

Enfermedades del Jitomate (*Solanum lycopersicum*) Cultivado en Invernadero en la Zona Centro de Michoacán

Greenhouse Grown Tomato (*Solanum lycopersicum*) Diseases in the Central Region of Michoacan

Gerardo Rodríguez Alvarado, Jorge García López y Sylvia Patricia Fernández Pavía, Laboratorio de Patología Vegetal, IIAF, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, km. 9.5 Carr. Morelia-Zinapécuaro, Tarímbaro, Michoacán, CP 58880, México. Correspondencia: fernandezpavia@hotmail.com

(Recibido: Octubre 16, 2010 Aceptado: Diciembre 07, 2010)

Rodríguez Alvarado, G., García López, J. y Fernández Pavía, S.P. 2011. Enfermedades del Jitomate (*Solanum lycopersicum*) Cultivado en Invernadero en la Zona Centro de Michoacán. Revista Mexicana de Fitopatología 29:50-60.

Rodríguez Alvarado, G., García López, J. and Fernández Pavía, S.P. 2011. Greenhouse Grown Tomato (*Solanum lycopersicum*) Diseases in the Central Region of Michoacan. Revista Mexicana de Fitopatología 29:50-60.

Resumen. En los últimos años se ha incrementado el número de invernaderos dedicados al cultivo de jitomate en Michoacán. El alto potencial de rendimiento que se podría obtener utilizando sistemas de cultivo bajo cubierta, no se ha logrado en algunos invernaderos debido a la presencia de enfermedades, desconocidas en la mayoría de los casos. Los objetivos de este trabajo fueron determinar la incidencia y la etiología de las principales enfermedades que afectan al cultivo de jitomate de invernadero en la zona centro de Michoacán. Se realizaron muestreos de marzo a octubre del 2007 en seis invernaderos comerciales localizados en cuatro municipios. Las principales enfermedades que se detectaron fueron marchitez de plántulas y plantas maduras, tizón tardío, peca bacteriana y cenicilla polvorienta. Los patógenos que se identificaron fueron: *Phytophthora infestans*, *Oidiopsis taurica*, *Rhizoctonia* spp., *Fusarium oxysporum*, *Oidium neolycopersici* y *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. Las enfermedades más importantes por su alta incidencia y severidad fueron el tizón tardío causado por *P. infestans* y la cenicilla ocasionada por *O. neolycopersici*.

Abstract. During the past years there has been an increase in the number of tomato greenhouse facilities in Michoacan. The expected high yield for some of these greenhouses has not been attained due mainly to the presence of tomato diseases, which in many cases, the identity of the pathogen is unknown. The objectives of this research were to determine the incidence and the etiology of the main diseases affecting greenhouse grown tomato in central Michoacan. Sampling was carried out in six commercial tomato greenhouses located in four municipalities from March to October 2007. The main diseases detected were wilting of young and mature plants, late blight, bacterial speck and powdery mildew. The identified pathogens were *Phytophthora infestans*, *Oidiopsis taurica*, *Rhizoctonia* spp., *Fusarium oxysporum*, *Oidium neolycopersici* and *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. Late blight caused by *P. infestans* and mildew caused by *O. neolycopersici* were the most important diseases detected due to the high disease incidence and severity.

Additional keywords: Late blight, mildew, *Oidium neolycopersici*, hydroponic.

Palabras clave adicionales: Tizón tardío, cenicilla, *Oidium neolycopersici*, hidroponia.

El jitomate (*Solanum lycopersicum* L.) es una de las hortalizas más ampliamente cultivadas en invernadero en el ámbito mundial (Sánchez del Castillo *et al.*, 2009). La producción y exportación de jitomate en Michoacán ocupa el segundo lugar de importancia a nivel nacional. Durante el ciclo otoño-invierno 2008-2009, se obtuvieron 24,161 toneladas, con un promedio de 22 t ha⁻¹ (SAGARPA, 2009). El cultivo del jitomate en Michoacán es importante porque genera divisas e impulsa la economía de las regiones donde se produce. Por otra parte, en las últimas décadas se ha expandido la producción de hortalizas en invernaderos que utilizan

Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) is one of the most widely greenhouse grown vegetables worldwide (Sánchez del Castillo *et al.*, 2009). Tomato production and exportation in Michoacan ranks second place at a national level. During the fall-winter cycle of 2008-2009, 24,161 tons were obtained, with an average of 22 t ha⁻¹ (SAGARPA, 2009). The production of tomato in Michoacan is very important because it generates foreign exchange and promotes the economy of the regions where it is grown. On the other hand, the production of vegetables in greenhouses using hydroponic systems and fertigation has expanded in recent decades. These irrigation systems reduce the limitations set by the weather, water and nutrients. Recently, there has been an

sistemas hidropónicos y fertirriego. Estos sistemas de irrigación reducen las limitaciones dadas por el clima, agua y nutrimentos. Recientemente, se ha incrementado el establecimiento de invernaderos dedicados a la producción de jitomate en hidroponía en el estado de Michoacán. El potencial de producción ha⁻¹ de invernadero es de aproximadamente 400 t ha⁻¹ año⁻¹ (Van de Vooren *et al.*, 1986; Winsor y Schwarz, 1990 citado por Sánchez-del Castillo *et al.*, 2009); sin embargo, en algunos invernaderos aún no se ha alcanzado dicho potencial, debido principalmente a la presencia de enfermedades causadas por hongos, bacterias y virus. Entre las enfermedades que se han reportado en la producción de jitomate en Michoacán se encuentran la cenicilla causada por *Oidium neolycopersici*, pudrición de fruto ocasionada por *Phytophthora capsici* Leonian y agallamiento de la raíz causado por *Meloidogyne incognita* (Kofoed & White) Chitwood (Fernández-Pavía *et al.*, 2008). Para asegurar el éxito económico en la producción de jitomate, es importante mantener a las plantas libres de enfermedades causadas por patógenos y reducir a un mínimo la presencia de las plagas que transmiten las diversas enfermedades virales que afectan al cultivo. Por lo cual la correcta identificación de los patógenos permitirá establecer mejores estrategias de control a largo plazo (PPATH Cornell, 2006). En invernaderos de jitomate de algunos estados del país, como Morelos, se han hecho estudios de las enfermedades que están presentes (Espinosa-Zapata, 2004; Ortega-García *et al.*, 2010), sin embargo, en Michoacán no se cuenta con esta información. El propósito de este trabajo fue determinar la incidencia e identidad de los patógenos más importantes en el cultivo de jitomate de invernadero en la región central de Michoacán.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio se llevó a cabo en seis invernaderos comerciales con producción de jitomate localizados en los municipios de Copándaro de Galeana, Morelia, Tarimbaro y Zinapécuaro, los cuales están ubicados entre los paralelos 19°53' y 19°35' N, y 100°55' y 101°16' O, en la región centro-norte del estado de Michoacán. La altitud oscila entre los 1796 y 1862 msnm. Predomina el clima templado con humedad media, con una precipitación anual en verano que oscila entre 700 a 1000 mm y lluvias invernales máximas de 5 mm y una temperatura media anual de 18.7°C. Los invernaderos fueron seleccionados al azar de un total de 16 invernaderos presentes en la región de estudio.

Características de los invernaderos muestreados.

Los invernaderos analizados en este estudio presentaron diversas características en cuanto al tipo de jitomate cultivado, al tipo de manejo cultural y en la estructura del invernadero (Cuadro 1). Se realizaron tres visitas a cada uno de los invernaderos seleccionados durante el periodo de marzo a octubre del 2007.

Determinación del tamaño de muestra. En cada invernadero se estimó el número de plantas, y con base a ese número, se seleccionó el tamaño de muestra. Para determinar el tamaño de muestra, se utilizó la fórmula $n = N/1 + N(e)^2$, donde N es el total de individuos en el invernadero y $(e)^2$ es el

increase in the number of greenhouse facilities dedicated to hydroponic tomato production in the state of Michoacan. The potential production of greenhouse farming is an estimated 400 t ha⁻¹ year⁻¹ (Van de Vooren *et al.*, 1986; Winsor and Schwarz, 1990 cited by Sanchez-del Castillo *et al.*, 2009); however, in some greenhouses the potential has not yet been reached, due mainly to the presence of diseases caused by fungi, bacteria and viruses. Among the diseases that have been reported in Michoacan's tomato production are powdery mildew caused by *Oidium neolycopersici*, fruit rot caused by *Phytophthora capsici* Leonian and root galling caused by *Meloidogyne incognita* (Kofoed & White) Chitwood (Fernández-Pavía *et al.*, 2008). To ensure the economic success in the production of tomatoes, it is important to keep the plants free of pathogen that cause diseases and reduce to a minimum the presence of pests that transmit various viral diseases that affect tomatoes. Therefore the correct identification of the pathogens will allow better long-term control strategies to be established (PPATH Cornell, 2006). In tomato growing greenhouse facilities of some states, such as Morelos, there has been research done on the diseases that are locally present (Espinosa-Zapata, 2004; Ortega-García *et al.*, 2010) however, Michoacan does not count with such information. The purpose of this study was to determine the incidence and identity of the most important pathogens in the greenhouse grown tomato in the central region of Michoacan.

