



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
CENTRO DE DESARROLLO DE PRODUCTOS BIÓTICOS

**EFFECTO DE EXTRACTOS BOTÁNICOS Y QUITOSANO SOBRE
EL CONTROL DE LA PUDRICIÓN CAFÉ EN CORMOS Y
PLANTAS DE GLADIOLO, CULTIVADAS EN INVERNADERO**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS
EN**

**MANEJO AGROECOLÓGICO DE PLAGAS Y ENFERMEDADES
PRESENTA**

OLGA LIDIA CRUZ MIRANDA



YAUTEPEC, MORELOS, DICIEMBRE DE 2011



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

SIP-14

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Yautepec, Mor. siendo las 12:00 horas del día 4 del mes de Noviembre del 2011 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CeProBi para examinar la tesis de grado titulada:
Efecto de Extractos Botánicos y Quitosano sobre el Control de la Pudrición Café en Cormos Y Plantas de Gladiolo, Cultivadas en Invernadero.

Presentada por el alumno:

CRUZ

Apellido paterno

MIRANDA

Apellido materno

OLGA LIDIA

Nombre(s)

Con registro:

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| B | 0 | 9 | 1 | 4 | 1 | 4 |
|---|---|---|---|---|---|---|

aspirante de:

MAESTRIA EN CIENCIAS EN MANEJO AGROECOLÓGICO DE PLAGAS Y ENFERMEDADES

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron ***SU APROBACIÓN DE LA TESIS***, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

DRA. LAURA LETICIA BARRERA NECHA

DRA. SILVIA BAUTISTA BAÑOS

DRA. GABRIELA SEPULVEDA JIMÉNEZ

DRA. ELSA VENTURA ZAPATA

DR. RAMÓN VILLANUEVA ARCE

DRA. KALINA BERMÚDEZ TORRES

EL PRESIDENTE DEL COLEGIO

DR. ANTONIO RUPERTO JIMÉNEZ APARICIO



SEP IPN
CENTRO DE DESARROLLO
DE PRODUCTOS BIOTICOS
YAUTEPEC, MOR.



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN**

CARTA DE CESIÓN DE DERECHOS

En la ciudad de Yauteppec, Mor. Siendo el día 28 del mes de noviembre del año 2011. La que suscribe Olga Lidia Cruz Miranda, alumna del Programa de Maestría en Ciencias en Manejo Agroecológico de Plagas y Enfermedades, con número de registro B091414, adscrita al Centro de Desarrollo de Productos Bióticos, manifiesta que es autora intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de la Dra. Laura Leticia Barrera Necha y la Dra. Silvia Bautista Baños y cede los derechos del trabajo titulado "Efecto de Extractos Botánicos y Quitosano sobre el Control de la Pudrición Café en Cormos y Plantas de Gladiolo, Cultivadas en Invernadero", al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deberán reproducir el contenido textual, gráficas, o datos del trabajo, sin el permiso expreso del autor y directores del trabajo. Este puede obtenerse escribiendo a la siguiente dirección: Centro de Desarrollo de Productos Bióticos, Carretera Yauteppec-Jojutla, Km 6 Col. San Isidro, C.P. 62731 Yauteppec, Morelos, México, Fax: (52) (0155) 57296000 ext. 82512 ó (01735) 3941896, e-mail: ceprobi@ipn.mx (<http://www.ceprobi.ipn.mx>). Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Olga Lidia Cruz Miranda

Nombre y firma

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD

Con base en el artículo 57 fracción I del Reglamento de Estudios de Posgrado vigente y en la Sección IV del Código de Ética del IPN, hacemos constar que el trabajo de tesis "Efecto de Extractos Botánicos y Quitosano sobre el Control de la Pudrición Café en Cormos y Plantas de Gladiolo, Cultivadas en Invernadero" es responsabilidad de la Dra. Laura Leticia Barrera Necha, de la Dra. Silvia Bautista Baños y de la IBt. Olga Lidia Cruz Miranda, y que ni los datos experimentales ni el texto han sido usados para obtener otro grado académico en el país o en el extranjero. Cualquier colaboración o cita textual fue declarada y reconocida en el documento.

Yautepec, Morelos, Noviembre de 2011.

ATENTAMENTE



Dra. Laura Leticia Barrera Necha



Dra. Silvia Bautista Baños



Olga Lidia Cruz Miranda

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Fitopatología Poscosecha del Departamento de Interacciones Planta –Insecto del Centro de Desarrollo de Productos Bióticos del Instituto Politécnico Nacional (CEPROBI-IPN) bajo la dirección de la Dra. Laura Leticia Barrera Necha y la Dra. Silvia Bautista Baños. El análisis fitoquímico se realizó en el Departamento de Química Orgánica del Centro de Investigaciones Químicas de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (C.I.Q.U.A.E.M) bajo la supervisión de la Dra. Yolanda Ríos Gómez. Para la realización de los estudios se contó con el apoyo económico de CONACYT (Becario 332867) y del Programa Institucional de Formación de Investigadores de la Secretaría de Investigación y Posgrado (SIP) del IPN. La investigación fue realizada con el financiamiento otorgado a los proyectos SIP 20100783 y 20113542.

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto Politécnico Nacional por las becas otorgadas para la realización de estos estudios.

A CONACYT por la beca brindada durante dos años.

Por su comprensión, paciencia, amistad y sabiduría extraordinaria, doy gracias a mis directoras de tesis Dra. Laura L. Barrera y Dra. Silvia Bautista.

A los integrantes de mi jurado, gracias por las observaciones brindadas para el mejoramiento de mi trabajo de tesis.

A mis maestros que me dieron clase, gracias por compartir sus conocimientos.

A mis compañeros y amigos Kathia, Adriana, Jesus y Nadis, Arely, Ivonne, Tepole, maestra Lety, gracias por su apoyo moral, espiritual y económico en los momentos más difíciles de mi vida.

Por su ayuda, su consejo y estímulo, estoy en deuda con “la chica de Chiapas” mi amiga Liliana Carolina, gracias por enseñarme el verdadero sentido de la amistad.

A la maestra Mónica Hernández, por su especial talento y tenacidad para transmitir sus conocimientos, por su entusiasmo, por sus comentarios constructivos y por todo tu apoyo moni, mi más sincero agradecimiento

A mis compañeras de laboratorio Estrella, Margarita y Rosalba, por la amistad y confianza brindada.

A mis padres Doña Mari y Don Raúl, gracias porque ustedes han sido la inspiración de mi superación.

A mis queridos hermanos Tere, Jesa, Sabas, Gisela, Leo, Ara, Nacho, Eren, Blanca, Ross y mi cuñado Chucho, gracias por confiar en mí.

A mi mano derecha, René López, gracias por todos los fines de semana que me acompañaste a regar mis plantas...gracias por todo tu apoyo y amor.

Si pese a la ayuda y el apoyo de todas estas buenas personas, he cometido muchos errores, son enteramente culpa mía y doy las gracias de antemano a ti JESUS padre celestial porque siempre has estado a mi lado.

Con profunda amor dedico este trabajo a mi querida hermana

A r a c e l i

y a mi sobrino

José Emiliano

*Agradezco todos los días a Dios por la obra y gracia
manifestada en estas dos personas a las que amo
inmensamente....*

| CONTENIDO | Pág. |
|--|-------------|
| Índice de cuadros | IV |
| Índice de figuras | V |
| Resumen | VII |
| Abstract..... | VIII |
| 1. Introducción | 1 |
| 2. Antecedentes | 3 |
| 2.1 Importancia económica del gladiolo..... | 3 |
| 2.2 Taxonomía de la planta de gladiolo | 5 |
| 2.3 Descripción botánica..... | 5 |
| 2.4 Condiciones del cultivo | 9 |
| 2.4.1 Temperatura | 9 |
| 2.4.2 Iluminación | 9 |
| 2.4.3 Humedad | 10 |
| 2.4.4 Suelo | 10 |
| 2.4.5 Fertilización | 10 |
| 2.4.6 Cosecha de las varas florales y de los cormos | 11 |
| 2.4.7 Condiciones de almacenamiento y empaque | 12 |
| 2.5 Descripción general de las enfermedades del gladiolo | 12 |
| 2.5.1 Sarna del gladiolo | 13 |
| 2.5.2 Podredumbre por <i>penicillium</i> | 13 |
| 2.5.3 <i>Botrytis</i> | 14 |
| 2.5.4 <i>Curvularia</i> | 15 |
| 2.5.5 <i>Stromatinia</i> | 16 |

| | | |
|-------|---|----|
| 2.5.6 | Roya del gladiolo | 16 |
| 2.6 | Pudrición café, marchitez o fusariosis del gladiolo | 17 |
| 2.6.1 | Síntomas en cormo..... | 18 |
| 2.6.2 | Síntomas en follaje..... | 19 |
| 2.7 | <i>Fusarium oxysporum</i> | 20 |
| 2.7.1 | Morfología de <i>Fusarium oxysporum</i> | 22 |
| 2.8 | Manejo de la enfermedad..... | 24 |
| 2.8.1 | Labores culturales | 24 |
| 2.8.2 | Control químico | 25 |
| 2.8.3 | Control térmico | 26 |
| 2.8.4 | Control biológico | 27 |
| 2.8.5 | Tratamientos combinados | 29 |
| 2.8.6 | Aceites esenciales | 30 |
| 2.8.7 | Extractos vegetales | 31 |
| 2.8.8 | Quitosano | 33 |
| 3. | Justificación..... | 34 |
| 4. | Objetivo general | 35 |
| 4.1 | Objetivos específicos | 35 |
| 5. | Materiales y métodos | 36 |
| 5.1 | Obtención de los extractos vegetales | 36 |
| 5.2 | Preparación del suelo | 39 |
| 5.3 | Inoculación de los cormos | 40 |
| 5.4 | Tratamiento de los cormos..... | 42 |
| 5.5 | Variables evaluadas | 43 |

| | | |
|-------|---|----|
| 5.6 | Diseño experimental y análisis estadístico | 45 |
| 5.7 | Análisis fitoquímico de extractos vegetales por Cromatografía de Gases y Espectrometría de Masas (CG-EM)..... | 47 |
| 6. | Resultados | 48 |
| 6.1 | Experimento 1. Efecto de la aplicación de extractos vegetales en cormos preinoculados con solución de esporas y sembrados en suelo estéril | 48 |
| 6.2 | Experimento 2: Efecto de la aplicación de extractos vegetales en cormos preinoculados con solución de esporas y micelio y sembrados en suelo colectado de campo..... | 50 |
| 6.3 | Experimento 3 Efecto de la aplicación de extractos vegetales en cormos preinoculados con micelio, sembrados en suelo colectado de campo. | 52 |
| 6.4 | Experimento 4: Efecto de la aplicación de extractos vegetales y quitosano en cormos preinoculados con micelio, sembrados en suelo estéril y suelo colectado de campo..... | 54 |
| 6.5 | Análisis fitoquímico de los extractos vegetales por cromatografía de gases y espectrometría de masas (CG-EM)..... | 57 |
| 6.5.1 | Análisis del extracto de ciruela..... | 59 |
| 6.5.2 | Análisis del extracto de guayaba..... | 60 |
| 6.5.3 | Análisis del extracto de nanche..... | 61 |
| 5. | Discusión..... | 62 |
| 6. | Conclusiones | 68 |
| 7. | Literatura citada..... | 69 |

Índice de cuadros

| | |
|---|----|
| Cuadro 1. Principales estados productores de gladiolo en México. | 4 |
| Cuadro 2. Principales municipios productores de gladiolo en el estado de Morelos. | 4 |
| Cuadro 3. Escala para evaluar la severidad de la enfermedad en el cormo. | 43 |
| Cuadro 4. Escala para evaluar la severidad de la enfermedad en la planta. | 44 |
| Cuadro 5. Resumen de los tratamientos y variables evaluadas en cada tratamiento. | 46 |
| Cuadro 6. Efecto de los extractos vegetales en los días de emergencia y desarrollo de la espiga floral. | 49 |
| Cuadro 7. Efecto de los extractos vegetales y el método de inoculación sobre la emergencia e incidencia de la enfermedad en cormos inoculados con micelio y solución de esporas. .. | 51 |
| Cuadro 8. Efecto de los extractos vegetales sobre el porcentaje de infección en el cormo, incidencia, severidad y desarrollo de la planta. | 53 |
| Cuadro 9. Efecto de los extractos vegetales y quitosano en cormos sembrados con suelo estéril y no estéril. | 56 |
| Cuadro 10. Compuestos identificados en los extractos vegetales y agrupados por familias químicas. | 57 |
| Cuadro 11. Compuestos identificados en el extracto de ciruela. | 59 |
| Cuadro 12. Compuestos identificados en el extracto de guayaba. | 60 |
| Cuadro 13. Compuestos identificados en el extracto de nanche. | 61 |

Índice de figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1. Estructura del cormo de gladiolo (infojardin.com)..... | 6 |
| Figura 2. Hojas de una planta de gladiolo. | 6 |
| Figura 3. Distintos colores y formas de las flores del gladiolo (floristeriasierra.com) | 7 |
| Figura 4. Descripción morfológica de la planta del gladiolo (Cruz, 2005). | 8 |
| Figura 5. Daño ocasionado en el cormo por <i>Pseudomonas marginata</i> , también llamado sarna del gladiolo (agrolink.com). | 13 |
| Figura 6. Daño causado en el cormo por <i>Penicillium gladioli</i> (RPD, 1983). | 14 |
| Figura 7. Daños causados por <i>Botrytis gladiolorum</i> en cormo(A) y hoja (B) (Bergman, 1995). | 15 |
| Figura 8. Daños en hoja de gladiolo causado por el hongo <i>Curvularia trifolii</i> (prevalentfungi.org). | 15 |
| Figura 9. Daño causado en cormos por el hongo <i>Stromatinia gladioli</i> (infojardin.com). | 16 |
| Figura 10. Síntomas causados por el hongo <i>Uromyces transversalis</i> , manchas pequeñas y amarillentas (1); protuberancias de color amarillas-anaranjadas (2 y 3); conforme avanza el daño las lesiones se tornan color café oscuro a negro (4) (SAGARPA, 2004). | 17 |
| Figura 11. Pudrición y momificación de cormos de gladiolo causado por <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>gladioli</i> (Martínez, 2010). | 19 |
| Figura 12. Sintomatología en plantas de gladiolo (A) y síntoma característico: asta de toro (B). | 20 |
| Figura 13. Conidios de <i>Fusarium oxysporum</i> formados en fiálides (gefor.com). | 23 |

| | |
|--|----|
| Figura 14. Macroconidios (A) Clamidosporas (B) de <i>Fusarium oxysporum</i> (Ellis, 2011; Garder, 1980)..... | 23 |
| Figura 15. Especies vegetales colectadas A) ciruela, B) nanche y C) guayaba. | 36 |
| Figura 16. Lavado, secado y molido del material vegetal. | 37 |
| Figura 17. Procedimiento para la preparación de los extractos metanólicos..... | 38 |
| Figura 18. Preparación del quitosano. | 38 |
| Figura 19. Tamizado, esterilizado y llenado de macetas con el suelo..... | 39 |
| Figura 20. Colecta de suelo en los municipios de Yautepéc y Anenecuilco. | 40 |
| Figura 21. Preparación del inoculo en PDA y PDB. | 40 |
| Figura 22. Métodos de inoculación de los cormos. | 41 |
| Figura 23. Preparación de los extractos y aplicación de los tratamientos a los cormos. | 42 |
| Figura 24. Cormos visiblemente sanos, no se infectaron con <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>gladioli</i> | 48 |
| Figura 25. Amarillamiento en punta de hojas, síntoma característico de la fusariosis..... | 49 |

Resumen

Fusarium oxysporum f. sp. *gladioli* causa pudrición del cormo y amarillamiento del gladiolo. En México la derrama económica anual en este cultivo asciende a \$800 mdp. El objetivo de este trabajo fue evaluar extractos metanólicos de ciruela, guayaba y nanche en el control de *F. oxysporum* f.sp. *gladioli* en cormos y plantas de gladiolo. Se colectaron hojas de cada especie vegetal, se lavaron, se secaron y se molieron. El polvo vegetal se mezcló con metanol en una proporción 1:5. El extracto se concentró en un rotavapor a 65 °C. Los extractos vegetales se analizaron mediante cromatografía de gases y espectrometría de masas (CG-EM) y se identificaron 42 compuestos, que incluyen monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos y ácidos grasos. Para los experimentos en invernadero, los cormos se inocularon con micelio o solución de esporas y se trataron con los extractos al 2.5 % y 5 %, y se sembraron en macetas con suelo estéril o colectado de campo. En el experimento 1, los cormos tratados con el extracto de nanche y ciruela al 2.5 % mostraron los menores (8.5) y los mayores (14.5) días de emergencia ($P \leq 0.025$). El tratamiento con guayaba al 5 % desarrolló la espiga floral en un 75 % de sus plantas comparado con el control fungicida (33 %) ($P \leq 0.001$). En el experimento 2 los cormos inoculados con solución de esporas y tratados con los extractos emergieron en menos días y tuvieron una menor severidad que los inoculados con micelio ($P \leq 0.001$). En el experimento 3, el tratamiento con nanche 2.5 % (34.4 cm) y con fungicida (35.2 cm) mostraron la mayor altura de la planta respecto a los demás tratamientos ($P \leq 0.001$). El tratamiento con fungicida (2.5) y con ciruela 2.5 % (4.5) mostraron la menor y la mayor severidad. En el experimento 4, los cormos tratados con la combinación guayaba y quitosano mostraron el menor porcentaje de infección (33 %), sembrados en suelo estéril. En general, los cormos sembrados en suelo no estéril emergieron en menos días, mostraron una menor severidad y alcanzaron una mayor altura de la planta que los sembrados en suelo estéril. Los extractos vegetales pueden ser una alternativa al manejo de la fusariosis del gladiolo, ya sea por compuestos individuales o por sinergismo entre compuestos.

Abstract

Fusarium oxysporum f.sp. *gladioli* causes rot corm and yellowing of gladiolus corms. In Mexico, the annual economical production of this crop is up to \$800 mdp. The objective of this work was to evaluate methanolic extracts of red mombin, guava and nance on the control of *F. oxysporum* f.sp. *gladioli* over corms and gladioli plants. Leaves of each species were collected and they were washed, dried and grinded. The botanical powder was mixed with methanol in a proportion of 1:5. The extract was concentrated in a rotary evaporator at 65 °C. The botanical extracts were analyzed through gas chromatography and mass spectrophotometer (CG-EM) and 42 compounds were identified, that included monoterpenes, sesquiterpenes, diterpenes and fatty acids. For the greenhouse experiments, corms were inoculated with mycelia and spore solution and they were treated with the extracts at 2.5 and 5 %. They were planted in pots containing sterile or field collected soil. In experiment 1, corms treated with the nance and red mombin extracts at 2.5 % showed the lowest (8.5) and highest (14.5) emergency days ($P \leq 0.025$). In the treatment with guava at 5%, the flower spike was developed in 75% of the plants compared with the treatments with fungicide (33%) ($P \leq 0.001$). In experiment 2, the inoculated corms with spore solution and treated with extracts, germinated in less days and had less disease severity than the inoculated with mycelia ($P \leq 0.001$). In experiment 3, the treatment with nance at 2.5% (34.4 cm) and with fungicide (35.2 cm) showed the highest height in comparison with the remaining treatments ($P \leq 0.001$). The treatment with fungicide and with red mombin showed the lowest (2%) and highest (4.5) severity. In experiment 4, corms treated with guava and chitosan and planted in sterile soil, showed the lowest diseases incidence (33%). Overall, the planted corms in non-sterile soil germinated in fewer days, had less severity and reached the highest height than the plants in sterile soil. The botanical extract may be an alternative for managing the gladiolus fusariosis, perhaps for individual compounds or synergism of some of them.

