird R, Pedersen J, 2002. PCR identification of dermatophyte fungus *Trichophyton rubrum*, *T. soudanense* and *T. gourvillii*. *Journal of Medical Microbiology*. 51, 117-122.
- Martínez-Ruiz F E, Cervantes-Díaz L, Ail-Catzím C E, Hernández-Montiel L G, Sánchez C L D T, Rueda-Puente E O, 2016. Hongos fitopatógenos asociados al tomate (*Solanum lycopersicum* L.) en la zona árida del noroeste de México: la importancia de su diagnóstico. *European Scientific Journal*. 12, 232-256.
- Meenatchi A, Ramesh V, Bagyalakshmi, Kuralarasi R, Shanmugaiah V, Rajendran A, 2016. Diversity of endophytic fungi from the ornamental plant – *Adenium obesum*. *Studies in Fungi*. 1, 34-42.
- Michel A A C, Ariza F R, Otero S M O, Barrios A A, Quiroz M A M, 2014. Efectividad *in vitro* e *in situ* de fungicidas químicos y biológicos en el control de *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli* y *Uromyces transversalis* en Gladiola. *Agro Productividad*. 7, 3-11.
- Moo-Koh F A, Cristóbal-Alejo J, Reyes-Ramírez A, Tun-Suárez J M, Sandoval-Luna R, Ramírez-Pool J A, 2014. Actividad *in vitro* del extracto acuoso de *Bonellia flammea* contra hongos fitopatógenos. *Agrociencia*. 48, 833- 845.
- Moretto C, Lima C A L, Batista F A, Kupper K C, 2014. Integrated control of green mold to reduce chemical treatment in post-harvest citrus fruits. *Scientia Horticulturae*. 165, 433-438.
- Reinoso P Y, Vaillant F D, Casadesús R L, García P E, Álvarez R P V, 2007. Selección de cepas de *Bacillus* y otros géneros relacionados para el control biológico de hongos fitopatógenos. *Fitosanidad*. 11, 35-40.
- Rodrigues M L M, Mizobutsi E H, Prates P J L, Duarte P V L, Ribeiro R C F, da Silva Pinheiro J M, Mizobutsi P G, Batista F M, Silva, L. S, 2019. Phosphite-based products in the *In vitro Colletotrichum musae* control. *Journal of Experimental Agriculture International*. 33, 1-9.
- Sepulveda M, Cuevas I I, Smilanick J L, Cerionib L, Rapisarda V A, Ramallo J, 2015. Improvement in imazalil treatments in commercial packinglines to control green mold on lemon fruit. *Scientia Horticulturae*. 192, 387-390.

Suthar K P, Patel R M, Singh D, Khunt M D, 2017. Efficacy of *Bacillus subtilis* isolate K18 against chickpea wilt *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri*. *International Journal Of Pure & Applied Bioscience*. 5, 838-843.

Tucuch-Pérez M A, Daniel F, Arredondo-Valdés R, Laredo-Alcalá E I, 2018. Antifungal activity of metabolites from *Bacillus* spp. against *Fusarium oxysporum* using micro dilution in plate method. *European Journal of Biotechnology and Genetic Engineering*. 5, 22-30.

White T J, Bruns T, Lee S, Taylor J, 1990. *Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics*. San Diego, California, Estados Unidos: Academic Press. 315-322.

Xiao R F, Wang J P., Ruan, C Q, Pan Z Z, Zhu Y J, Liu B, 2018. Root and stem rot on *Lisianthus* (*Eustoma grandiflorum*) in China caused by *Fusarium solani*. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 40, 455-460. Recibido: 10/9/2018

SERVICIOS CIENTÍFICO-TÉCNICOS

ofrecidos por el

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES DE SANIDAD VEGETAL

INISAV



- Análisis físico-químico de plaguicidas.
- Análisis de residuos y contaminación ambiental por plaguicidas.
- Monitoreo y determinación de fungo e insectorresistencia.
- Asistencia técnica sobre reproducción y liberación de entomófagos.
- Asistencia técnica sobre reproducción y utilización de bioplaguicidas.
- Diagnóstico cuarentenario y evaluación de riesgos.
- Diagnóstico de agentes causales de enfermedades causadas por virus, hongos y bacterias.
- Diagnóstico entomológico, acarológico y nematológico.
- Control de roedores.
- Asistencia técnica sobre manejo integrado de plagas, enfermedades y malezas.
- Servicio de cuarentena para introducciones de entomófagos.
- Venta de inmunosueros de bacterias fitopatógenas.