MATERIALS AND METHODS

This study was conducted in six commercial tomato producing greenhouses located in the municipalities of Copandaro de Galeana, Morelia, Tarimbaro and Zinapécuaro, which are located between latitudes 19°53' and 19°35' N and between longitude 100°55' and 101°16' W, in the central-north region of the state of Michoacan. The altitude ranges between 1796 and 1862 m. A temperate climate predominates the area with medium humidity, with annual summer rainfall ranging between 700 to 1000 mm and maximum winter rainfall of 5 mm and a mean annual temperature of 18.7°C. The greenhouses were selected at random from a total of 16 greenhouses located in the studied region.

Characteristics of the studied greenhouses. The analyzed greenhouses in this study had different characteristics as far as to the type of tomato harvested, the kind of cultural management and the structure of the greenhouse itself (Table 1). Three visits were made to each one of the selected greenhouses during the period from March to October 2007.

Determination of sample size. In each greenhouse, the number of plants was estimated, and based on that number, a sample size was selected. To determine the sample size the formula $n = N/1 + N(e)^2$ was used, where N is the total number of units in the greenhouse and $(e)^2$ is the level of accuracy to the square. The level of accuracy that was used was $\pm 3\%$ with a confidence level of 95% (Israel, 2009).

Sampling procedure in the greenhouse. Once the sample size for each greenhouse was established, the number of rows needed to cover the sample was determined. Rows were selected at random and their aisles were walked to

nivel de precisión al cuadrado. El nivel de precisión que se usó fue de $\pm 3\%$ con un nivel de confianza de 95% (Israel, 2009).

Procedimiento de muestreo en el invernadero. Una vez establecido el tamaño de muestra para cada invernadero, se determinó el número de hileras necesario para cubrirlo. Se seleccionaron las hileras al azar y se recorrieron los pasillos de éstas examinando las plantas de jitomate para determinar los síntomas presentes en cada una de ellas. El estudio constó de dos aspectos: a) cuantificación de la incidencia de cada una de las enfermedades detectadas, fungosas, bacterianas y las causadas por oomicetos; y b) muestreo de plantas con síntomas de enfermedades para determinar el agente causal en el laboratorio.

Tipos de muestras. Se colectaron diversos tejidos de las plantas que presentaron síntomas: a) raíces y tallo de plantas con marchitez; b) folíolos con lesiones necróticas; c) folíolos con micelio de plantas con cenicilla; y d) tallos con necrosis. Las muestras se colocaron en bolsas de plástico etiquetadas en una hielera para preservarlas durante su traslado al laboratorio. En el laboratorio las bolsas con las muestras se colocaron a 4°C en un refrigerador hasta su procesamiento.

Procesamiento de las muestras. En el caso de algunos síntomas foliares causados por hongos, las hojas colectadas se colocaron en cámara húmeda por 24 h para inducir el crecimiento de los hongos patógenos. Posteriormente, se procedió a realizar preparaciones de las estructuras que se desarrollaron sobre el tejido las cuales se observaron con un microscopio compuesto.

Raíz y tallo. En el caso de síntomas de marchitez se hicieron aislamientos a partir de la base del tallo y de raíz. Se colocó el tejido enfermo de las muestras en agua con jabón por 10 min, posteriormente se enjuagaron con agua de la llave, enseguida se colocaron en agua destilada estéril, se desinfectaron con cloro comercial al 10% por 60 a 90 seg, se enjuagaron dos veces con agua destilada estéril, se colocaron en papel secante estéril para quitar el exceso de humedad y se cortaron las secciones de tejido. Éstas se sembraron en medio PDA y en medio de hojas de clavel agar (CLA, por sus siglas en inglés) y se incubaron a 25°C. Posteriormente se transfirieron puntas de hifa de las colonias para obtener cultivos puros para caracterizarlos morfológicamente e identificarlos.