1. Introducción

El género *Gladiolus* quizá sea el de mayor complejidad de las iridáceas. En África hay más de 100 especies de gladiolos silvestres. Es especialmente rica la zona de Sudáfrica, su centro de origen (Grey-Wilson y Mathew, 1982; Bòlos y Vigo, 2001). Dos especies son endémicas de Madagascar y 15 se encuentran en países alrededor del mediterráneo. Los híbridos modernos, designados como *Gladiolus grandiflorus* son un complejo de cuando menos 11 especies, varias de las cuales están representados por diferentes formas de colores o variedades botánicas (Larson, 2004). Las variedades con frecuencia incluyen numerosas novedades, gozan de un elevado grado de homogeneidad y son susceptibles de sufrir procesos de preforzado y retardamiento que las hacen florecer en épocas determinadas. El gladiolo es una flor de corte de importancia comercial, responde bien a un manejo postcosecha adecuado. Los estándares modernos en variedad de colores y formas han ayudado a transformar esta flor estereotipada como fúnebre en favorita y puede ser un importante acento en arreglos florales (Reid, 2004).

En México, la producción de gladiolo ocupa el primer lugar entre las flores que se propagan por cormos. Los principales problemas fitosanitarios se deben a daños por enfermedades fungosas que ocasionan graves pérdidas económicas en las zonas productoras (Ortega, 2008). *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli* causa pudrición del cormo y amarillamiento del gladiolo. Las plantas infectadas pierden su vigor, producen tallos de color verde oscuro, se retrasa la floración, las flores son más pequeñas y se desarrollan en un solo lado de la espiga (CESVMOR, 2005). La desinfección con fungicidas químicos es común para el control de *Fusarium* en los cormos en almacenamiento, los cuales contaminan al ambiente,

son ineficientes y económicamente caros. En consecuencia hay una necesidad de trabajar hacia el desarrollo de agentes antifúngicos seguros, renovables, no petroquímicos, amigables con el ecosistema y fáciles de obtener (Sharma y Triphati, 2008).

Los extractos de origen vegetal se caracterizan por la presencia de metabolitos secundarios, que pueden tener actividad biológica como: antialimentarios, antivirales, antimicrobianos, repelentes e inhibidores de la germinación de semillas y tienen la propiedad de ser menos tóxicos y fácilmente degradables (Regnault-Roger *et al.*, 2004).

Garduño *et al.* (2010), evaluaron *in vitro* la actividad fungicida o fungistática de polvos de hojas, extractos acuosos, metanólicos y hexánicos, de quince especies de plantas mexicanas sobre el desarrollo de *Fusarium oxysporum* f.sp. *gladioli*. De ellas, doce especies mostraron actividad antifúngica; con una inhibición del crecimiento micelial mayor al 50%. Por otro lado, el quitosano es un compuesto derivado de la desacetilación de la quitina procedente del exoesqueleto de los crustáceos, que tiene actividad inhibitoria sobre varias especies de hongos (Allan y Hadwiger, 1979) e induce mecanismos de defensa en la planta contra patógenos (Shibuya y Minami, 2001). Las pruebas *in vitro* mostraron que el quitosano afecta la morfología de *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli*; produciendo un micelio escaso y delgado, limitando la formación de estructuras reproductoras (García y Bautista, 2009).

2. Antecedentes

2.1 Importancia económica del gladiolo

El cultivo de flor cortada y de cormos de gladiolo ocupa en Francia más de 600 ha. En los últimos años, en Holanda se dedican 1,756 ha al cultivo de gladiolo lo que coloca a esta flor en cuarto lugar, tras los tulipanes, azucenas y narcisos en dicho país. Debido al desarrollo tecnológico holandés en cuanto a la conservación de los cormos es posible su suministro en cualquier época del año. Este hecho, junto con una alta demanda de esta flor, el precio relativamente bajo del cormo y la corta duración del cultivo, ha fomentado su gran expansión en España, en donde, la superficie destinada a este cultivo se incrementó en un 30 % debido al aumento en las zonas tradicionales y a la expansión de otras nuevas, después del clavel y la rosa, es la flor más cultivada (abcagro.com). A nivel mundial es el bulbo más comercializado tras el tulipán; su gran diversidad en cuanto a color y forma de sus varas florales hace que sean unas de las ornamentales más valoradas (horticom.com).

En México, en el año 2010 la superficie sembrada de gladiolo fue de 3,610.51 ha, con una derrama económica mayor a \$ 700 millones de pesos, colocando al estado de Morelos en tercer lugar, después del Edo. de México y Puebla como principales productores (Cuadro 1). Sin embargo, ésta producción es para consumo nacional y solo un 10 % para exportación (Chalate *et al.*, 2008). En Morelos la superficie sembrada de gladiolo fue de 624 ha, con un valor de la producción mayor a \$ 150 millones de pesos, lo que representa el 28.8 % de la derrama económica producida por dicha flor a nivel nacional, destacan los

municipios de Cuautla, Ayala, Tlayacapan y Yauatepec como principales productores (SAGARPA, 2010) (Cuadro 2).

Cuadro 1. Principales estados productores de gladiolo en México.

| Estado | Superficie sembrada (ha) | Producción (toneladas) | Valor de la producción (millones de pesos) |
|----------------|-------------------------------------|-----------------------------------|---|
| Edo. de México | 1, 060.5 | 1,153,200.5 | 171.772 |
| Puebla | 1005.76 | 1,341,817.4 | 343.210 |
| Morelos | 624 | 668,274 | 154.124 |
| Michoacán | 487.25 | 393,344 | 33.745 |

Fuente (SAGARPA, 2010)

Cuadro 2. Principales municipios productores de gladiolo en el estado de Morelos.

| Municipio | Superficie sembrada (ha) | Producción (toneladas) | Valor de la producción (millones de pesos) |
|------------------|-------------------------------------|-----------------------------------|---|
| Cuautla | 188 | 239,400 | 56.566 |
| Ayala | 100 | 110,010 | 26.504 |
| Tlayacapan | 95 | 91,300 | 19.421 |
| Yuatepec | 93 | 82,400 | 21.720 |

Fuente (SAGARPA, 2010)

2.2 Taxonomía de la planta de gladiolo

De acuerdo a Larson (1988) y la FONEP (1984), la clasificación taxonómica del gladiolo es la siguiente:

| | |
|---------------------|-------------------------------|
| Reino | Plantae |
| Subreino | Embryophyta |
| Phylum | Tracheophyta |
| Subphylum | Angiospermae |
| Clase | Monocotiledoneae |
| Orden | Liliflorae |
| Familia | Iridaceae |
| Género | <i>Gladiolus</i> |
| Especie | <i>Gladiolus grandiflorus</i> |
| Nombre común | <i>Gladiola o gladiolo</i> |

2.3 Descripción botánica

Raíz: Existen dos tipos principales de raíces, las que se encuentran en la base del cormo madre, son fibrosas, y sirven de anclaje y absorción; y las que se desarrollan en la base del cormo nuevo, son gruesas, carnosas y contráctiles. Al final del ciclo del cultivo, todas las raíces son senescentes (Salinger, 1991; Lezeczyńska y Borys, 1994).

Tallo: El gladiolo presenta dos tipos de tallos, el subterráneo modificado llamado cormo, el tallo floral recubierto en la base por las hojas; al momento de cortar la flor, en éste quedan unas tres hojas. Se considera de buena calidad si esta parte del tallo alcanza 70 cm, y en conjunto con la espiga floral, alcanza un total de 95 a 175 cm (Vidalie, 1992). El cormo al ser plantado puede emitir uno o varios tallos, dependiendo de su vigor; en la zona inferior del cormo se desarrolla una corona de raíces que nutrirá progresivamente a la planta según se vayan agotando las reservas del cormo. Cuando la planta está desarrollada se forma un cormo hijo, pegado al cormo madre. Este cormo emite una corona de largas raíces carnosas

situadas en la zona de unión de ambos cormos, que a veces engrosan en su extremidad y forman cormillos pequeños (3-10 mm de diámetro) (Figura 1) (García y Alfaro, 1985).

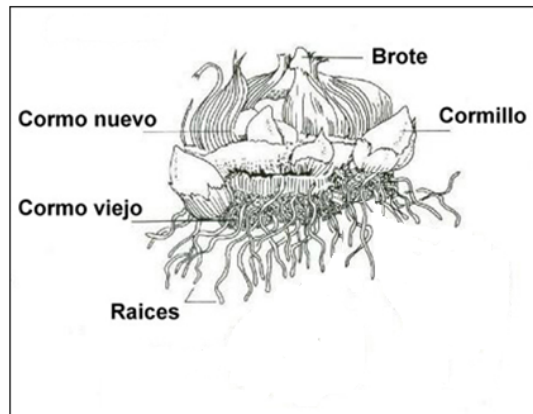


Figura 1. Estructura del cormo de gladiolo (infojardin.com).

Hojas: Es una planta que presenta hojas alargadas, paralelinerves, sobrepuestas en la base y pueden aparecer de 1 a 12. Se desarrollan desde el interior de las vainas foliares y se extienden de 4 a 5 hojas verdaderas después de la emergencia del follaje, además de las flores se quedan adheridas al tallo floral de 3 a 5 hojas (Salinger, 1991).



Figura 2. Hojas de una planta de gladiolo.

Inflorescencia: Es una espiga y se origina como un eje terminal, tubular con partes florales de tres en tres, son bilaterales o radialmente simétricas y pueden llegar a desarrollar hasta 30 flores o más (Figura 3). Las flores pueden ser de cualquier color excepto el azul. Pueden tener formas redondas, triangulares, aplanadas, con capuchón o como orquídeas y los pétalos pueden ser sencillos, rizados, filamentosos, recurvados, puntiagudos o profundamente escarolados. Las flores varían de miniaturas de 2 cm a lo ancho y muy espaciadas, en tallos delgados, sencillos o con muchas ramas, hasta los gigantes de 2 m con flores de 18 cm de diámetro en una disposición de 2 hileras (Larson, 2004).



Figura 3. Distintos colores y formas de las flores del gladiolo (floristeriasierra.com)

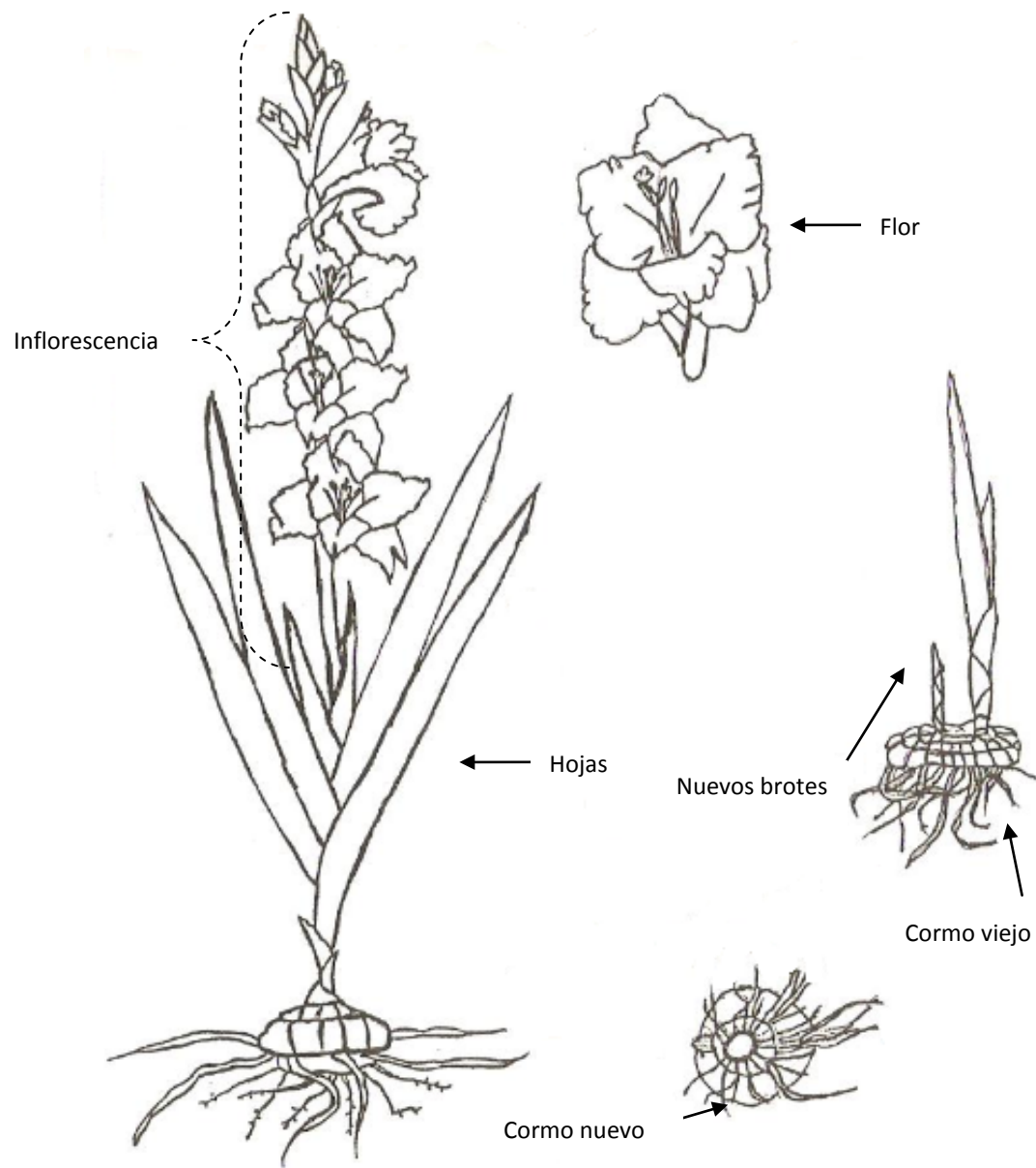


Figura 4. Descripción morfológica de la planta del gladiolo (Cruz, 2005).

2.4 Condiciones del cultivo

2.4.1 Temperatura

La temperatura del suelo durante su plantación debe estar entre 10 y 12 °C. Seis semanas más tarde de 12 a 14 °C y puede ser elevada 18 °C cuando la espiga es visible. La temperatura ambiental debe estar entre 13 y 14 °C y al cabo de 4 a 6 semanas de plantación se puede aplicar calefacción de 15 a 20 °C, sin sobrepasar los 21 ó 22 °C (Anónimo, 2009). La formación del tallo floral tiene lugar desde los 12 °C hasta los 22°C. La diferenciación floral se produce después de la plantación de los cormos, cuando aparece la tercera o cuarta hoja, es decir después de 4 a 8 semanas; esta duración varía en función de la temperatura y no de la luz. La temperatura mínima biológica (cero de vegetación) es de 5 a 6 °C. Las temperaturas superiores a 30°C son perjudiciales, para el almacenaje de los cormos se recomienda de 3 a 4 °C (Anónimo, 2010).

2.4.2 Iluminación

El gladiolo es una planta heliófila (amante del sol). El período crítico es el de iniciación floral, si las deficiencias del luz se dan al inicio del periodo habrá aborto de flores. El gladiolo florece muy bien cuando los días son mayores de 12 h, si ésta es insuficiente, las plantas no florecen, por lo que hay que aportar luz artificial. Un exceso de luminosidad provoca que las varas florales queden firmes, rígidas con muchas flores pero cortas de tallo (Anónimo, 2010).

2.4.3 Humedad

La humedad ambiental deberá estar comprendida entre el 60 y 70 %. Humedades inferiores al 50 % provocan que el crecimiento sea más lento; un exceso de humedad produce alargamiento en la planta y se presentan pudriciones por enfermedades (Anónimo, 2010). La baja humedad en el suelo reduce la floración. Las plantas son muy sensibles a los rocíos y lluvias. El periodo más crítico del gladiolo en cuanto a humedad, es de la tercera a séptima hoja, es decir, durante el desarrollo de la espiga (Buschman, 1985).

2.4.4 Suelo

Los gladiolos toleran una amplia gama de texturas que van desde las arenas hasta las arcillas. Los suelos orgánicos pueden producir espigas florales largas y fuertes, y cormos grandes (Salinger, 1991). El pH deberá estar entre 6.5 y 7, si es menor hay que encalar y utilizar fertilizantes adecuados. En suelos calizos y ácidos se tendrá clorosis. Es importante vigilar el contenido de potasio, pues la planta consume gran cantidad de este nutrimento. Se requiere especial cuidado en el contenido de sales en el suelo, conductividades eléctricas mayores a 4 mmhos/cm son perjudiciales al gladiolo (Anónimo, 2010).

2.4.5 Fertilización

Es un cultivo que no necesita grandes aportaciones de fertilizante, ya que gran parte de sus necesidades las obtiene del cormo. Cuanto más grande sea éste, menores serán sus necesidades de fertilizante (Anónimo, 2009). Los requerimientos nutricionales de los gladiolos varían según la fertilización previa del cormo madre, pero en general un cultivo de gladiolo en suelos arenosos debe tener de 90 a 135 Kg de nitrógeno (abastecido en parte como NO_3 y en parte como NH_3), de 90 a 180 Kg de fósforo (como P_2O_5) y de 110 a 180

Kg de potasio (como K_2O) por hectárea. Los nutrientes secundarios, tales como el Ca, Mg, Fe y B, pueden ser aplicados en forma de pequeños fragmentos como elementos menores durante la preparación del suelo. Se recomienda cuando menos cuatro aplicaciones de fertilizantes: incorporado antes de la plantación (1); aplicación lateral durante la etapa de dos o tres hojas (2); aplicación lateral durante la etapa de los vástagos cuando la inflorescencia emerge de las hojas (3); y aplicación lateral unas dos semanas después de la floración para desarrollar el nuevo cormo y cormillos (4) (Larson, 2004).

2.4.6 Cosecha de las varas florales y de los cormos

Las espigas del gladiolo pueden cosecharse de 60 a 100 días después de la plantación dependiendo del cultivar y época del año. Se debe tener cuidado para no dañar las hojas que quedan en la planta ya que son necesarias para el desarrollo del nuevo cormo (Larson, 2004). Las varas florales se cosechan con los botones florales cerrados cuando se vea el color de los pétalos de la primera flor, hasta que sobresalga un centímetro. La época de corte depende de factores como son clima, fecha de plantación y calibre de los cormos. El rendimiento es de una vara floral por cormo. Una vez cosechadas, se colocan en cámara frigorífica de 4 a 5 °C en agua (Anónimo, 2009). Después los cormos se recolectan y se procede a su limpieza, clasificación y maduración, proceso que de forma natural suele durar unos 3 meses aunque hay ciertas técnicas para acelerar la salida de latencia (García y Alfaro, 1985).

2.4.7 Condiciones de almacenamiento y empaque

Una vez cosechadas las varas florales, deberán ser transportadas al lugar de selección con iluminación e idealmente con cámara de frío. Las varas deben mantenerse en posición vertical para evitar su curvatura. La mejor forma es depositándolas en cubetas de 20 litros bien apretadas para evitar torceduras. Hecha la clasificación de las varas se procede a su empaque que tendrá diversas características según el mercado de destino. En el caso de varas destinadas a consumo local, es usual envolver los paquetes de flores en ramos de 12 varas en papel. El envío a mayores distancias se lleva a cabo en cajas de cartón. Estos deben ser amarrados o y envueltos en papel de seda o papel emparafinado o polietileno y ubicado en cajas con 280 unidades. El almacenaje de los ramos envueltos o embalados para su conservación postcosecha debe hacerse en cámara fría a 2-6 °C, con una humedad relativa de 70 a 80% y en ausencia de luz. El producto podrá mantenerse por un máximo de 2 días en seco, aunque se recomienda mantener los ramos en agua pura o con conservantes postcosecha (Anónimo, 2010). Los cormos se colocan en cámaras frigoríficas para retrasar la brotación a la salida de su latencia natural a una temperatura de 3-4°C con aireación hasta el momento en que se vayan hacer las plantaciones. Para acelerar la salida de latencia, los cormos se almacenan a temperaturas relativas elevadas (García y Alfaro, 1985).

2.5 Descripción general de las enfermedades del gladiolo

El gladiolo es susceptible a una variedad de pudriciones del cormo que son causados por un número de hongos y bacterias. El follaje puede tornarse amarillo y morir prematuramente como resultado del deterioro del cormo (RPD, 1983).

2.5.1 Sarna del gladiolo

Es una enfermedad causada por la bacteria *Pseudomonas marginata* (Figura 5). Es fácilmente reconocida en el cormo, por un contorno definido amarillo pálido, húmedo, con manchas circulares que se tornan de café claro a oscuro. Las lesiones eventualmente llegan a ser superficiales, hundidas y rodeadas por costras definidas como márgenes. Las costras varían en tamaño y son más numerosas en la parte inferior del cormo. Las lesiones secretan un exudado gomoso incoloro que cambia a amarillo pardo o café oscuro. Cuando las plantas afectadas son cultivadas en suelos húmedos pueden desarrollar coloración café oscuro, pudrición del tallo, empezando con manchas suaves y húmedas. Cuando la enfermedad es severa, las plantas débiles pueden colapsar y morir (RPD, 1983).



Figura 5. Daño ocasionado en el cormo por *Pseudomonas marginata*, también llamado sarna del gladiolo (agrolink.com).

2.5.2 Podredumbre por *penicillium*

La podredumbre causada por el hongo *Penicillium gladioli* MacCulloch Et Thom, ataca cormos dañados y heridos en almacenamiento (Figura 6). La pudrición aparece firme, con puntos hundidos de color café rojizo, irregulares en tamaño y forma, algunas veces ligeramente áspera con arrugas concéntricas. A bajas temperaturas, crece sobre las lesiones un abundante moho azul verdoso. Numerosos esclerocios pueden ser encontrados en el

tejido podrido del cormo (RPD, 1983). Parece que existe cierta relación entre la incidencia de la enfermedad y daños en el manejo del bulbo durante la cosecha, cuando la epidermis todavía no se ha endurecido (García y Alfaro, 1985).



Figura 6. Daño causado en el cormo por *Penicillium gladioli* (RPD, 1983).

2.5.3 *Botrytis*

El hongo *Botrytis gladiolorum* Timm., produce varios síntomas sobre el cormo del gladiolo, hundimientos ligeros y redondos, el tallo se torna marrón verdoso a manchas oscuras desarrolladas en la superficie del cormo (Figura 7). Estas lesiones frecuentemente parecen húmedas y varían en tamaño. Ocasionalmente en la parte basal se forman quemaduras color marrón. Uno o más haces vasculares pueden extenderse al área del tallo. El núcleo del cormo puede pudrirse parcial o completamente. Cuando la cubierta del cormo se remueve, éste se torna duro como una piedra y se momifica. Cuando los cormos infectados se plantan, algunos se pudren en el suelo. El hongo comúnmente produce manchas en las hojas y flores, pudrición del tallo y de las hojas basales. Los tejidos infectados pueden ser cubiertos con masas grises de esporas de *Botrytis* (RPD, 1983).



Figura 7. Daños causados por *Botrytis gladiolorum* en cormo(A) y hoja (B) (Bergman, 1995).

2.5.4 *Curvularia*

El hongo *Curvularia trifolii* (Kauffm.) Boedijn f. sp. *gladioli* Parmelee et Lutrell ataca sobre la cubierta del bulbo, observándose manchas y rayas alargadas cuyo color va del marrón claro al oscuro, manchas que corresponden a lesiones de forma irregular y de color negruzco en la superficie del bulbo, que a veces penetran al interior (Figura 8). Las yemas, sobre todo las de la parte baja del bulbo, suelen aparecer definidas por una mancha oscura. Durante el almacenaje estas manchas continúan desarrollándose y los tejidos enfermos se endurecen con la característica de que suelen llegar a separarse de los tejidos sanos, lo que hace que sólo en muy raras ocasiones, los bulbos se necrosen totalmente (García y Alfaro, 1985).



Figura 8. Daños en hoja de gladiolo causado por el hongo *Curvularia trifolii* (prevalentfungi.org).

2.5.5 *Stromatinia*

Otro hongo de importancia es *Stromatinia gladioli* (Drayt.) Whetz. Al principio sobre los bulbos aparecen manchas hundidas de color marrón rojizo, después evolucionan a negro, sobre todo, en la zona de inserción de la cubierta (Figura 9). Sobre estas manchas pueden verse los esclerocios color negro. La zona afectada parece limitada a la epidermis, con ataques intensos el hongo se momifica (García y Alfaro, 1985).



Figura 9. Daño causado en cormos por el hongo *Stromatinia gladioli* (infojardin.com).

2.5.6 Roya del gladiolo

La roya del gladiolo es causada por el hongo *Uromyces transversalis* que se manifiestan en el cultivo, después de la producción de las uredias, las teliosporas son producidas como pequeñas pústulas negras alrededor de las uredias (Figura 10). El primer síntoma de esta enfermedad son pequeños puntos amarillentos y después el rompimiento de las paredes de la hoja, formando pústulas de 1 mm por 1 cm. Las pústulas están llenas de esporas de color amarillo-naranja y se fusionan para formar lesiones grandes. Cuando el daño incrementa, las lesiones se tornan de café-oscuro a negro. La diseminación de la enfermedad se da a partir de cormos y flores contaminadas con esporas de la roya, así como las hojas y tallos infectados. Las esporas pueden ser transportadas a grandes distancias por el viento y por la movilización de la flor para su comercialización (SAGARPA, 2004).

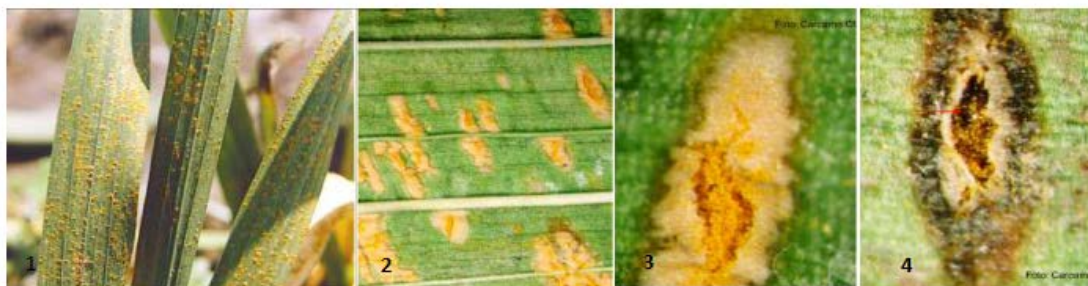


Figura 10. Síntomas causados por el hongo *Uromyces transversalis*, manchas pequeñas y amarillentas (1); protuberancias de color amarillas-anaranjadas (2 y 3); conforme avanza el daño las lesiones se tornan color café oscuro a negro (4) (SAGARPA, 2004).

2.6 Pudrición café, marchitez o fusariosis del gladiolo

Es el complejo de enfermedad que provoca la podredumbre seca de bulbos en almacén y el amarillamiento y marchitez de la planta en campo, debidas al hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli* y que constituye el gran problema de este cultivo incidiendo en todas sus fases: pérdidas de bulbo para material de siembra, fallos en la producción de flor, muerte de plantas, podredumbre en almacén, etc. (García y Alfaro, 1985). Es la enfermedad más seria y común del gladiolo, Los cormos pueden pudrirse antes de cosecharse, en almacén, o después de plantarse (RPD, 1983). En algunos casos no se observan síntomas sobre el suelo, pero cuando el cormo se cosecha puede aparecer podrido, o parecer saludable pero la pudrición se desarrolla en almacén (Heimann y Worf, 1997). Se pueden distinguir dos tipos de síntomas: primarios, sobre el bulbo, que se pueden dar en campo o almacén y secundarios, sobre el follaje y por lo tanto, solo aparentes en campo (García y Alfaro, 1985).

2.6.1 Síntomas en cormo

Pudrición vascular: Se desarrolla ocasionalmente, puede o no haber síntomas externos, (algunas veces se desarrollan manchas cafés en la superficie del cormo) pero cuando el cormo se corta a la mitad se observa el centro oscuro, extendiéndose desde la base a la parte superior (Heimann y Worf, 1997).

Podredumbre marrón: Aparece en cualquier lugar del bulbo pero principalmente cerca de la base, en la zona central del cormo (Figura 11). Aparecen lesiones color café o negro, el tejido podrido es muy espeso y puede extenderse por completo.

Podredumbre basal seca: Sólo se da en la base del cormo alrededor de la zona de las raíces y el tejido afectado es muy delgado, tomando una coloración marrón claro, que después evoluciona al marrón oscuro, con una textura escamosa cuando el cormo se seca. El área afectada queda deprimida, existiendo una clara línea de separación entre las partes sana y enferma. Posteriormente las raíces se necrosan cesando la emisión de las raíces nuevas. Raramente la enfermedad se extiende más de 2 ó 4 mm hacia el centro del cormo. Cuando los cormos infectados se siembran, los más enfermos se pudren en el suelo sin emerger, o producen plantas débiles, raquíticas y con amarilleo en las hojas que rápidamente mueren (RPD, 1983; García y Alfaro, 1985).

Cormos momificados: Cuando la enfermedad está muy avanzada se observan cormos momificados procedentes de almacén, los cuales presentan un micelio blanco recubriéndolos y una textura esponjosa y dura (García y Alfaro, 1985) (Figura 11).



Figura 11. Pudrición y momificación de cormos de gladiolo causado por *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli* (Martínez, 2010).

2.6.2 Síntomas en follaje

El amarillamiento suele presentarse por los cormos afectados por podredumbre basal seca, en estos cormos al verse afectada la zona de las raíces, no se produce emisión de estas, por lo que el desarrollo foliar solo se lleva a cabo a expensas de las reservas del cormo. Las hojas comienzan a amarillear por su extremidad, hasta acabar secándose (Figura 12).

Las *hojas en asta de toro* se observan en plantas que en sus primeros estadios de su desarrollo se curvan tomando el aspecto de cuerno con que se designa a la enfermedad (Figura 12). Las plantas afectadas destacan claramente del resto por su forma y su tamaño que queda raquítico; no suelen producir vara floral (García & Alfaro, 1985).

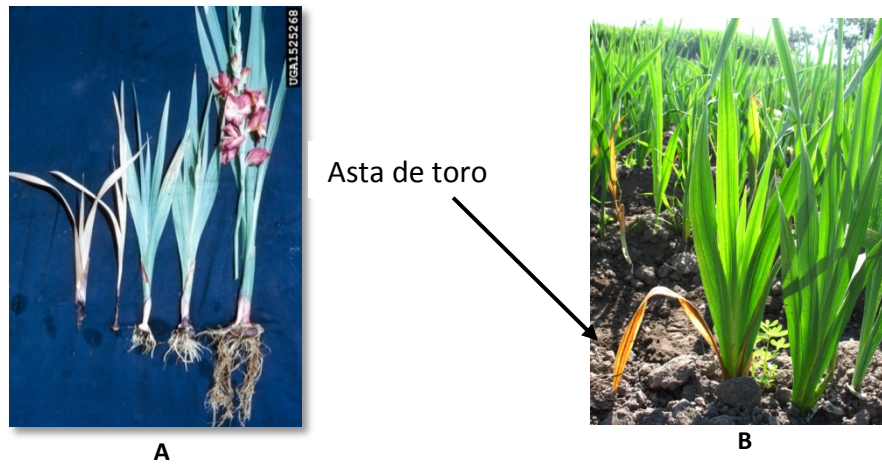


Figura 12. Sintomatología en plantas de gladiolo (A) y síntoma característico: asta de toro (B).

2.7 *Fusarium oxysporum*

Massey (1922), describió por primera vez, una enfermedad del bulbo del gladiolo en conservación causada por un hongo del género *Fusarium* y que posteriormente en 1926 clasificó como *F. oxysporum* Schl. emend var. *gladioli*. Mc Culloch (1944), al describir la forma vascular lo consideró diferente al anterior, clasificándolo como *F. orthoceras* App. et Wr. var. *gladioli*. Durante los años sucesivos se mantuvo una considerable confusión, hasta que Forsberg (1955), dio el paso final, para establecer que las varias formas de enfermedad eran producidas por el mismo agente causal. Por lo que propuso que todas las formas de *Fusarium oxysporum* que causan afección al gladiolo debían ser incluidas sin matización bajo el nombre de *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli* (Mas.) Snyder et Hansen, denominación que se ha mantenido (García y Alfaro, 1985).

Fusarium oxysporum es un hongo cosmopolita que existe en muchas formas patogénicas, parasitando más de 100 especies de plantas gracias a los diversos mecanismos que tiene el

hongo para vencer las defensas de las plantas (Bosland, 1988). Es un hongo de suelo que incluye especies patógenas y no patógenas. Las especies patógenas son mejor conocidas por causar enfermedades de marchitez en cultivos de importancia económica (Groenewald, 2006).

Fusarium oxysporum se presenta como saprófito en el suelo, o también como patógeno especializado, denominado *forma especial*, según la planta hospedante u hospedantes relacionados que afecte (Garcés *et al.*, 2001). El taxón forma especial corresponden a cepas cuyas características morfológicas y de cultivo son indistinguibles, pero muestran diferentes propiedades fisiológicas en su habilidad para parasitar un hospedante específico (Booth, 1975). Por lo cual, aislamientos con el mismo rango de hospedantes, se asignan a una forma especial. Se han reportado más de 70 formas especiales del patógeno (Kistler, 1997).

Las formas especiales de *Fusarium oxysporum* se subdividen en razas fisiológicas, con base en su especificidad patogénica sobre determinadas variedades de una misma especie de planta, razón por la cual las pruebas de patogenicidad y las características de virulencia de los aislamientos del hongo son el principal criterio para diferenciar las formas especiales de *Fusarium oxysporum* y sus razas fisiológicas (Bosland, 1988).

2.7.1 Morfología de *Fusarium oxysporum*

La morfología de las colonias es muy variable y puede presentar dos tipos: una de tipo micelial caracterizado por la producción de abundante micelio aéreo, algodonosa, con una coloración variable, de blanco a rosado durazno, pero usualmente con un tinte púrpura o violeta más intenso en la superficie del agar y pocos microconidios y una de tipo pionotal con la formación de poco o ningún micelio aéreo y abundantes microconidios (Booth, 1970).

El hongo produce tres clases de esporas asexuales: microconidios, macroconidios y clamidosporas (Nelson *et al.*, 1983). Los conidios son producidos en monofialides y en esporodoquios, y están dispersos libremente sobre la superficie del micelio (Griffin, 1994) (Figura 13).

Microconidios: Esporas generalmente sin septos, ovales, elípticos o en forma de riñón (Leslie y Summerell, 2006). Se forman sobre fiálides laterales, cortas, simples o sobre conidióforos poco ramificados. Los microconidios tienen de 5-12 μm de largo por 2.5-3.5 μm de ancho (Nelson, 1981) (Figura 13).

Macroconidios: Esporas de paredes delgadas, fusiformes, largas, moderadamente curvadas en forma de hoz, con varias células y de 3 a 5 septos transversales, con la célula basal elongada y la célula apical atenuada; tienen un tamaño de 27-46 μm de largo por 3-4.5 μm de ancho (Nelson, 1981) (Figura 14). Son producidos abundantemente y germinan rápidamente, haciendo la reproducción del hongo eficiente (Schippers y van Eck, 1981).

Clamidosporas: Esporas formadas a partir de la condensación del contenido de las hifas y de los conidios, de paredes gruesas (Figura 14). Se forman simples o en pares, terminales o intercalares; poseen un tamaño de 5-15 μm de diámetro (Nelson, 1981). Gracias a ellas el hongo sobrevive en condiciones ambientales desfavorables y en el suelo como saprofita de vida libre en ausencia de plantas hospederas (Garret, 1977).

Hasta el momento no se conoce la fase perfecta del hongo (Leslie y Summerell, 2006).

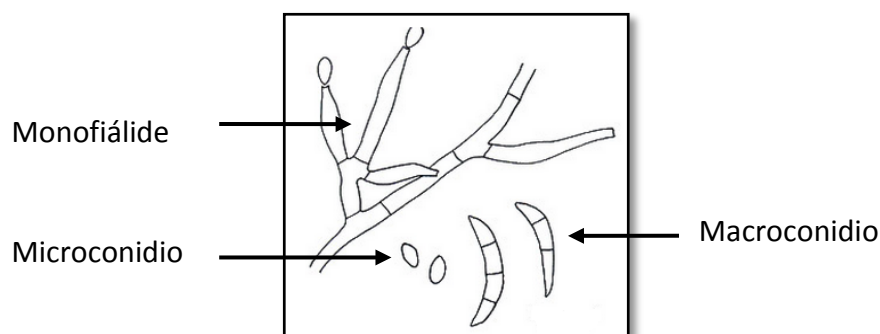


Figura 13. Conidios de *Fusarium oxysporum* formados en fiálides (gefor.com).



Figura 14. Macroconidios (A) Clamidosporas (B) de *Fusarium oxysporum* (Ellis, 2011; Garder, 1980).

2.8 Manejo de la enfermedad

El manejo de la marchitez por *fusarium* se alcanza principalmente a través de la fumigación del suelo y cultivares resistentes, éste último se considera el método de control más seguro, sin embargo, está limitado a su costo y a su disponibilidad (Fravel *et al*, 2003). En caso que no haya un tratamiento para la fusariosis la enfermedad se maneja previniendo la introducción del patógeno, la destrucción de plantas enfermas y el aislamiento de plantas susceptibles de sitios infectados (Simone y Cashion, 1996).

2.8.1 Labores culturales

Un elemento importante para evitar enfermedades es tener en cuenta la preparación física del suelo, la nutrición y una buena planificación de los cultivos (Millán, 2008). Para el caso de la fusariosis se recomienda la rotación de cultivos durante cinco años o más, secado rápido de los cormos, encalado de los suelos (Anónimo, 2010). Abadie *et al.* (1998), evaluaron el nivel de supresividad de *fusarium*, causante de la marchitez de la palma de aceite, en relación al cultivo de una leguminosa usada como cubierta vegetal (*Pueraria javanica*). Este cultivo resultó en un incremento significativo en la cantidad de supresividad. Esto se correlacionó con un incremento en la densidad de población de *Fusarium* spp. y *F. oxysporum*. Los cambios en las densidades poblacionales de *F. oxysporum* no se asociaron con algún cambio en la estructura de estas poblaciones. Así mismo, los grados incrementados en la supresividad del suelo inducida por el cultivo de esta cubierta vegetal podría ser atribuido a los cambios cuantitativos y no cualitativos afectando la población de *F. oxysporum*. Los suelos supresivos a la marchitez por *fusarium* han sido atribuidos a la influencia de las características fisicoquímicas del suelo (Amir y Alabouvette, 1993; Hôper

y Alabouvette, 1996) a la microflora (Scher y Baker, 1980) o ambas (Cook y Baker, 1983). Entre los microorganismos de suelo las poblaciones de *F. oxysporum* no patogénicos están particularmente implicados en la supresividad del suelo a la marchitez de *fusarium* (Rouxel *et al.*, 1979). Riaz *et al.* (2009a), evaluaron el efecto del co-cultivo y la rotación de cultivos sobre el crecimiento y la pudrición del cormo del gladiolo (cultivar Aarti). En un experimento en campo, el gladiolo se co-cultivo con otros 10 cultivos. Destacando las especies vegetales girasol (*Helianthus annuus*) y cempasúchil (*Tagetes erectus* L.), al reducir la incidencia de la enfermedad significativamente más que las otras especies. En un segundo experimento, las especies vegetales se sembraron en rotación con el gladiolo, estas especies se cosecharon y posteriormente, el suelo se inoculó con *F. oxysporum* f. sp. *gladioli* y una semana después se cultivó gladiolo. La alta supresión de la incidencia de la enfermedad fue registrada con cempasúchil (53 %) seguida por la col china (*Brassica campestris*) (49 %). Por lo que sugieren que la pudrición del cormo puede ser manejado co-cultivando el gladiolo con los cultivos girasol y cempasúchil o el cultivo de cempasúchil y col china en rotación.

2.8.2 Control químico

Los fungicidas que presentan mayor efectividad contra esta enfermedad son Benomilo, Captán y Tiabendazol, pero su uso constante y repetido ha causado resistencia, ante esta situación se utilizan nuevos químicos como Procloraz y cobre sistémico (CESVMOR, 2005). Los fungicidas como el Benlate, solo abaten temporalmente la población, ya sea porque muchas esporas sean capaces de evadir la acción fungicida, o porque los mismos fungicidas que pueden actuar como agentes mutagénicos, dan como resultado que las

esporas adquieran resistencia (Romero, 1994). Para el control de la fusariosis se recomiendan tratamientos preventivos con Procloraz, presentados como polvos de Tiram, Procimidone, etc. (Anónimo, 2010).

Chung *et al.* (2009) evaluó *in vitro* la sensibilidad de seis aislados de *F. oxysporum* f. sp. *gladioli* al benomilo, al metil tiofanato, carbendazim y tiabendazol. Uno fue altamente resistente, cuatro fueron moderadamente resistentes y uno altamente sensible al benomilo. Cinco fueron altamente resistentes al metil tiofanato, cuatro fueron sensibles y uno altamente sensible al carbendazim y los seis aislados fueron sensibles al tiabendazol. Ram *et al.* (2004) evaluó soluciones fungicidas para controlar la fusariosis en cormos de gladiolo. El benomilo dio los mejores resultados seguido del captan y el carbendazim. Para mejorar los resultados, los autores disminuyeron el pH de las solución fungicida de Benomilo 2 % + Captan 2 % con ácido acético, ácido ascórbico y ethephon. La disminución del pH de la solución fungicida usando los tres químicos redujo significativamente la incidencia de la enfermedad, también mostraron efectos benéficos sobre la floración, producción de cormos y cormillos.

2.8.3 Control térmico

Magie (1968), evaluó el efecto de cormos no curados en almacenamiento sobre la producción de flores, nuevos cormos y control de *F. oxysporum* f. sp. *gladioli*, en una variedad resistente y una susceptible. Parte de los cormos se limpiaron y se trataron químicamente después de la cosecha y se pusieron inmediatamente en almacenamiento, otra parte de los cormos se curaron por una semana a 32 °C. En el caso de la variedad resistente, la producción de flores y cormos no se afectó por el curado de los cormos, sin

embargo, en la variedad susceptible el curado, produjo más flores y cormos de mayor tamaño. El mejor control para la enfermedad y mayor producción se obtuvo limpiando y tratando los cormos después de ser cosechados o por el curado de los cormos a 32 °C por una semana seguido del limpiado y tratado de los mismos.

Vigodsky (1970), comprobó que al sumergir los cormos a una temperatura de 57 °C por 30 min se redujo la incidencia de *F. oxysporum* f. sp. *gladioli*. Realizó un experimento para conocer la tolerancia de los cormos al agua caliente, los cuales almacenó a 35 °C durante un mes, posteriormente los sumergió en agua a 57 °C. Utilizó dos variedades, en la primera variedad (Spic y Span) se disminuyó el porcentaje de emergencia de la planta, la floración y la obtención de cormillos. A diferencia de la segunda (Valeria) en el que el porcentaje de emergencia y la obtención de cormillos aumento respecto al testigo.

2.8.4 Control biológico

Magie (1980), inoculó cormos de gladiolo con ciertos aislados de *F. moniliforme* “Subglutinans” Snyd. & Hans. y *F. solani*, protegiéndolos de la infección por *F. oxysporum* f. sp. *gladioli*. Los resultados indicaron que los programas de control de *Fusarium* podrían considerar las condiciones del suelo y la inoculación de los cormos con antagonistas como un control biológico. La protección de propágulos libres de patógenos por inoculación de no patógenos podría ser importante en controlar patógenos de suelo sobre poblaciones propagadas clonalmente. El control biológico e integrado de *F. oxysporum* con *Trichoderma virens* Miller, Giddens & Foster, carboxina y la combinación de ambos, redujeron significativamente la incidencia de la enfermedad en condiciones de campo e invernadero (Mishra *et al.*, 2000). Forsyth *et al.* (2006), obtuvieron aislados de *F.*

oxysporum de raíces de banana, estos aislados se caracterizaron genéticamente y se compararon con un aislado de *F. oxysporum* previamente identificado como capaz de suprimir la marchitez de banano por *Fusarium* en invernadero. Se utilizaron tres aislados adicionales (BRIP 29089, 29093 y 45952) para evaluar la supresión de la marchitez causada por *F. oxysporum* f. sp. *cubense* en dos cultivares. El aislado BRIP 29089 se identificó como un organismo potencial de biocontrol, ya que los cultivares Cavendish y Lady Finger desarrollaron decoloración vascular del cormo menor a 30 % en 25 % y 20 % de sus plantas respectivamente. Sin embargo el aislado BRIP 45952 incrementó la severidad de la enfermedad en el cultivar Cavendish, pues se observó que el 50 % de las plantas mostraron un decoloración vascular del cormo mayor a 30 %. Fernández y Suárez (2009) evaluaron *in vitro* la capacidad antagónica de seis aislamientos de *Trichoderma harzianum* Rifai sobre *F. oxysporum* Schlecht. sp. *passiflorae* causante de la marchitez del maracuyá. Todos los aislamientos de *T. harzianum* superaron en crecimiento a *F. oxysporum*, en cultivo dual. Shanmugam *et al.* (2011), evaluaron una formulación a base de talco con una mezcla de rizobacterias promotoras del crecimiento (PGPR), inhibidoras del crecimiento de *F. oxysporum* f. sp. *gladioli*. Las cepas que utilizaron fueron S2BC-2 (*Bacillus atrophaeus*) y (*Burkholderia cepacia*). Los cormos se sumergieron en una solución de la formulación de talco (20 g L⁻¹) por 12 h y se secaron a temperatura ambiente por 30 min y sembrados. Después de 45 días de la siembra se inoculó *F. oxysporum* f. sp. *gladioli* crecido en harina de maíz. La formulación de talco se incorporó al suelo 75 días después de la siembra y posteriormente en intervalos de 15 días. Los experimentos en invernadero y campo mostraron una máxima producción de la espiga floral (100 y 58.3 %, respectivamente) y cormos (150 y 27.4 %). Se observó una reducción de la marchitez

vascular (73.6 y 48.6 %) e incidencia de pudrición del cormo (54.8 y 46.1 %), respecto a los controles. Los autores atribuyen la reducción de la incidencia de la enfermedad a la inducción de productos de defensa tales como quitinasa, β -glucanasa, peróxidasa y polifenol oxidasa.

2.8.5 Tratamientos combinados

Sharma y Tripathi (2008), evaluaron *in vitro* e *in vivo*, agua caliente, UV-C y aceite esencial de la planta de Chan (*Hyptis suaveolens*) solos y combinados, sobre el control de *F. oxysporum* f.sp. *gladioli*. En el experimento *in vitro*, se observó que el tratamiento con agua caliente a 55 °C por 25 min ó el tratamiento con UV-C a una dosis de 3.63 KJ m⁻², fueron suficientes para inhibir la germinación de los conidios. El tratamiento del aceite esencial a una dosis de 0.6 μ L cm⁻³ inhibió completamente el crecimiento del hongo, y una dosis de 0.4 μ L cm⁻³ la germinación de los conidios. En el experimento *in vivo*, los cormos de la variedad “Friendship Pink” se inocularon con una solución de esporas (10⁶ esporas mL⁻¹). Cada tratamiento se aplicó, solo y combinado, y almacenado de 4 a 12 semanas. El tratamiento con agua caliente a 55 °C por 30 min, redujo significativamente las CFU comparadas con el control. El tratamiento con UV-C a una dosis de 4.98 KJ m⁻² fue suficiente para reducir la población del hongo. El tratamiento con aceite esencial a 0.8 μ L cm⁻³ fue efectivo en la reducción del patógeno en cormos de 2 semanas de almacenamiento. El tratamiento integrado con agua caliente (55 °C/30 min), UV-C (4.98 KJ m⁻²) y aceite esencial de *H. suaveolens* (0.8 μ L cm⁻³) por dos semanas fue más prometedor que los tratamientos solos, después de 4 y 12 semanas. Lira *et al.* (2006) evaluaron *in vitro* la actividad antifúngica de extracto de resina hidrosoluble de

gobernadora (*Larrea tridentata*) y soluciones de quitosano, solos y combinados contra *B. cinerea*, *Colletotrichum coccodes* y *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Que se aislaron de rosas de invernaderos y de lotes comerciales de papa y tomate, respectivamente. Ambos bioproductos manifestaron su efecto fungicida a 1,000 y 2,000 $\mu\text{L L}^{-1}$, sin embargo, cuando se combinaron mostraron una actividad fungicida sinérgica.

2.8.6 Aceites esenciales

Barrera y García (2008) evaluaron *in vitro* el efecto antifúngico de aceites esenciales y sus compuestos en la inhibición de *Fusarium* sp., aislado de papaya (*Carica papaya*). Durante ocho días de incubación se midió el diámetro de la colonia y se determinó la tasa de crecimiento micelial. El mejor efecto antifúngico se observó con el aceite de tomillo (*Thymus vulgaris*), el cual presentó una total inhibición a 200, 250 y 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Con los aceites de canela (*Cinnamomum zeylanicum*), clavo (*Syzygium aromaticum*) y epazote (*Chenopodium ambrosioides*), hubo una inhibición del crecimiento micelial de éste microorganismo la cual fue dependiente de la dosis al incrementarla de 100 a 300 $\mu\text{g/mL}$. Todos los compuestos con excepción del cineol tuvieron un efecto fungicida o fungistático. Barrera *et al.* (2009) investigaron *in vitro* el efecto antifúngico de aceites esenciales y sus compuestos sobre la inhibición del crecimiento micelial de *F. oxysporum* f.sp. *gladioli*. En general, se observó un efecto antifúngico significativo con canela, tomillo y clavo, los cuales mostraron una total inhibición del crecimiento micelial del hongo a una concentración de 100, 150, 200, 250 y 300 ppm. Los aceites de epazote, menta (*Mentha piperita*) y mandarina (*Citrus aurantifolia*), mostraron una inhibición del crecimiento micelial dependiente de la dosis al incrementarla de 100 a 300 $\mu\text{g/mL}$.

2.8.7 Extractos vegetales

Existen plantas que no son atacadas por enfermedades ni plagas y muchas de ellas pueden ser utilizadas como repelentes o en aplicaciones de macerados (Millan, 2008).

Riaz *et al.* (2008), evaluaron *in vitro* el efecto antifúngico de extractos de trigo (*Triticum aestivum*), maíz (*Zea mays*), girasol (*Helianthus annuus*), chile (*Capsicum annum*), cebolla (*Allium cepa*) y cempasúchil (*Tagetes erectus*) sobre el crecimiento de *F. oxysporum* f.sp. *gladioli* a diferentes concentraciones (2, 4, 6 y 8 %). Los extractos de cempasúchil, girasol y chile fueron altamente efectivos en la reducción de la biomasa fúngica en 54-79 %, 33-85 % y 45-57 % respectivamente. La concentración más alta del extracto de cebolla suprimió la biomasa fúngica en un 73 %. Garduño *et al.* (2009) evaluaron *in vitro* la actividad fungicida o fungistática de polvos de hojas (20 mg mL⁻¹) y extractos acuosos, metanólicos y hexánicos (5 %) de quince especies de plantas mexicanas sobre el desarrollo de *F. oxysporum* f.sp. *gladioli* en medio agar papa dextrosa (PDA). Doce especies de plantas mostraron actividad antifúngica. El extracto hexánico de epazote (*Chenopodium ambrosioides*), el extracto metanólico de ciruela mexicana (*Spondias purpurea*) y guayaba (*Psidium guajava*), así como el extracto acuoso de guaje (*Leucaena esculenta*) y cuahulote (*Guazuma ulmifolia*) inhibieron el crecimiento micelial mayor a 50 %. Sin embargo, el 80 % de los polvos de plantas incremento la velocidad de crecimiento micelial del hongo. Por lo que se concluyó, que la diversidad química de las plantas analizadas, afectaron de forma diferente el desarrollo del hongo, quizá por compuestos individuales o por sinergismo de alguno de ellos. Riaz *et al.* (2009), evaluaron *in vivo* seis especies de plantas, nim (*Azadirachta indica*), alstonia (*Alstonia scholaris*), jena (*Lawsonia alba*), cebolla (*Allium*

cepa), ajo (*A. sativum*), jengibre (*Zingiber officinale*) y un fungicida sistémico (carbendazim) para el manejo de la pudrición del cormo del gladiolo. Cormos sanos se sumergieron en los extractos acuosos a 5, 10, 15 y 20 g 100 mL⁻¹ por 30 min de las seis especies de plantas, posteriormente se sembraron en macetas. La dosis recomendada del fungicida químico redujo significativamente la incidencia de la enfermedad en un 13 % y el número de lesiones a 6 por cormo comparado con el control (54 lesiones). Los extractos acuosos cebolla, ajo y el extracto de jengibre mostraron el mejor manejo de la enfermedad que la dosis recomendada de carbendazim. También, los extractos vegetales y el fungicida potenciaron el crecimiento del follaje de la planta comparado con el control. Riaz *et al.* (2010), realizaron dos experimentos para investigar el potencial de diferentes plantas alelopáticas para el manejo de la pudrición del cormo del gladiolo causado por *F. oxysporum* f. sp. *gladioli*. En el primer experimento, se utilizaron hojas de eucalipto (*Eucalyptus citriodora*), jambul (*Syzygium cumini*), mastuerzo (*Coronopus didymus*), cenizo (*Chenopodium álbum*), cebollín (*Cyperus rotundus*), las cuales se incorporaron al suelo a 2, 4 y 6 g 100 g⁻¹ de suelo. En el segundo experimento las hojas de nim, alstonia, falsa altamisa (*Parthenium hysterophorus*), caángay (*Ageratum conyzoides*) y cebolla, se esparcieron sobre la superficie del suelo a una concentración de 4 g 100 g⁻¹ de suelo. Obteniendo que ambos tratamientos redujeron significativamente la incidencia de la enfermedad y el número de lesiones sobre los cormos. Todos los tratamientos redujeron significativamente la incidencia de la enfermedad y el número de lesiones por cormo. La incorporación de cebollín en las dosis 2 y 4 % potenciaron significativamente la biomasa del follaje. Todos los tratamientos del segundo experimento, potenciaron significativamente la altura y la biomasa de la planta.

2.8.8 Quitosano

El quitosano es un biopolímero derivado de la quitina el cual es muy similar a la celulosa. Este polisacárido catiónico de alto peso molecular que se produce en las paredes celulares de los hongos y en el exoesqueleto de artrópodos, ha sido considerado como una alternativa válida para los fungicidas sintéticos (Romanazzi *et al.*, 2003). Tiene una comprobada actividad fungicida, y una posible explicación se relaciona con alteraciones morfológicas y citológicas. García y Bautista (2009) observaron que el quitosano e isotiocianato de fenilo, tuvieron un efecto fungicida sobre el hongo *F. oxysporum* f. sp. *gladioli*. Este microorganismo incubado en medio PDA y quitosano de bajo peso molecular en concentraciones de 0.5 hasta 2.0 mg mL⁻¹, redujo su crecimiento micelial hasta su total inhibición. Así mismo, el hongo incubado en medios de cultivo PDA y V8 con discos de isotiocianatos de fenilo, a concentraciones de 0.5 y 0.1 mg mL⁻¹, tuvo una inhibición micelial mayor del 65%. García (2010) observó por microscopía electrónica de barrido el efecto del quitosano y del isotiocianato de fenilo en la morfología de *F. oxysporum* f. sp. *gladioli*. Cuando el hongo se trató con el quitosano y el isotiocianato de fenilo, el micelio fue escaso y muy delgado y en ambos casos, la formación de sus estructuras reproductoras fue casi nula, en comparación con el testigo donde el micelio se desarrolló en forma densa, con apariencia gruesa, dando lugar a estructuras características del hongo como los conidióforos.

3. Justificación

El cultivo de gladiolo es de gran importancia económica ya que del total de la superficie destinada al cultivo de flores, el 25 % es utilizada para el cultivo de gladiolo. El estado de Morelos es de los principales productores de esta flor, aproximadamente 90 familias dependen económicamente del cultivo, genera empleo a jornaleros agrícolas (40 jornales/ha), a transportistas y comerciantes. El valor de la producción se estima en más de \$ 150 millones de pesos. La pudrición café del gladiolo es el principal problema de este cultivo, ocasiona daños del 40 al 60 % en cormos en almacenamiento y en campo las plantas producen flores de mala calidad, lo que demerita su valor comercial, en casos severos la planta muere, lo que provoca graves pérdidas económicas entre los productores de dicha flor. El uso de fungicidas químicos es cada vez más ineficiente y la enfermedad es más difícil de combatir. Su uso irracional ha generado desequilibrios ecológicos y la resistencia del patógeno. Se demostró que el extracto metanólico de ciruela mexicana, guayaba y nanche y el quitosano tienen actividad fungicida *in vitro* contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli*. Por tal motivo, dichos productos naturales representan una alternativa para el manejo de la enfermedad en cormos y plantas de gladiolo bajo condiciones controladas y evaluar su efecto antifúngico *in vivo*.

4. Objetivo general

Evaluar la actividad antifúngica de extractos vegetales y del quitosano sobre el desarrollo de *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli* en cormos y plantas de gladiolo cultivadas en invernadero.

4.1 Objetivos específicos

- Evaluar el efecto de extractos metanólicos de ciruela mexicana (*Spondias purpurea*), guayaba (*Psidium guajava*) y nanche (*Byrsonimia crassifolia*) al 2.5 y 5% sobre el desarrollo de *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli* en cormos y plantas de gladiolo cultivadas en diferentes suelos, inoculados con solución de esporas y micelio en condiciones de invernadero.
- Evaluar el efecto de la aplicación de quitosano (1.5 mg mL^{-1}) sobre el desarrollo de *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli* en cormos y plantas de gladiolo cultivadas en invernadero.
- Evaluar el efecto del extracto con los mejores resultados en combinación con el quitosano sobre el desarrollo de *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli* en cormos inoculados con micelio, cultivadas en suelo estéril y no estéril en condiciones de invernadero.
- Realizar el análisis fitoquímico de los extractos vegetales e identificar los compuestos con posible actividad fungicida.

5. Materiales y métodos

5.1 Obtención de los extractos vegetales

Colecta del material vegetal: El material vegetal se colectó en el municipio de Yautepec Morelos. Las hojas de nanche se colectaron de un huerto familiar en la colonia Jacarandas (Chile Verde), las de ciruela de árboles empleados como cercos vivos en una parcela de la colonia Atlihuayan y las de guayaba de árboles del Centro de Desarrollo de Productos Bióticos (Figura 15). Las hojas de cada especie que se eligieron fueron las que mostraron apariencia saludable, sin daño mecánico o síntomas de enfermedad. Aproximadamente 30 kg de cada especie vegetal se colectaron para obtener 3 kg de peso seco.

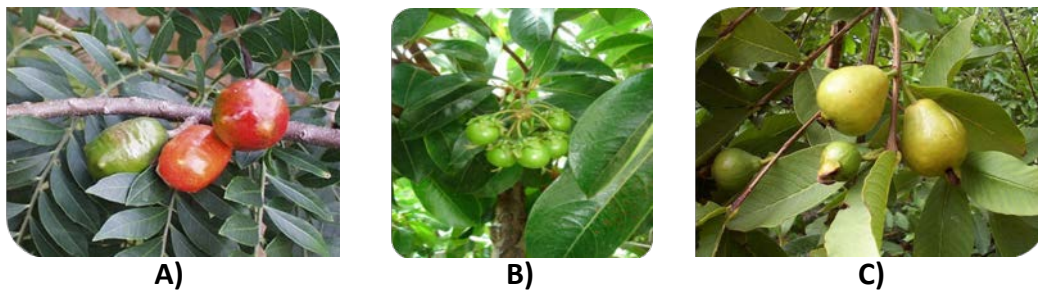


Figura 15. Especies vegetales colectadas A) ciruela, B) nanche y C) guayaba.

Preparación del polvo vegetal: Para la obtención de los polvos y preparación de los extractos se siguió la metodología descrita por Garduño *et al.* (2009), con algunas modificaciones. Las hojas de cada especie vegetal se lavaron con agua corriente para eliminar el exceso de suciedad o polvo y se desinfectaron con hipoclorito de sodio (NaClO) al 1 % por 10 min (Figura 16). Las hojas se enjuagaron con agua destilada, se colocaron en papel secante para eliminar el exceso de agua y se secaron en una estufa a 40 °C por 24 a

48 h. El material vegetal seco, se molió en un molino de martillos y los polvos se guardaron en frascos color ámbar.



Figura 16. Lavado, secado y molido del material vegetal.

Preparación del extracto: El polvo vegetal se colocó en un matraz bola fondo plano (cada uno por separado) y se le adicionó metanol en una proporción 1:5 w/v (Figura 17). Este preparado se agitó manualmente durante 5 min y se dejó macerar por 24 h. El macerado se filtró con papel Whatman No. 10 y la mezcla filtrada se concentró en un rotavapor (BuchiWater bath B-480) a 60 °C. Cada concentrado se colocó en frascos color ámbar y se dejó destapado a temperatura ambiente hasta que el solvente se evaporó en su totalidad (24 a 48 h) y se guardaron a 4 °C hasta su uso.

Preparación del quitosano: La solución de quitosano 1.5 % p/v se preparó de acuerdo a la metodología descrita por Ramos *et al.* (2009) (Figura 18). Se pesaron 30 g de quitosano grado reactivo de peso molecular medio (Sigma-Aldrich®) y se colocaron en un vaso de precipitados con 1000 mL de agua destilada, se le adicionó 10 mL de ácido acético y se dejó en agitación constante durante 24 h, posteriormente se ajustó el pH a 5.5 (Horiba F-51), se le agregaron 70 mL de hidróxido de sodio (0.1 N) en fracciones de 10 mL. Una vez ajustado el pH se aforó con agua destilada a 2000 mL.

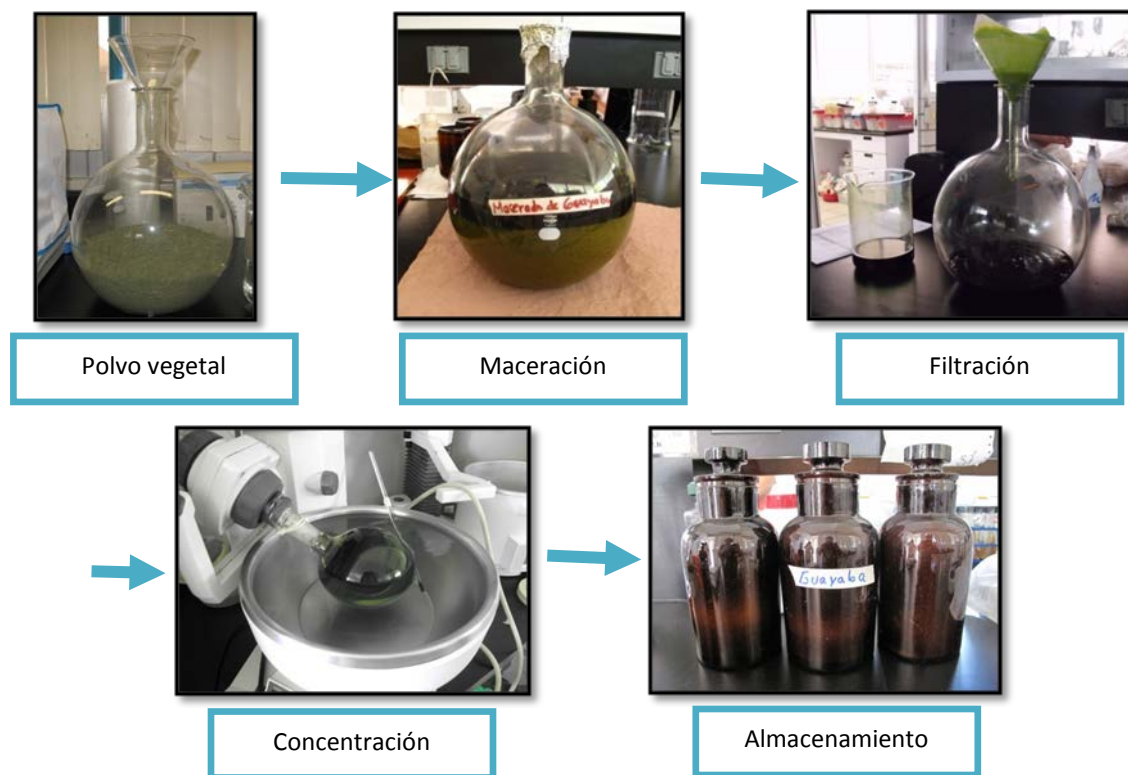


Figura 17. Procedimiento para la preparación de los extractos metanólicos.

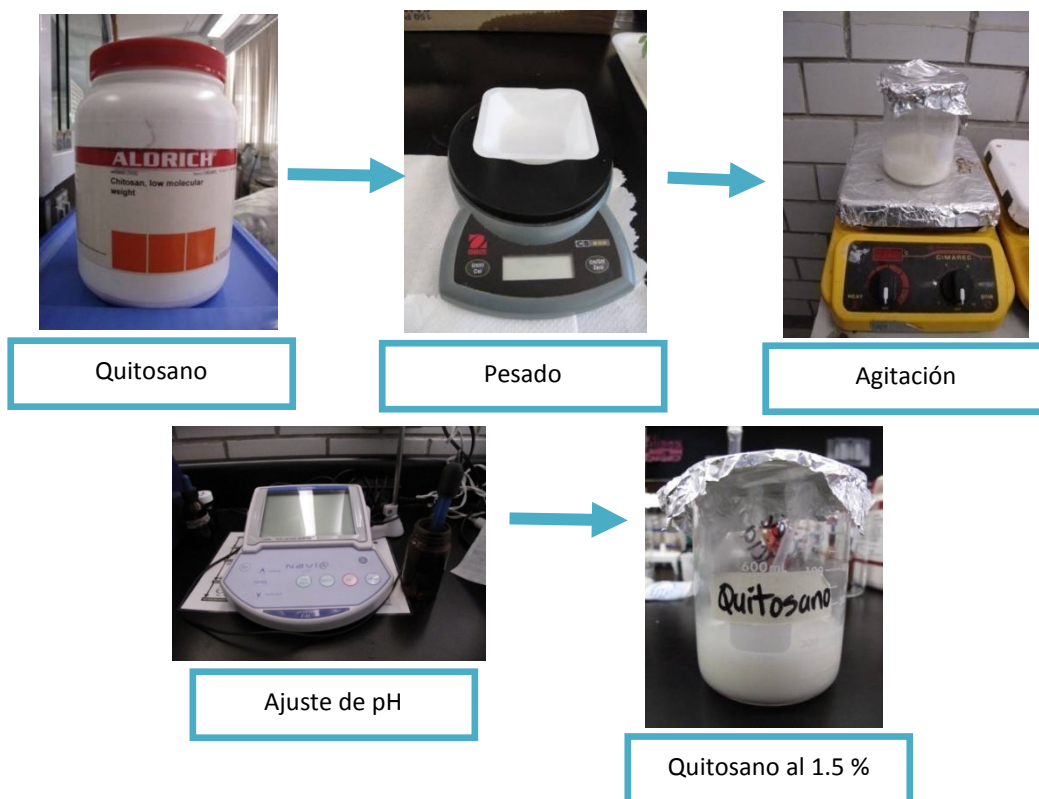


Figura 18. Preparación del quitosano.

5.2 Preparación del suelo

Suelo estéril: Para la esterilización del suelo se siguió la metodología descrita por Córdova (2010). Una mezcla homogénea se preparó con tierra de monte y arena en una proporción 2:1 y cernida con un tamiz del No. 10. La mezcla de suelo se colocó en bolsas de polietileno de 5 kg y se esterilizó en autoclave 2 veces a 15 Lb de presión durante 3 h a 120 °C (Figura 19). Las macetas de plástico de 5Kg se lavaron y desinfectaron con NaClO al 1% por 10 minutos y se llenaron con el suelo.



Figura 19. Tamizado, esterilizado y llenado de macetas con el suelo.

Colecta de suelo de campo: Se hicieron dos colectas de suelo, la primera colecta se hizo en una parcela que presentó problemas severos de fusariosis (*comunicación personal*), del municipio de Yautepec en el poblado de Campo Nuevo. La segunda colecta se llevó a cabo en el Municipio de Anenecuilco, en el campo Clazayanca, la colecta se hizo en áreas donde las plantas presentaban síntomas característicos de fusariosis (Figura 20). Las muestras de suelo se llevaron al laboratorio de Fitopatología Poscosecha del Centro de Desarrollo de Productos Bióticos, donde se hicieron análisis microbiológicos para evaluar el número de colonias de *Fusarium* presentes en el suelo.



Figura 20. Colecta de suelo en los municipios de Yautepec y Anenecuilco.

5.3 Inoculación de los cormos

Preparación del inoculo: Se utilizó una cepa de *Fusarium oxysporum* f.sp. *gladioli* previamente identificada morfológica y molecularmente (Córdova, 2010). Esta cepa se inoculó en cormos sanos y se colocaron en cámaras húmedas para su reaislamiento. El micelio se colocó en medio PDA y se dejó crecer durante 10 a 15 días (Figura 21). También se sembraron discos de micelio crecido en PDA en caldo papa dextrosa (PDB) y se dejaron en agitación constante hasta el desarrollo de micelio.

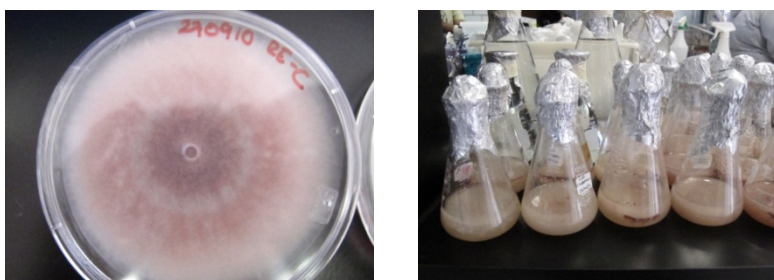


Figura 21. Preparación del inoculo en PDA y PDB.

Inoculación de los cormos: Se utilizaron cormos de la variedad “Blanca Espuma”, que estuvieran visiblemente sanos, sin daño mecánico o síntomas de enfermedad. Para la inoculación se siguió la metodología descrita por Martínez (2010), con algunas modificaciones (Figura 22).

1. Los cormos se lesionaron haciendo punciones en la parte basal con una aguja estéril y se sumergieron en una solución de esporas (10^6) por 48 h.
2. Los cormos se lesionaron haciendo un orificio en la parte basal con un sacabocados. Se obtuvo el micelio del cultivo crecido en PDB y se colocó en el orificio del cormo.
3. Los cormos inoculados se pusieron en cámara húmeda por 48 h para después tratarlos con los extractos.

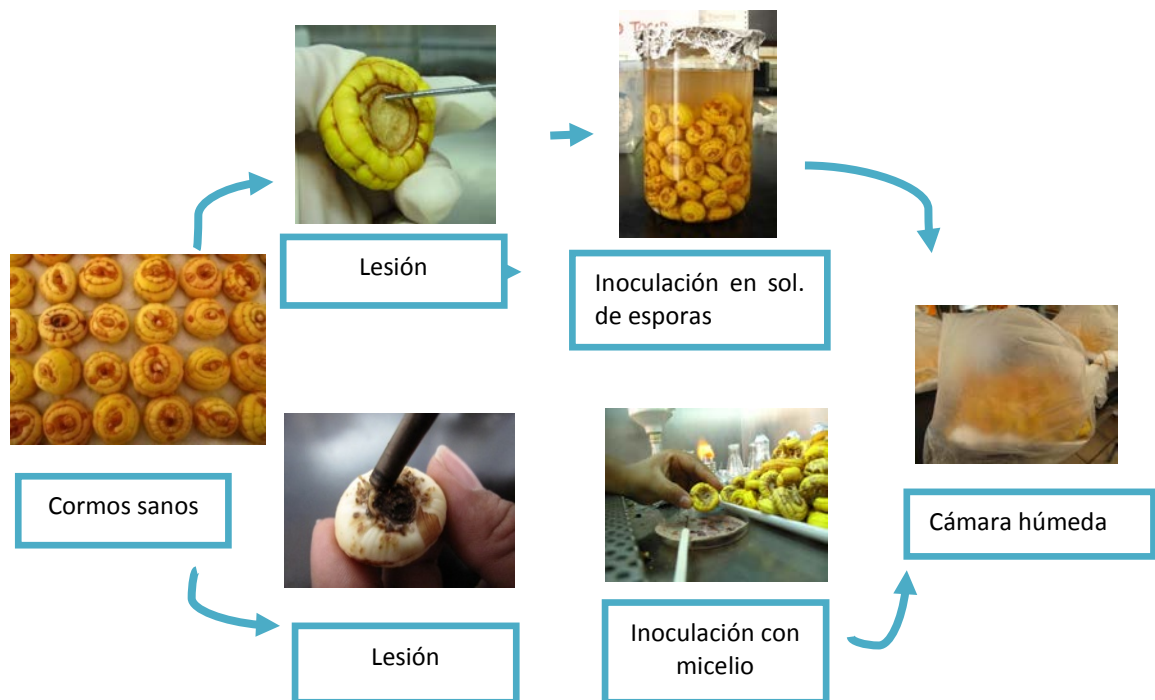


Figura 22. Métodos de inoculación de los cormos.

5.4 Tratamiento de los cormos

Con los extractos de ciruela, nanche y guayaba se prepararon soluciones al 2.5 y 5% (Figura 23). Los cormos preinoculados se trataron con los extractos, con el quitosano al 1.5 % y una combinación del extracto de guayaba al 2.5 % y quitosano durante 30 min, se colocaron en papel secante y se sembraron a 5 cm de profundidad en macetas con el suelo estéril o suelo de campo. Se incluyó un control con agua y uno con fungicida comercial (Sportak) a 3 mL L⁻¹ por 15 min.

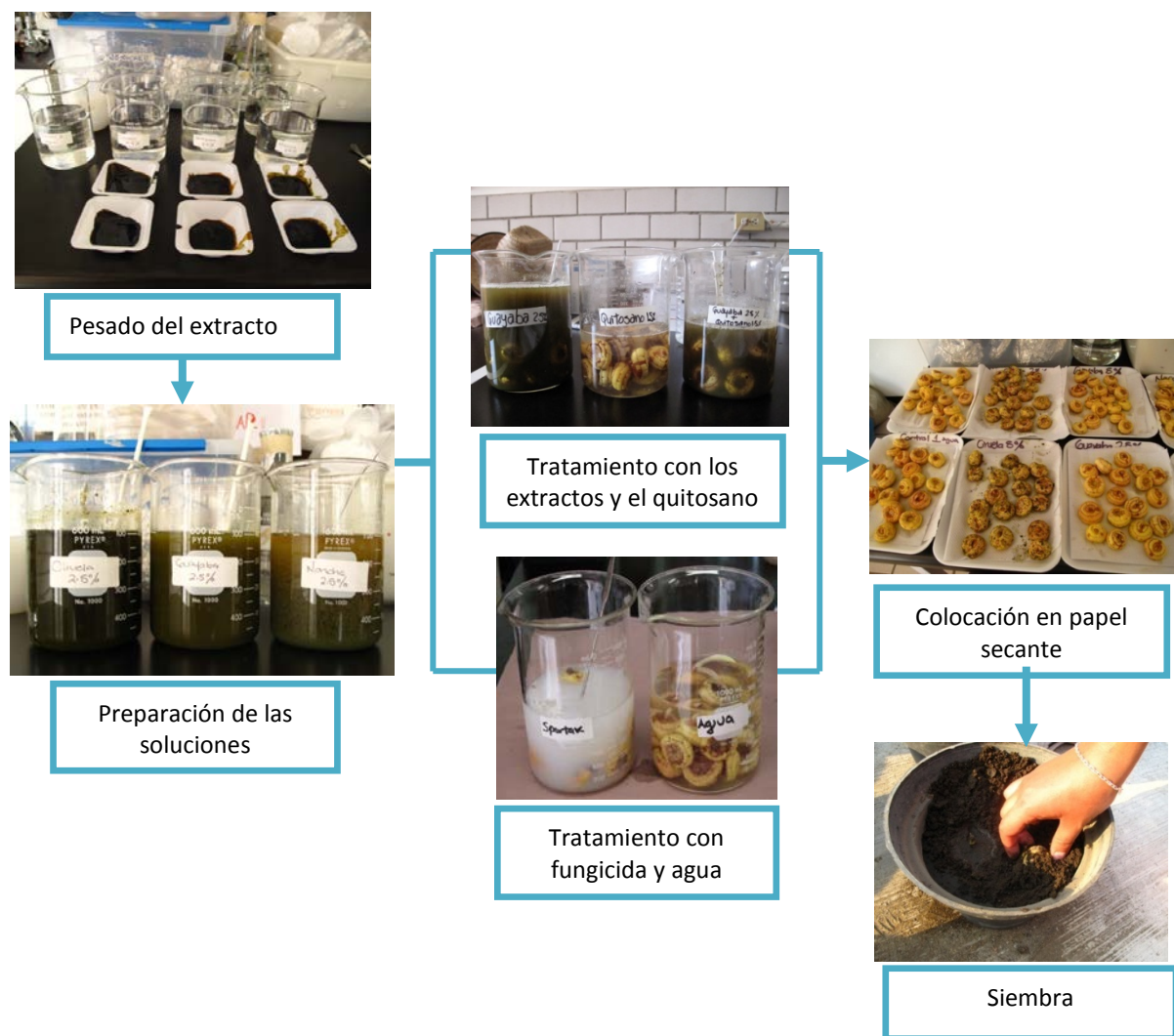


Figura 23. Preparación de los extractos y aplicación de los tratamientos a los cormos.

5.5 Variables evaluadas

A nivel de cormo las variables que se evaluaron son:

- Días de emergencia: días transcurridos desde la siembra hasta el momento de la germinación del cormo (experimentos 1, 2, 3 y 4).
- Severidad de la enfermedad: los cormos se evaluaron mediante la escala propuesta por Martínez (2010) (Cuadro 3). Los cormos se partieron a la mitad mediante un corte transversal y se observó el daño causado por *F. oxysporum* f. sp. *gladioli*, al cual se le asignó un valor numérico (experimentos 1 y 2).

Cuadro 3. Escala para evaluar la severidad de la enfermedad en el cormo.

| índice | % daño |
|--------|-----------------|
| 0 | 0 % de daño |
| 1 | 1-20 % de daño |
| 2 | 21-40 % de daño |
| 3 | 41-60 % de daño |
| 4 | >60 % de daño |

Fuente: (Martínez, 2010).

- Porcentaje de infección en cormo: A los cormos se les realizó un corte transversal y se tomó una fotografía digital para cada cormo de cada tratamiento. Las fotografías se analizaron mediante el programa computacional Image Tool 3.00, el área infectada se midió en cm^2 y se transformó a porcentaje en relación al área total de cada cormo (experimentos 3 y 4).

- Incidencia: se calculó el porcentaje de cormos enfermos respecto al total de cormos sanos (experimentos 1, 2, 3 y 4).

Las variables que se evaluaron en el desarrollo de la planta fueron:

- Severidad de la enfermedad: esta variable se calculó mediante la escala propuesta por Mendoza-Zamora (1997) (Cuadro 4). Durante la floración de la planta, se observó el síntoma que presentó y se le asignó un valor numérico (experimentos 1, 2, 3 y 4).

Cuadro 4. Escala para evaluar la severidad de la enfermedad en la planta.

| índice | Síntoma |
|---------------|-------------------------------|
| 1 | Síntomas foliares no visibles |
| 2 | Amarilleo en punta de hojas |
| 3 | Amarilleo y epinastía |
| 4 | Marchitamiento |
| 5 | Achaparramiento |
| 6 | Planta muerta |

Fuente (Mendoza-Zamora, 1997)

- Altura de la planta: las plantas se midieron desde la base del tallo floral hasta la hoja más larga de la planta (experimentos 2 y 3).
- Desarrollo de la espiga floral: se calculó el porcentaje de plantas que desarrollaron la espiga floral (experimentos 1, 3 y 4).

- Número de hojas: se contó el número de hojas que desarrollo cada planta de cada tratamiento (experimentos 3 y 4).
- Incidencia: se calculó el desarrollo de la enfermedad tomando el porcentaje de plantas enfermas respecto al total de plantas sanas (experimentos 1, 3 y 4).

5.6 Diseño experimental y análisis estadístico

Para los experimentos 1, 2 y 3 se sembraron dos cormos por maceta, con doce repeticiones para cada tratamiento. En el experimento 4 se sembró un cormo por maceta con 10 repeticiones para cada tratamiento, el diseño fue completamente al azar.

Los datos de tiempo de emergencia (días), número de hojas, altura de la planta (cm), se analizaron por medio de una Anova simple y una Anova de dos vías para los experimentos 2 y 4. Para analizar los datos de porcentaje de infección, severidad de la enfermedad en cormo y planta se usó una prueba de Kruskal-Wallis, dependiendo de la naturaleza de los datos y cuando fue apropiado, se utilizó una prueba de separación de medias. Para analizar los datos de presencia de espiga floral e incidencia se utilizó la prueba de X^2 . Todos los análisis se realizaron con el programa estadístico Sigma Stat versión 3.5.

Cuadro 5. Resumen de los tratamientos y variables evaluadas en cada tratamiento

| Experimento | Tratamientos | n | Método de inoculación | Suelo | Variables evaluadas |
|---|---|----|------------------------|------------------------------------|--|
| 1. Efecto de la aplicación de extractos vegetales en cormos preinoculados con solución de esporas y sembrados en suelo estéril | Extracto vegetal 2.5 y 5%: | 12 | Sol. esporas | Estéril | En cormos: tiempo de emergencia, severidad, incidencia En planta: severidad, desarrollo de espiga floral, incidencia |
| 2. Efecto de la aplicación de extractos vegetales en cormos preinoculados con solución de esporas y micelio y sembrados en suelo colectado de campo | <ul style="list-style-type: none"> • ciruela • guayaba • nanche Controles: <ul style="list-style-type: none"> • Fungicida • Agua | 12 | Sol. esporas y micelio | Yautepec | En cormos: tiempo de emergencia, severidad, incidencia |
| 3. Efecto de la aplicación de extractos vegetales en cormos preinoculados con micelio y sembrados en suelo colectado de campo | | 12 | Micelio | Anenecuilco | En cormos: tiempo de emergencia, porcentaje de daño, incidencia En planta: severidad, altura de la planta, desarrollo de espiga floral, número de hojas incidencia |
| 4. Efecto de la aplicación de extractos vegetales y quitosano en cormos preinoculados con micelio y sembrados en suelo estéril y no estéril | <ul style="list-style-type: none"> • guayaba 2.5% • Quitosano 1.5% • guayaba + quitosano Controles <ul style="list-style-type: none"> • Fungicida • Agua | 10 | Micelio | Anenecuilco (estéril y no estéril) | En cormos: tiempo de emergencia, porcentaje de daño, incidencia En planta: severidad, altura de la planta, desarrollo de espiga floral, número de hojas, incidencia |

5.7 Análisis fitoquímico de extractos vegetales por Cromatografía de Gases y Espectrometría de Masas (CG-EM).

La CG-EM de los extractos vegetales se realizó en el Centro de Investigaciones Químicas de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (C.I.Q.-U.A.E.M).

Se preparó una solución de 5 mg de cada muestra en 0.5 mL de metanol. Se inyectó 1 μ L de esta solución al cromatografo de gases (Agilent serie 6890) acoplado a un detector de masas (Agilent serie 5973 N) con técnica de ionización por impacto electrónico a 70 Ev (Electrovoltios). Una columna Agilent Technologies, Inc. HP 5MS de 25m x 0.2 mm x 0.33 μ m se utilizó con una fase estacionaria de fenil metilpolisiloxano al 5%. El gas acarreador fue helio de alta pureza que se inyectó a una velocidad de 1mL/min a 260 °C, durante 20 min. Se trabajó con un modo splitless 10:1 y con la línea de transferencia de masas MSD a 280 °C. Para la identificación de cada componente de las mezclas, los datos se compararon con los reportados en una base de datos (NITS.MS Versión 1.7^a) incluida en el equipo.

6. Resultados

6.1 Experimento 1. Efecto de la aplicación de extractos vegetales en cormos preinoculados con solución de esporas y sembrados en suelo estéril

A los 25 días de la siembra, se extrajo un cormo por maceta de cada tratamiento, se hizo un corte transversal y no se observaron daños causados por *F. oxysporum* f. sp. *gladioli*. Por lo que la incidencia y severidad de la enfermedad fue igual a cero (Figura 24).



Figura 24. Cormos visiblemente sanos, no se infectaron con *F. oxysporum* f. sp. *gladioli*.

Los síntomas de la enfermedad se observaron durante la floración de las plantas, es decir 90 días después de la siembra (Figura 25). Todos los tratamientos mostraron el 100 % de incidencia de la enfermedad incluyendo el tratamiento con el fungicida. Respecto a la severidad no se observaron diferencias estadísticas ($P=0.097$) entre los tratamientos, sin embargo, la mayoría de las plantas presentaron una severidad igual a 2.



Figura 25. Amarillamiento en punta de hojas, síntoma característico de la fusariosis.

En el cuadro 6 se muestra que con el extracto de nanche al 2.5 % los cormos germinaron a los 8.5 días después de la siembra, pero con el extracto de ciruela a la misma concentración germinaron a los 14.5 días ($P \leq 0.025$). El extracto de guayaba al 5% estimuló la floración hasta en un 75% de las plantas en comparación con el fungicida y agua ($P = < 0.001$).

Cuadro 6. Efecto de los extractos vegetales en los días de emergencia y desarrollo de la espiga floral.

| Tratamiento | ¹ Emergencia (días) | ² Desarrollo de espiga floral (%) |
|---------------------|--------------------------------|--|
| Ciruela 2.5% | 14.5 ± 4.8 b | 42 cb |
| Ciruela 5% | 9.5 ± 6.8 ab | 17 ab |
| Guayaba 2.5% | 11.3 ± 5.4 ab | 42 cb |
| Guayaba 5% | 11.6 ± 4.2 ab | 75 c |
| Nanche 2.5% | 8.5 ± 1.5 a | 42 cb |
| Nanche 5% | 12.3 ± 3.4 ab | 42 cb |
| Fungicida | 10.1 ± 3.4 ab | 33 b |
| Agua | 11.8 ± 3.9 ab | 17a |

¹Kruskal Wallis H = 16.050, N= 12, gl= 7, P = 0.025; ²X²

6.2 Experimento 2: Efecto de la aplicación de extractos vegetales en cormos preinoculados con solución de esporas y micelio y sembrados en suelo colectado de campo

En relación a la severidad de la enfermedad se observaron índices de severidad variables y la escala utilizada no permitió encontrar diferencias estadísticas significativas. Respecto a la incidencia de la enfermedad, los tratamientos inoculados con micelio mostraron una mayor incidencia que los inoculados con solución de esporas, a excepción del tratamiento con ciruela al 5% (Cuadro 7). No se observaron diferencias significativas entre los tratamientos, pero si en el método de inoculación.

En general, los cormos inoculados con solución de esporas emergieron en menos días que los inoculados con micelio (Cuadro 7). Los cormos inoculados con solución de esporas y tratados con los extractos tuvieron menor tiempo de emergencia que con el control con agua. Se observó que los cormos inoculados con solución de esporas y tratados con el extracto de nanche al 5 % emergieron en menos tiempo que cuando se inocularon con micelio. Lo contrario sucedió en el control con agua, donde los cormos inoculados con micelio emergieron en menos tiempo que los inoculados con solución de esporas.

Cuadro 7. Efecto de los extractos vegetales y el método de inoculación sobre la emergencia e incidencia de la enfermedad en cormos inoculados con micelio y solución de esporas.

| Variable | Método de inoculación | Tratamientos | | | | | | | |
|--------------------------------|-----------------------|------------------|------------------|--------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | | Ciruela 2.5 % | Ciruela 5 % | Guayaba 2.5 % | Guayaba 5% | Nanche 2.5% | Nanche 5% | Agua | Fungicida |
| ¹ Emergencia (días) | Micelio | 7.0 ± 1.0 a A | 6.6 ± 2.0 a A | 12.1 ± 11.2 a A | 9.1 ± 8.1 a A | 6.3 ± 1.5 a A | 12.5 ± 6.6 a B | 7.1 ± 4.3 a A | 8.8 ± 1.16 a A |
| | Esporas | 3.3 ± 0.8 a A | 3.0 ± 0.0 a A | 8.0 ± 8.9 a A | 4.16 ± 0.7 a A | 7.1 ± 10.2 a A | 2.6 ± 0.5 a A | 26.5 ± 1.6 b B | 3.1 ± 0.9 a A |
| ² Incidencia (%) | Micelio | 67 b A | 33 a A | 83 c B | 83 c B | 83 c B | 83 c B | 100 d B | 100 d B |
| | Esporas | 67 c A | 67 c B | 33 a A | 50 b A | 50 b A | 50 b A | 50 b A | 67 c A |

¹F_{tratamiento} = 6.503, N= 6, gl= 7/95, P= <0.001; F_{inoculación} = 1.846, N= 6, gl= 1/95, P= 0.178; F_{tratamiento x inoculación} = 8.36, N= 6, gl= 7/95, P= <0.001; Tukey P= <0.05.

²X² P= <0.001. Letras en minúsculas indican comparaciones entre tratamientos, letras en mayúsculas indican comparaciones en el método de inoculación.

6.3 Experimento 3 Efecto de la aplicación de extractos vegetales en cormos preinoculados con micelio, sembrados en suelo colectado de campo.

En la incidencia de la enfermedad, todos los tratamientos mostraron el 100 % de incidencia. En cuanto al porcentaje de infección en los cormos, no se encontraron diferencias estadísticas, aunque se observó que el tratamiento con guayaba al 2.5% mostro el menor porcentaje de infección respecto al tratamiento con fungicida y con agua. El tratamiento con ciruela 2.5% mostró el porcentaje de infección más alto (Cuadro 8).

Respecto a la incidencia, los cormos tratados con el extracto de guayaba al 5 %, mostró la menor incidencia de la enfermedad. Los cormos tratados con el extracto de nanche al 5 % y el control con fungicida mostraron una incidencia del 100 %. En la severidad, se encontraron diferencias estadísticas en el tratamiento de ciruela al 2.5% con el mayor índice de severidad en comparación con el control fungicida. Los tratamientos restantes mostraron una severidad igual a 3 (Cuadro 8).

En los días de emergencia no se encontraron diferencias estadísticas entre los tratamientos (Cuadro 8). Los cormos tratados con el extracto de guayaba al 5% mostraron los menores días de emergencia respecto al control agua. No se desarrolló espiga floral en ninguna de las plantas de todos los tratamientos. Los cormos tratados con el extracto de ciruela al 2.5% tuvieron la menor altura en comparación con el control fungicida. Los cormos tratados con el extracto de nanche al 2.5 % desarrollaron una altura similar al control fungicida, pero diferente del control agua.

Cuadro 8. Efecto de los extractos vegetales sobre el porcentaje de infección en el cormo, incidencia, severidad y desarrollo de la planta.

| Tratamiento | Cormo | | Planta | | |
|---------------------|-------------------------------------|-----------------------------|------------------------|--------------------------------|--------------------------|
| | ¹ Infección en cormo (%) | ² Incidencia (%) | ³ Severidad | ⁴ Emergencia (días) | ⁵ Altura (cm) |
| Ciruela 2.5% | 80.4 ± 23.0 a | 92 bc | 4.5 ± 1.5 b | 19.0 ± 7.8 a | 26.5 ± 7.1 a |
| Ciruela 5% | 65.6 ± 34.1a | 83 b | 3.9 ± 1.4 a b | 15.5 ± 6.4 a | 28.4 ± 6.2 a |
| Guayaba 2.5% | 62.6 ± 29.3 a | 92 bc | 3.8 ± 1.4 a b | 16.2 ± 6.8 a | 32.7 ± 6.0 a |
| Guayaba 5% | 76.7 ± 24.2 a | 67 a | 3.3 ± 1.0 a b | 13.1 ± 6.9 a | 33.3 ± 4.6 a |
| Nanche 2.5% | 76.7 ± 29.6 a | 92 bc | 3.5 ± 1.2 a b | 15.5 ± 4.3 a | 34.4 ± 6.0 b |
| Nanche 5% | 72.6 ± 29.6 a | 100 c | 3.2 ± 1.3 a b | 14.9 ± 4.1 a | 30.2 ± 3.5 a |
| Fungicida | 73.6 ± 32.7 a | 100 c | 2.5 ± 1.2 a | 15.5 ± 6.8 a | 35.2 ± 4.0 b |
| Agua | 70.5 ± 31.2 a | 92 b c | 4.5 ± 1.5 b | 17.2 ± 6.2 a | 25.5 ± 5.2 a |

¹H = 2.491, N= 7-12, gl= 7 P = 0.928; ²X²; ³H = 22.549, N= 8-12, gl=7, P = 0.002, Dunn's P=<0.05; ⁴H = 4.202, N= 12, gl= 7, P = 0.756; ⁵F= 4.7, N= 8-12, gl= 7/84, P= <0.001, Tukey P=< 0.05.

6.4 Experimento 4: Efecto de la aplicación de extractos vegetales y quitosano en cormos preinoculados con micelio, sembrados en suelo estéril y suelo colectado de campo.

En la incidencia de la enfermedad, todos los tratamientos mostraron el 100 % de incidencia. En cuanto al porcentaje de infección en cormo, los cormos sembrados en suelo estéril y tratados con la combinación de guayaba y quitosano mostraron el menor porcentaje de infección comparado con los cormos tratados con el extracto de guayaba al 2.5 % y con el fungicida (Cuadro 9).

En los cormos sembrados en suelo no estéril, el control con agua mostró el menor porcentaje de daño y los cormos tratados con quitosano y la combinación de guayaba y quitosano mostraron los mayores porcentajes de daño. En los cormos tratados con la combinación guayaba y quitosano y sembrado en suelo estéril los cormos tuvieron un menor porcentaje de infección que cuando se sembraron en suelo no estéril. Respecto a la incidencia de la enfermedad en la planta, todos los tratamientos mostraron el 100 % de incidencia. Las plantas sembradas en suelo no estéril tuvieron una menor severidad que las sembradas en suelo estéril (Cuadro 9).

Los cormos tratados con el extracto de guayaba al 2.5 % y quitosano al 1.5 %, emergieron en menos días que cuando se sembraron en suelo no estéril (Cuadro 9). Lo contrario se observó en los cormos tratados con la combinación de guayaba y quitosano y los controles con agua y con fungicida; los cormos emergieron en menos días cuando se sembraron en suelo no estéril que cuando se sembraron en suelo estéril.

Los cormos sembrados en suelo no estéril desarrollaron mayor número de hojas que los sembrados en suelo estéril, a excepción del control con fungicida, el cual no mostró diferencias significativas. También se encontró que los cormos sembrados en suelo no estéril alcanzaron una mayor altura que las sembradas en suelo estéril. Las plantas procedentes de cormos tratados con el extracto de guayaba al 2.5 % desarrollaron la espiga floral hasta en un 50 %.

Cuadro 9. Efecto de los extractos vegetales y quitosano en cormos sembrados con suelo estéril y no estéril.

| Variable | Tipo de suelo | Tratamientos | | | | |
|-------------------------------------|---------------|---------------------|---------------------|---------------------------------|---------------------|---------------------|
| | | Guayaba 2.5% | Quitosano 1.5 % | Guayaba 2.5 % + Quitosano 1.5 % | Fungicida | Agua |
| ¹ Emergencia (días) | Estéril | 22.8 ± 5.1 a A | 26.5 ± 5.8 a A | 27.6 ± 6.1 a B | 30.6 ± 4.2 a B | 30.6 ± 7.2 a B |
| | No estéril | 24.2 ± 3.4 a B | 27.2 ± 7.1 a B | 25 ± 2.9 a A | 22.5 ± 3.0 a A | 27.3 ± 3.9 a A |
| ² Severidad | Estéril | 4.2 ± 1.3 a B | 5.1 ± 0.3 a B | 4.0 ± 1.6 a B | 4.2 ± 1.3 a B | 5.0 ± 0.0 a B |
| | No estéril | 2.5 ± 1.0 a A | 2.1 ± 0.6 a A | 3.1 ± 1.5 a A | 2.7 ± 1.3 a A | 2.7 ± 1.3 a A |
| ³ Altura (cm) | Estéril | 27.3 ± 8.4 a A | 26.6 ± 7.8 a A | 30.2 ± 9.9 a A | 32.3 ± 4.7 a A | 25.8 ± 5.1 a A |
| | No estéril | 41.7 ± 3.8 a B | 37.5 ± 8.3 a B | 39.6 ± 5.9 a B | 37.7 ± 5.0 a B | 40.1 ± 6.2 a B |
| ⁴ Número de hojas | Estéril | 5.1 ± 1.1 a A | 4.7 ± 1.4 a A | 4.7 ± 2.0 a A | 5.7 ± 0.8 a A | 4.2 ± 0.7 a A |
| | No estéril | 7.2 ± 1.0 a B | 6.3 ± 1.1 a B | 6.2 ± 1.1 a B | 5.8 ± 1.1 a A | 7.1 ± 1.3 a B |
| ⁵ Infección en cormo (%) | Estéril | 59.3 ± 27.4 b A | 50.0 ± 32.0 ab A | 31.6 ± 19.9 a A | 64.5 ± 13.1 b A | 47.8 ± 23.1 ab A |
| | No estéril | 59.3 ± 14.8 ab A | 68.8 ± 8.2 b A | 67 ± 22.4 b B | 47.5 ± 24.0 ab A | 38.5 ± 24.2 a A |

¹F_{Tratamiento}=2.262, N= 8, gl= 4/79, P=0.071, F_{suelo}= 4.238, N=8, gl=1/79, P=0.043, F_{tratamiento x suelo}=2.168, N=8, gl=4/79, P=0.081.

²F_{Tratamiento}=0.375, N=8, gl=4/79, P=0.826, F_{suelo}=47.96, N=8, gl=1/79, P=<0.001, F_{tratamiento x suelo}=1.748, N= 8, gl=4/79, P=0.149.

³F_{Tratamiento}=0.604, N=8, gl=4/79, P=0.661, F_{suelo}=50.467, N=8, gl=1/79, P=<0.001, F_{tratamiento x suelo}=1.203, N=8, gl=4/79, P=0.317.

⁴F_{Tratamiento}=0.746, N= 8, gl=4/79, P=0.564, F_{suelo}=34.184, N=8, gl=1/79, P=<0.001, F_{tratamiento x suelo}=2.558, N=8, gl= 4/79, P=0.046. ^{1, 2, 3, 4}

Tukey P=0.05. ⁵F_{Tratamiento}= 1.234, N=6, gl=4/59, P=0.309, F_{suelo}=0.958, N=6, gl=1/59, P=0.332, F_{tratamiento x suelo}=2.821, N=6, gl=4/59, P=0.035. ⁵Fisher LSD α=<0.05. Letras en minúsculas indican comparaciones entre tratamientos, letras en mayúsculas indican comparaciones en el tipo de suelo.

6.5 Análisis fitoquímico de los extractos vegetales por cromatografía de gases y espectrometría de masas (CG-EM)

En los extractos vegetales se identificaron 42 compuestos en total, los cuales pertenecen a diferentes familias químicas que incluyen, monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos y ácidos grasos (Cuadro 10). Los compuestos volátiles tuvieron pesos moleculares entre 134 a 412 u.m.a. (unidad de masa atómica). En el extracto de guayaba un 86.6 % se identificaron como sesquiterpenos. Los ácidos grasos sólo se identificaron en el extracto de ciruela, el sesquiterpeno óxido de cariofileno y el esteroide estigmasterol únicamente se presentaron en el extracto de nanche. Varios monoterpenos y sesquiterpenos se identificaron en los tres extractos analizados.

Cuadro 10. Compuestos identificados en los extractos vegetales y agrupados por familias químicas.

| Familia | No. | Compuesto | Extracto | | |
|----------------|-----|--|----------|---|---|
| Monoterpenos | 1 | (+)-2-careno (Pinoneno) | C | G | N |
| | 2 | (+)- α -tujeno | C | G | N |
| | 3 | 4-careno | | G | |
| | 4 | (\pm)-camfeno | C | G | N |
| | 5 | α -pineno | C | G | N |
| | 6 | α -terpineno | C | | N |
| | 7 | p-cimeno (8CI) | C | G | |
| Sesquiterpenos | 1 | 7(11)-selinen-4a-ol | | G | |
| | 2 | (-)- β -selineno (β -Eudesmeno) | C | G | N |
| | 3 | 1H-cicloprop[e]azuleno,decahidro-1,1,7-trimetil-4-metileno-, [1aR-(1a.alpha.,4a.alpha.,7.alpha.,7 ^a .beta,7b] | | G | |
| | 4 | α -cariofileno (α -humuleno) | C | G | |
| | 5 | α -cubebeno | | G | |
| | 6 | α -cipereno | | G | |
| | 7 | Aromadendreno | | G | |
| | 8 | α -selineno | C | G | N |
| | 9 | β -cariofileno | C | G | N |

| | | | | | |
|---------------|----|--|---|---|---|
| | 10 | (-)-β-cadineno (Cadina-3,9-dieno) | G | | |
| | 11 | Óxido de cariofileno | G | N | |
| | 12 | Copaeno | G | | |
| | 13 | epi-Muuroleno | C | | |
| | 14 | γ-cadineno | C | | |
| | 15 | (+)-calameneno | G | | |
| Diterpenos | 1 | 3-Metileno-7,11,15-trimetilhexadecan-1-ol | | | N |
| | 2 | Cis-Fitol | | | N |
| | 3 | Fitol | C | | |
| | 4 | Trans-Fitol | C | G | N |
| Triterpenos | 1 | Escualeno | C | G | |
| Esteroides | 1 | Estigmasterol | | | N |
| Ácidos grasos | 1 | 11-ester metílico del ácido eicosenoico | C | | |
| | 2 | 13- ester metílico del ácido docosenoico, (Z) | C | | |
| | 3 | 9,12,15- ester metílico del ácido octadecatrienoico, (Z,Z,Z) | C | | |
| | 4 | 9,12- ester metílico del ácido octadecadienoico (Z,Z)- | C | | |
| | 5 | Ester metílico del ácido eicosanoico | C | | |
| | 6 | Ester metilico del ácido piroglutámico | C | | |
| | 7 | Ester metílico del ácido hexadecanoico | C | | |
| | 8 | Erucato de metilo | C | | |
| | 9 | N-metil docosanoato | C | | |
| | 10 | N-ácido hexadecanoico | C | | |
| | 11 | Ester metílico del ácido octadecanoico | C | | |
| otros | 1 | 14-hexadecen-1-ol, 3,7,11,15-tetrametil-, (3R,7R,11S)- | C | G | N |
| | 2 | 4a,7a-Etan-5H-ciclobuten-inden-5-ol | | G | |
| | 3 | Miristato de Metilo | C | | |

C=ciruela, G= guayaba, N=nanche.

6.5.1 Análisis del extracto de ciruela

Del extracto de ciruela se identificaron 28 compuestos (Cuadro 11). Los compuestos mayoritarios presentes fueron el ester metílico del ácido docosenoico, el erucato de metilo seguido por el escualeno.

Cuadro 11. Compuestos identificados en el extracto de ciruela.

| COMPUESTO | PM | TR (min) | % |
|--|-----|-------------|---------------|
| p-cimeno | 134 | 8.868 | 2.021 |
| (+)- α -Tujeno | 136 | 7.016 | 0.328 |
| α -pineno | 136 | 7.148 | 0.59 |
| (\pm)-camfeno | 136 | 7.431 | 0.678 |
| (+)-2-careno | 136 | 8.347 | 0.664 |
| α -terpineno | 136 | 8.65 | 3.226 |
| Ester metílico del ácido piroglutámico | 143 | 15.142 | 0.841 |
| β -cariofileno | 204 | 14.826 | 0.172 |
| α -cariofileno (α -Humuleno) | 204 | 15.287 | 0.545 |
| β -selineno (β -Eudesmeno) | 204 | 15.722 | 0.123 |
| α -selineno | 204 | 15.821 | 0.253 |
| γ -cadineno | 204 | 16.025 | 0.077 |
| Epi-muuroleno | 204 | 16.091 | 0.08 |
| Miristato de metilo | 242 | 18.279 | 0.801 |
| Ácido n-hexadecanoico (ácido palmítico) | 256 | 21.06 | 1.893 |
| Ester metílico del ácido hexadecanoico | 270 | 20.407 | 9.482 |
| 9,12,15-ester metílico del ácido octadecatrienoico | 292 | 22.16 | 10.385 |
| 9,12-ester metílico del ácido octadecadienoico (Z,Z) | 294 | 22.081 | 4.391 |
| Trans-Fitol | 296 | 19.485 | 2.609 |
| 14-hexadeceno-1-ol, 3,7,11,15-tetrametil | 296 | 19.94 | 1.399 |
| Fitol | 296 | 22.292 | 2.387 |
| Ester metílico del ácido octadecanoico | 298 | 22.338 | 3.922 |
| 11-ester metílico del ácido eicosenoico | 324 | 24.105 | 8.464 |
| 11- ester metílico del ácido eicosenoico | 324 | 24.151 | 4.171 |
| Ester metílico del ácido eicosanoico | 326 | 24.276 | 2.072 |
| Erucato de metilo | 352 | 26.846 | 11.114 |
| 13- ester metílico del ácido docosenoico | 352 | 26.945 | 15.291 |
| N- metil docosanoato | 354 | 27.097 | 1.083 |
| Escualeno | 410 | 34.761 | 10.929 |
| Total | | | 99.991 |

6.5.2 Análisis del extracto de guayaba

Del extracto de guayaba se identificaron 24 compuestos (cuadro 12). Los compuestos mayoritarios presentes fueron α -Selineno, el β -Cariofileno, seguido por el β -Selineno. Se identificaron sesquiterpenos minoritarios que no se presentaron en los extractos de ciruela y nanche, como el 4-Careno, α -Cubebeno, α -Cipereno, aromandreno y calamaneno.

Cuadro 12. Compuestos identificados en el extracto de guayaba.

| COMPUESTO | PM | TR (min) | % |
|--|-----|-------------|------------|
| p-cimeno | 134 | 8.855 | 2.827 |
| (+)- α -tujeno | 136 | 7.01 | 0.39 |
| α -pineno | 136 | 7.141 | 0.686 |
| (\pm)-camfeno | 136 | 7.425 | 0.93 |
| (+)-2-careno (Pinoneno) | 136 | 8.347 | 1.377 |
| 4-careno | 136 | 8.651 | 5.503 |
| (+)-calameneno | 202 | 16.137 | 2.573 |
| copaeno | 204 | 14.18 | 1.364 |
| β -cariofileno | 204 | 14.819 | 14.984 |
| Aromadendreno | 204 | 15.07 | 2.6 |
| α -cubebeno | 204 | 15.201 | 1.201 |
| α -cariofileno | 204 | 15.274 | 2.196 |
| α -cipereno | 204 | 15.498 | 1.532 |
| (-)- β -selineno | 204 | 15.709 | 12.462 |
| α -selineno | 204 | 15.814 | 16.477 |
| β -cadineno (Cadina-3,9-dieno) | 204 | 16.084 | 1.652 |
| Copaeno | 204 | 16.243 | 1.234 |
| Oxido de cariofileno | 220 | 16.981 | 2.943 |
| 4a,7a-Etan-5H-ciclobutano-indeno-5-ol | 220 | 17.666 | 4.407 |
| 7(11)-selinen-4 α -ol | 222 | 17.883 | 9.052 |
| 1H-Cicloprop[e]azulene,decahidro- 1,1,7-trimetil-4-metileno | 280 | 15.366 | 0.509 |
| Trans-Fitol | 296 | 19.478 | 3.767 |
| 14-hexadecen-1-ol | 296 | 19.933 | 1.184 |
| Escualeno | 410 | 34.708 | 8.152 |
| Total | | | 100 |

6.5.3 Análisis del extracto de nanche

Del extracto de nanche se identificaron 14 compuestos (cuadro 13). Los compuestos mayoritarios presentes fueron el Estigmasterol, el trans-Fitol y el α -Terpineno.

Cuadro 13. Compuestos identificados en el extracto de nanche.

| COMPUESTO | PM | TR (min) | % |
|---|-----|-------------|---------------|
| (+)- α -tujeno | 136 | 7.016 | 0.626 |
| α -pineno | 136 | 7.148 | 1.012 |
| (\pm)-camfeno | 136 | 7.431 | 1.298 |
| (\pm)-2-careno (Pinoneno) | 136 | 8.354 | 1.184 |
| α -terpineno | 136 | 8.664 | 3.615 |
| β -cariofileno | 204 | 14.832 | 1.072 |
| (-)- β -selineno | 204 | 15.728 | 0.723 |
| α -selineno | 204 | 15.821 | 0.882 |
| Óxido de cariofileno | 220 | 16.944 | 0.448 |
| Trans-fitol | 296 | 19.485 | 6.613 |
| Cis-fitol | 296 | 19.748 | 1.413 |
| 14-Hexadecen-1-ol, 3,7,11,15-tetrametil | 296 | 19.939 | 2.972 |
| 3-metilene-7,11,15-trimetilhexadecan-1-ol | 296 | 22.299 | 1.876 |
| Estigmasterol | 412 | 35.776 | 76.265 |
| Total | | | 99.999 |

5. Discusión

En el experimento 1 se observó que después de 25 días de la siembra los cormos sembrados en el suelo estéril no presentaron incidencia de la enfermedad, es decir, no hubo infección. Estos resultados son contrarios a lo reportado por Martínez (2010), quien evaluó distintos métodos de inoculación de *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli* en cormos y observó que en el suelo estéril los síntomas de la enfermedad aparecieron a los 28 días de la siembra, con una incidencia del 30% y una severidad del 25 al 30%. Weinert (2005), menciona que en el ecosistema se generan innumerables reacciones químicas, físicas y biológicas y que hay especies que regulan o controlan a otras mediante la producción y liberación de repelentes, estimulantes o inhibidores químicos. Esto indica que, debido a la esterilización del suelo, el hongo no pudo establecerse, probablemente por la ausencia de comunidades bióticas con las que podría interactuar *F. oxysporum* f. sp. *gladioli* para llevar a cabo la infección.

Referente a la incidencia y severidad de la enfermedad en la planta, se observaron los primeros síntomas 90 días después de la siembra (durante la floración) y se observó una incidencia igual al 100 % y una severidad de la enfermedad igual a 2 (amarillamiento en punta de hojas). Estos resultados concuerdan con los reportados por Shakir *et al.* (1998), quienes reportan una incidencia de la enfermedad después de 90 días entre 0 a 72 %. Los cormos tratados con los extractos vegetales retrasaron a adelantaron los días de emergencia respecto al control con fungicida. En cuanto al desarrollo de la espiga floral, las plantas provenientes de cormos tratados con los extractos vegetales (con excepción del extracto de ciruela al 2.5 %) desarrollaron mayor número de espigas florales que con el tratamiento con fungicida. Resultados similares reportaron Ríaz *et al.* (2009, 2010), quienes observaron

que la mayoría de los tratamientos con hojas de plantas con acción alelopática evaluadas redujeron los días de emergencia de los cormos. También reportaron que los extractos acuosos de alstonia (*Alstonia scholaris*), jengibre (*Zingiber officinale*) y ajo (*Allium sativum*) potenciaron significativamente el crecimiento del follaje del gladiolo más que el control.

En el experimento 2 los cormos preinoculados con solución de esporas y tratados con los extractos vegetales redujeron significativamente los días de emergencia hasta un 82.6 % en relación al control con agua. En cuanto a los cormos preinoculados con micelio y tratados con los extractos, los días de emergencia fueron muy similares a los controles con agua y fungicida. Lo que sugiere, que las esporas fueron más sensibles que el micelio a los tratamientos con los extractos en condiciones “*in situ*”. Estos resultados no concuerdan con lo reportado por Garduño *et al.* (2009), quien reporta que el crecimiento micelial de *F. oxysporum* f. sp. *gladioli* fue el más afectado al tratarlo con diferentes extractos a nivel *in vitro*. Montes-Belmont y Prados-Ligero (2006), reportaron que los principios activos de los productos naturales actúan de forma diferente en cada estructura del hongo. Por ejemplo, el extracto metanólico de neguilla (*Nigella sativa*) inhibió la germinación de esporas de *Fusarium oxysporum* hasta un 98 % y el crecimiento micelial solo en un 27 %. Mientras que el extracto metanólico de tomillo (*Thymus vulgaris*) inhibió el crecimiento micelial hasta un 95 % y la germinación de esporas solo en un 36 %, en este mismo hongo (Elsherbiny, 2010).

En el experimento 3 el tratamiento con extracto de guayaba en las dos concentraciones mostraron el menor porcentaje de infección en el cormo y la menor incidencia de la

enfermedad comparada con el control fungicida. Ríaz *et al.* (2009) menciona que los extractos vegetales acuosos controlaron mejor la enfermedad que la dosis recomendada del fungicida Carbendazim. Por otro lado, Romero (1994), menciona que los fungicidas pueden actuar como agentes mutagénicos, dando como resultado que las esporas de los hongos adquieran resistencia.

En cuanto a la altura de la planta, el tratamiento con extracto de nanche 2.5 % desarrolló plantas con una altura similar a las que se trataron con el fungicida comercial. También se observó que en algunos tratamientos con los extractos, los cormos desarrollaron raíces largas, abundantes, carnosas, parecidas a las del control con fungicida comercial (datos no mostrados). Ríaz *et al.* (2010), reportaron que la incorporación de hojas de distintas especies de plantas a suelo inoculado con *Fusarium oxysporum* potencia el crecimiento vegetativo y radicular de plantas de gladiolo. El autor atribuye esta respuesta a los diferentes aleloquímicos presentes en las especies de plantas evaluadas.

En el experimento 4 los cormos tratados con la combinación de guayaba y quitosano sembrados en suelo estéril mostraron el menor porcentaje de infección (31.6 %), sin embargo, cuando se sembraron en suelo no estéril éste porcentaje se duplicó (67 %). Los cormos tratados con el extracto de guayaba, quitosano y la combinación de ambos sembrados en suelo no estéril, mostraron porcentajes de infección mayores a 50 % mientras que, los cormos del control agua mostraron un porcentaje de infección de 38.5 %. Esto indica que, al tratar los cormos con los extractos y el quitosano probablemente inhibieron los microorganismos benéficos o estimularon la microflora natural del suelo para que el hongo llevara a cabo la infección.

En relación al desarrollo de la planta, los cormos sembrados en suelo estéril tuvieron una mayor severidad de la enfermedad, desarrollaron menor número de hojas y menor altura que los cormos sembrados en suelo no estéril. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Alexander (1980), quien menciona que algunos hongos patógenos de suelos son más destructivos en suelos estériles que en los no estériles. Respecto a los resultados obtenidos con el suelo no estéril. Éste mismo autor también menciona que, debido a las interacciones en la microflora del suelo, la introducción de un organismo extraño raramente permite su establecimiento. Estas interacciones entre poblaciones microbianas dan como resultado la supresión de la enfermedad, característica de algunos tipos de suelos. Un suelo supresor es aquel en el que un patógeno no puede establecerse pero causa daños mínimos. Esta supresividad puede eliminarse por la esterilización por calor, fumigación, radiación o cualquier otro medio que elimine la flora microbiana del suelo.

Respecto al análisis fitoquímico de los volátiles de los extractos vegetales, se identificaron 42 compuestos volátiles principalmente sesquiterpenos y ácidos grasos. Al compararlos con lo reportado por Garduño (2009), se observó que cada uno de los extractos varió cualitativa y cuantitativamente. Aunque fueron las mismas especies de plantas y el mismo método de extracción, quizá se deba a que la colecta de las especies fue en lugares distintos, con diferentes condiciones climáticas y diferentes variedades de especies botánicas. Esta variación en el contenido de compuestos lo explica Karin *et al.* (2010), quienes evaluaron la composición del aceite esencial de hojas de *P. guajava* de tres variedades comerciales y una variedad silvestre. Los resultados mostraron que los tres aceites esenciales contenían compuestos en común principalmente 1,8-cineol. La variedad Paluma contenía 1,8-cineol

(42.68%) como componente mayoritario y el α -terpineol (38.68%). El principal componente de la variedad S culo XXI fue el 1,8-cineol (18.83%), trans-cariofileno (12.08%) y el selin-11-en-4- α -ol (20.98%), mientras la variedad Pedro Sato y la variedad silvestre tuvieron 1,8-cineol (17.68%) y (12.83%), óxido de cariofileno (9.34%) y (9.09%) y selin-11-en-4- α -ol (21.46%) y (22.19%) respectivamente. Taiz y Zeiger (1991) atribuyen estas variaciones a los factores ambientales de cada región, así también, como a factores genéticos que pueden inducir modificaciones en el metabolismo secundario de la planta.

En el extracto de ciruela se identificaron principalmente ácidos grasos, grupo considerado con actividad antimicrobiana según Herrero *et al.* (2006). Sin embargo, en los experimentos *in vivo* el tratamiento de ciruela no presentó actividad antifúngica. Espinosa *et al.* (2008), tampoco observó actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* y *Bacillus cereus* con extractos etanólicos y hexanicos de hojas y corteza de ciruela. Mientras que, Bautista-Baños *et al.* (2000a), reportaron la inhibición en la germinación de *Rhizopus stolonifer* con esta misma especie. Glinski y Branly (2002) mencionan que la actividad antifúngica de los ácidos grasos está relacionada con sus características estructurales y propiedades químicas. Los ácidos grasos que tienen de 10 a 13 átomos de carbono muestran excelente actividad antifúngica, cuando incrementa el número de átomos de carbono disminuye la actividad (Yasuo *et al.*, 2002). En el extracto de ciruela los ácidos grasos identificados tuvieron entre 16 y 23 átomos de carbono, lo que podría explicar su escasa actividad antifúngica. En el extracto de guayaba los compuestos mayoritarios fueron sesquiterpenos y monoterpenos, uno de los compuestos mayoritarios fue el β -Cariofileno, este compuesto ya se ha reportado con actividad antifúngica contra *F.*

oxysporum (Cakir *et al.* 2004 y Chang *et al.* 2008). En el extracto de nanche se identificaron monoterpenos y diterpenos como compuestos principales, sin embargo el compuesto mayoritario fue el esteroide estigmasterol. Una mezcla de estigmasterol y β -sitosterol a 56.7 mg L⁻¹ inhibieron el crecimiento micelial, la germinación de esporas y la elongación del tubo germinativo en un 50 % de *Colletotrichum gleosporioides* en condiciones *in vitro*. Así también, fue más efectivo en controlar la antracnosis en frutos de mango que el fungicida benomil (Yenjit *et al.*, 2010).

6. Conclusiones

- 1- Los tratamientos con extracto de ciruela en las dos concentraciones, no mostraron efectos favorecedores en el control de la enfermedad y afectaron severamente el desarrollo fenológico de la planta.
- 2- El tratamiento con extracto de guayaba en ambas concentraciones favorecieron el desarrollo de la planta y controlaron la enfermedad, pues la incidencia y la severidad fueron menores que en los controles.
- 3- El extracto vegetal de nanche redujo los días de emergencia y estimuló la altura de la planta.
- 4- Los cormos inoculados con solución de esporas y tratados con los extractos tuvieron un menor tiempo de emergencia y una menor incidencia de la enfermedad.
- 5- Los cormos tratados con la combinación de guayaba y quitosano mostraron el menor porcentaje de infección, sembrados en suelo estéril.
- 6- La severidad e incidencia de la enfermedad fue mayor en suelo estéril
- 7- En suelo no estéril se obtuvo un mejor desarrollo fenológico de la planta.
- 8- En los extractos vegetales se identificaron diferentes familias de compuestos químicos, entre los que destacan los monoterpenos, sesquiterpenos y ácidos grasos, algunos reportados con actividad antifúngica.

7. 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 Soil Biology and Biochemistry* 30: 643-649.

abcagro.com:<http://www.infoagro.com/flores/flores/gladiolo.htm> Recuperado el 25 de enero de 2011.

Alexander, M. 1980. Introducción a la microbiología del suelo. AGT EDITOR, S. A. ISBN 968-462-002-0. 483 p.

Allan, C.R.; Hadwiger, L.A. 1979. The fungicidal effect of chitosan on fungi of varying cell wall composition. *Experimental Mycology* 3: 285-287.

Amir, H.; Alabouvette, C. 1993. Involvement of soil abiotic factors in the mechanisms of soil suppressiveness to fusarium wilts. *Soil Biology and Biochemistry* 25: 157-164.

Anónimo, 2009. Flores y Follajes Ornamentales Vol. III No. 21. 40 p.

Anónimo, 2010. Cultivo de Gladiolo. Proyecto Estratégico para la Seguridad Alimentaria Unidad Técnica Nacional. Región Altos de Chiapas. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. 36 p.

Barrera, L.L.; Garduño, C.; García, 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: 17-21.

Barrera, L.L.; García, L. J. 2008. Actividad antifúngica de aceites esenciales y sus compuestos sobre el crecimiento de *Fusarium* spp. aislado de papaya (*Carica papaya*). *Revista UDO Agrícola* 8: 33-41.

Bautista-Baños, S.; Barrera-Necha, L.; Bravo-Luna, L.; Bermúdez-Torrez, K. 2002a. Antifungal activity of leaf and stem extracts from various plant species on the incidence of *Colletotrichum gleosporioides* of papaya and mango fruit after storage. *Revista Mexicana de Fitopatología* 20: 8-12.

- Bergman, B. H. 1995. Ziekten en afwijkingen bij bolgewassen: deel 2. 182 p.
- Bòlos, O.; Vigo, J. 2001. Flora dels Països Catalans IV. Barcelona. En: López, J. A.; Sánchez, P.; Carrión, M. A.; Hernández, A.; González, A. 2003. Revisión taxonómica y aportaciones corológicas para el género *Gladiolus* L. (Iridaceae) en la región de Murcia. *Anales de Biología* 25: 29-36.
- Booth, C. 1970. *Fusarium oxysporum* CMI descriptions of plant pathogenic fungi and bacteria. Common wealth Agricultural Bureaux, London. 211 p.
- Booth, C. 1975. The present status of *Fusarium* taxonomy. *Annual review of Phytopathology* 13: 83-93.
- Bosland, P.W. 1988. *Fusarium oxysporum* a pathogen of many plant species. *Advances in Plant Pathology* 6: 281-289.
- Buschman, J.C.M. 1985. Gladiolo como flor cortada en zonas tropicales y subtropicales. Centro Internacional de Bulbos y Flores. Hillegan, Holanda. 32 p.
- Cakir A.; Kordali, S.; Zengin, H.; Izumi, S.; Hirata, T. 2004. Composition and antifungal activity of essential oils isolated from *hypericum hysoppifolium* and *hypericum heterophyllum*. *Journal of Flavors and Fragrance* 19: 62-60.
- CESVMOR, 2005. Comité Estatal de Sanidad Vegetal del estado de Morelos A.C. Manual técnico fitosanitario del cultivo de gladiolo. Cuernavaca, Morelos.
- Chalate, H; San Juan, R; Diego, G; Pérez, P. 2008. Programa estratégico de necesidades de investigación y transferencia de tecnología de la cadena productiva horticultura ornamental en el estado de Veracruz. 120 p.
- Chang, H. T.; Cheng, Y. C.; Chang, S. T.; Chang, T. T.; Su, Y. C. 2008. Antifungal activity of essential oil and its constituents from *Calocedrus macrolepis* var. *formosana* Florin leaf against plant pathogenic fungi. *Journal of Bioresource Technology* 99: 6266-6270.

Chung, W.H.; Chung, W.C.; Ting, P.F.; Ru, C.C.; 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 Taiwan. Journal of Phytopathology 157: 742-747

Cook, R.J.; Baker, K.F. 1983. The nature and practice of biological control of plant pathogens. American Phytopathology Society Press. St Paul, MN. 539 p.

Córdova, 2010. Caracterización morfológica y molecular de aislados patogénicos de *Fusarium* spp. de cormos de gladiolo y su sensibilidad al aceite de *Jatropha curcas* L. Instituto Politécnico Nacional. Tesis de Maestría. 117 p.

Cruz, R. M. 2005. Fertilización fosfatada en gladiolo (*Gladiolus glandiflorus* L.) sembrado en Cocula, Guerrero. Tesis de licenciatura. Colegio Superior Agropecuario del Estado de Guerrero. 43 p.

Ellis, D. 2011. School of Molecular & Biomedical Science. The University of Adelaide, Australia. Disponible en: [http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal_Descriptions/Hyphomycetes_\(hyaline\)/Fusarium/oxysporum.html](http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal_Descriptions/Hyphomycetes_(hyaline)/Fusarium/oxysporum.html)

Elshehry, E. 2010. Plant extracts for biological control of some plant pathogenic fungi. Editorial Lap Lambert. ISBN 978-3-8383-5815-4. 97 p.

Espinosa, M.; Centurión, D.; López, B.; Vera, J.; Cázares, G. 2008. Actividad antifúngica de ciruela *Spondias purpurea* y guayaba agria *Psidium friedrichsthalianum*. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Semana de divulgación y video científico.

Fernández, R.J.; Suárez, C.L. 2009. Antagonismo in vitro de *Trichoderma harzianum* Rifai sobre *Fusarium oxysporum* Schlecht f. sp. *passiflorae* en Maracuyá (*Passiflorae dulis* Sims var. *Flavicarpa*) del municipio Zona Bananera Colombiana. Revista Facultada Nacional de Agronomía de Medellín 62: 4743-4748.

Fondo Nacional de Estudios y Proyectos (FONEP). 1984. El cultivo de gladiolo en Villa Guerrero, Estado de México. 110 p.

Forsberg, J. L. 1955. *Fusarium* disease gladiolus: its causal agent. Bulletin III Natural History Survey 26: 447-503.

Forsyth, L.M.; Smith, L.J.; Aitken, E.A.B. 2006. Identification and characterization of non-pathogenic *Fusarium oxysporum* capable of increasing and decreasing fusarium wilt severity. Mycological Research 110: 929-935

Fravel, D.; Olivain, C.; Alabouvette, C. 2003. *Fusarium oxysporum* and its biocontrol. New Phytologist 157: 493-502.

Garcés, E.; Orozco, M.; Bautista, G.R.; Valencia, H. 2001. *Fusarium oxysporum*: el hongo que nos falta conocer. Acta biológica Colombiana. 6: 26 p.

García, J.; Alfaro, A. 1985. Inspección Fitosanitaria del bulbo de gladiolo: Estudio Basico. Boletín del Servicio contra Plagas e Inspección Fitosanitaria. 71 p.

García, P. 2010. Evaluación *in vitro* del quitosano e isotiocianatos en el desarrollo y morfología de *Fusarium oxysporum* Schelech sp. *gladioli* (MASSEY) SNYDER & HANSEN. Instituto Politécnico Nacional. Tesis de maestría. 83 p.

García, P.R.; Bautista, S. 2009. Estudio morfológico del quitosano y del isotiocianato de fenilo en *Fusarium oxysporum* f.sp. *gladioli* (Massey) Snyder and Hansen. Memorias del XI Congreso Internacional, XXXVI Congreso Nacional de Fitopatología A.C. Acapulco, Guerrero, México (Jun. 19-23). Resumen L-29.

Gardner, D. E. 1980. Acacia koa seedling wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *koae*, f. sp. nov. Phytopathology 70:594-597.

Garduño, 2009. Evaluación de polvos y extractos vegetales sobre el desarrollo de *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli* (Massey) Snyder y Hansen e identificación de compuestos volátiles. Instituto Politécnico Nacional. Tesis de maestría. 138 p.

Garduño, C.; Barrera, L.; Rios, Y. 2010. Evaluation of the fungicidal activity the leaves powders and extracts of fifteen Mexican plants against *Fusarium oxysporum* f. sp *gladioli*. (Massey) Snyder. y Hansen. Plant Pathology Journal 9: 79-87.

Garret, S.D. 1977. Pathogenic root-infecting fungi. Cambridge, Press. 294 p.

Glinski, J., Branly, K. L. 2002. Pentacyclic triterpenes. United States Patent 6, 433, 010. Disponible en: <http://www.freepatentsonline.com/6303589.html>.

Grey-Wilson, C.; Mathew, B. 1982. Bulbos: una guía de identificación de las plantas bulbosas de Europa. Barcelona. 289 p.

Griffin, D.H. 1994. Introduction to the fungi. In Fungal physiology 2nd edition, (D.H. Griffin, eds): Wiley-Liss, New York. 485 p.

Groenewald, S. 2006. Biology, pathogenicity and diversity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. Facultad on Natural and Agricultural Science University of Pretoria, Pretoria. Master's Dissertation. 158 p.

Heimann, M. F., Worf, G. L. 1997. Gladiolus disorder: Fusarium yellows and bulb rot. 4 p.

Herrero, M.; Ibáñez, E.; Cifuentes, E.; Reglero, G.; Santoyo, S. 2006. *Dunaliella salina* microalga pressurized liquid extracts as potential antimicrobial. Journal of Food Protection 69: 2471-2477.

Höper, H.; Alabouvette, C. 1996. Importance of physical and chemical properties in the suppressiveness of soils to plant diseases. European Journal of Soil Biology 32: 41-58.

Horticom.com: <http://www.horticom.com/pd/article.php?sid=53645> Recuperado el 25 de enero de 2011.

http://agrolink.com.br/agricultura/problemas/busca/necrose-do-pedunculo_1680.html.

Recuperado el 19 de noviembre de 2011.

<http://fichas.infojardin.com/bulbosas/gladiolus-gladiolo-gladiolos-espadilla.htm>

Recuperado el 19 de noviembre de 2011.

<http://www.gefor.4t.com/hongos/fusariumoxysporum.html> Recuperado el 19 de noviembre de 2011.

<http://www.prevalentfungi.org/subject.cfm?id=18666>. Recuperado el 19 de noviembre de 2011.

Karin, R.; Gracias, M.; Aparecida, M.; Alfonso, E.; Lemos, S.; Lee, D. 2010. Composition of the essential oil from the leaves of tree domestic varieties and one wild variety of the guava plant (*Psidium guajava* L., Myrtaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia* 20: 41-44.

Kistler, H.C. 1997. Genetic diversity in the plant-pathogenic fungus *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology* 87: 474-479.

Larson, R.A. 1988. Introducción a la Floricultura. A.G.T. Editor S.A. Méx. 664 p.

Larson, R.A. 2004. Introducción a la floricultura. Editorial AGT EDITOR S.A. ISBN: 968-463-127-8. 551 p.

Leslie, J.; Summerell, B.A. 2006. The *Fusarium* laboratory manual. Ed. Blackwell publishing. 388 p.

Leszczyńska, H.; Borys, M.W. 1994. Gladiola. Editorial EDAMEX, México. 166 p.

Lira, R.H.; Hernández, M.; Hernández, F.D. 2006. Activity of *Larrea tridentata* (D.C) Coville L. extracts and chitosan against fungi that affect horticultural crops. *Revista Chapingo Serie Horticultural* 12: 211-216.

Magie, 1968. Gladiolus flower and cormo production in relation to methods of curing corms. *Florida Agricultural Experiment Stations Journal Series No. 3120*: 428-431 pp.

Magie, R.O. 1980. Fusarium disease of gladioli of gladioli controlled by inoculation of corms whit non-pathogenic fusaria. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society* 93: 172-175.

- Martínez, R. 2010. Evaluación de métodos de inoculación de *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli* en cormos de gladiolo. Tesis de maestría Universidad Autónoma Chapingo, México. 70 p.
- Massey, L. M. 1922. Fusarium rot of gladiolus. *Phytopathology* 12: 53.
- McCulloch, L. 1944. A vascular disease of gladiolus caused by *Fusarium*. *Phytopathology*, 34: 263-287.
- Mendoza-Zamora, C. 1997. Certificación de estudios de efectividad biológica de plaguicidas. Ed. Cecilio Mendoza-Zamora-Universidad Autónoma de Chapingo. Texcoco, México. 50 p
- Millán, C. 2008. Las plantas: una opción saludable para el control de plagas. Red de acción en plaguicidas y sus alternativas para América Latina. 21 p.
- Mishra, P.; Mukhopadhyay, A.; Fox, R. 2000. Integrated and biological control of gladiolus corm rot and wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli*. *Annals of applied Biology* 137: 361-364.
- Montes-Belmont, R.; Prados-Ligero, A.M. 2006. Influence of plant extracts on *Sclerotium cepivorum* development. *Plant Pathology Journal* 5: 373-377.
- Nelson, P.E. 1981. Life cycle and epidemiology of *Fusarium oxysporum*. In M.E. Mace, A.A. Bell and C.C. H. Beckman. (Eds.) *Fungal wilt disease of plants*. Academic Press, New York. 51-80 pp.
- Nelson, P.E.; Toussoun, T.A.; Marasas, W.F.O. 1983. *Fusarium species*. An Illustrated Manual for Identification. ISBN: 0-271-00349-9. The Pennsylvania State University Press. University Park of London. 193 p.
- Ortega, S. 2008. Evaluación de un insecticida orgánico para el control de la mosquita blanca (*Trialeurodes vaporariorum*) en el cultivo de gladiolo en Cuautla Morelos. *Fitomonitor Agrícola*. 22 p.

Ram R., Manuja S., Dhyani D., Mukherjee D. 2004. Evaluations of fortified fungicide solutions in managing corm rot disease of gladiolus caused by *Fusarium oxysporum*. Crop Protection. 23: 783-788p.

Ramos-García, M.; Ortega-Centeno, S.; Hernández-Lauzardo, A.; Alia-Tejacal, I.; Bosquez-Molina, E.; Bautista-Baños, S. 2009. Response of gladiolus (*Gladiolus* spp) plants after exposure corms to chitosan and hot water treatments. Scientia Horticulture 121: 480-484.

Regnault-Roger, C.; Philogene, B.; Vincent, C. 2004. (Ed). Biopesticidas de origen vegetal. Ediciones Mundiprensa, Madrid. ISBN 84-84-76-194-0

Reid, M. S. 2004. Produce Facts Gladiolus. Recommendations for Maintaining Postharvest Quality. Postharvest Technology Research & Information Center.

Riaz, T.; Nawaz, S.; Javaid, A. 2008. Antifungal activity of plant extracts against *Fusarium oxysporum*- the cause of corm-rot disease of *Gladiolus*. Mycopathology 6 : 13-15.

Riaz, T.; Nawaz, S.; Javaid, A. 2009. Management of corm-rot disease of *Gladiolus* by plant extracts. Natural Product Research 1: 1-8.

Riaz, T.; Nawaz, S.; Javaid, A. 2009a. Effect of co-cultivation and crop rotation on corm rot disease of *Gladiolus*. Scientia Horticulturae 121: 218-222.

Riaz, T.; Nawaz, S.; Javaid, A. 2010. Management of *Fusarium* corm rot of gladiolus (*Gladiolus glandiflorus* sect. Blandus cv. Aarti) by using leaves of allelopathic plants. African Journal of Biotechnology 9: 4681-4686.

Romanazzi, G.; Nigro, F.; Polito, A. 2003. Short hypobaric treatments potentiate the effects of chitosan in reducing storage decay of sweet cherries. Postharvest Biology and Technology 29: 73-80.

Romero, S. 1994. Hongos Fitopatógenos. Universidad Autónoma Chapingo. ISBN: 968-884-042-4. 341 p.

Rouxel, F.; Alabouvette C.; Louvet, J. 1979. Recherches sur la resistance des sols aux maladies IV. Mise en évidence du rôle des *Fusarium* autochtones dans la résistance d'un sol à la fusariose vasculaire du melón. Annales de Phytopathology 11: 199-207.

RPD, Report on Plant Disease. Gladiolus corm rots. No. 651, November 1983. 6 p.

SAGARPA, 2004. Cartilla de Campo, Roya del gladiolo. Disponible en: www.senasica.sagarpa.gob.mx

SAGARPA, 2010. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. <http://www.siap.gob.mx> Recuperado el 12 de noviembre de 2011.

Salinger, J.P. 1991. Producción comercial de flores. Editorial Acriba, España. 371 p.

Scher, F.M.; Baker, R. 1980. Mechanism of biological control in a fusarium suppressive soil. Phytopathology 70: 412-417.

Schippers, B.; van Eck, W.H. 1981. Formation and survival of chlamydospores in *Fusarium*. In *Fusarium: Diseases, Biology and Taxonomy*, (P.E. Nelson, T.A. Toussoun, R.J. Cook, eds): The Pennsylvania State University Press, University Park and London. 250-260 pp.

Shakir, S.A.; Haq, E.; Ayub, M. 1998. Studies on pathogenicity and eradication of some fungal diseases of gladiolus in Pakistan. Pakistan Journal of Biological sciences 1: 23-26.

Shanmugam, V.; Kanoujia, N.; Singh, M.; Singh, S.; Prasad, R. 2011. Biocontrol of vascular wilt and corm rot of gladiolus caused by *Fusarium oxysporum* f.sp. *gladioli* using plant growth promoting rhizobacterial mixture. Crop Protection 30: 807-813.

Sharma, N.; Tripathi, A. 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: 246-254.

- Shibuya, N.; Minami, E. 2001. Oligosaccharide signaling for defence responses in plants. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 59: 223-233.
- Simone, G. W.; Cashion, G. 1996. Fusarium wilt of canary date palms in Florida. *Landscape and Nursery Digest*, May, 1996: 28-31.
- Taiz L, Zeiger E 1991. Surface protection and secondary defense compound. In: *Plant Physiology*. California: Benjamin/Cumming: 318-345.
- Vidalie, H. 1992. Producción de flores y plantas ornamentales. Segunda edición. Ediciones Mundi-prensa. Madrid, España. Pág. 310 p.
- Vigodsky, H. 1970. Response of gladiolus corms to hot water treatment. *Journal Horticultural Science*. 45: 331-339.
- Weinert, O. 2005. La guerra de las plantas. ALELOPATÍA. Universidad de Concepción. 26 p.
- Yasuo, T.; Tomomi, H.; Satoko, M.; Kazunori, T. 2002. Effect of sucrose fatty acid esters, monoglycerol and polyglycerol fatty acid ester on in vitro growth of *Botrytis cinerea* PEAS. and on postharvest control of rot in fruits. *Food Preserve Science* 28: 227-234
- Yenjit, P.; Issarakraisila, M.; Intana, W.; Chantrapromma, K. 2010. Fungicidal activity of compounds extracted from the pericarp of *Areca catechu* against *Colletotrichum gleosporioides* in vitro and in mango fruit. *Postharvest Biology and Technology* 55: 129-132.