Folíolos. En el caso de síntomas de tizón tardío se lavaron los folíolos y se colocaron en cámara húmeda para inducir la esporulación. Para la obtención de aislamientos a partir de las lesiones con esporulación, se utilizaron rodajas de papa siguiendo el protocolo descrito por Fernández-Pavía *et al.* (2005). Los aislamientos obtenidos en medio selectivo se transfirieron a medio de centeno agar. Asimismo, de los folíolos con esporulación se hicieron preparaciones para observar las características morfológicas del patógeno e identificarlo. Los aislamientos de oomicetos obtenidos se purificaron por medio de punta de hifa y se observaron las estructuras reproductivas. Se determinó el tipo de compatibilidad de los aislamientos realizando cruces con cepas de tipo de compatibilidad conocido siguiendo el protocolo descrito por Fernández-Pavía *et al.* (2005). En el

determine disease symptoms present in each one of them. The study consisted of two aspects: a) quantification of the incidence of each one of the detected diseases, fungal, bacterial and those caused by oomycetes; and b) the sampling plants with symptoms of disease to determine the causative agent in the laboratory.

Types of samples. Various tissue samples were collected from plants which presented symptoms: a) root and plant stems with wilt; b) leaflets with necrotic lesions; c) leaflets with mycelium of plants with powdery mildew; and d) stems with necrosis. The samples were placed in labeled plastic bags in a cooler to preserve them during transport to the laboratory. Once in the laboratory, the bags with the samples were placed in a refrigerator at a temperature of 4°C until processed.

Sample processing. In the case of foliar symptoms caused by fungi, the collected leaves were placed in a moist chamber for 24 h to induce the growth of the pathogenic fungi. Then, preparations were made from the structures that developed on the tissue which were observed in a compound microscope.

Root and stem. In the case of wilt symptoms, isolations were made from the base of the stem and the root. The affected tissue from the samples was placed in soap and water for 10 min, and then rinsed with tap water. Next they were placed in sterile distilled water, and disinfested with commercial chlorine (10% concentration) for 60 to 90 seconds. Immediately after, they were rinsed twice with sterile distilled water, placed in sterile blotting paper to remove excess moisture and the tissue sections were cut. These were planted out on PDA medium and carnation leaf agar (CLA) and were incubated at 25°C. Subsequently hypha tips were transferred from the colonies to obtain pure cultures to characterize and identify them morphologically.

Leaflets. In the case of symptoms of late blight, the leaflets were washed and placed in a moist chamber to induce sporulation. To obtain isolates from the lesions with sporulation, potato slices were used following the protocol described by Fernández-Pavía *et al.* (2005). The isolates obtained on selective media were transferred to a rye agar medium. Also, preparations were made from the leaflets with sporulation to observe the morphological characteristics and identify the pathogen. The oomycete isolates obtained were purified using hyphae tips and the reproductive structures were then observed. The compatibility type of the isolates was determined by making crosses with strains of a known compatibility type following the protocol described by Fernández-Pavía *et al.* (2005). In the case of powdery mildew symptoms, preparations were made to determine the morphological characteristics of the mycelium, conidia and conidiophores. Clear adhesive tape was used by placing it on the structures of the fungus, and then was adhered to a slide using a drop of lactic acid.

Identification of the pathogens. The identity of the causal agents of fungal and oomycete type was determined based on the morphological characteristics observed on the infected tissue and in pure cultures (Erwin and Ribeiro, 1996; Barnett and Hunter, 1998; Braun *et al.*, 2002). The

caso de los síntomas de cenicilla polvorienta se hicieron preparaciones para determinar las características morfológicas del micelio, conidios y conidióforos. Se utilizó cinta adhesiva transparente colocándola sobre las estructuras del hongo, y ésta se pegó sobre un portaobjetos con una gota de ácido láctico.

Identificación de los patógenos. La identidad de los agentes causales de tipo fungoso y oomicetos, se determinó en base a las características morfológicas que se observaron en el tejido infectado y en los cultivos puros (Erwin y Ribeiro, 1996; Barnett y Hunter, 1998; Braun *et al.*, 2002). La identificación de bacterias patógenas se hizo en base a sintomatología, color y tipo de la colonia, tinción de Gram y pruebas bioquímicas (Jones *et al.*, 1991; Schaad *et al.*, 2001).

Pruebas de patogenicidad. Se realizaron únicamente con los patógenos obtenidos de las enfermedades tizón tardío y cenicilla, debido a que éstas fueron las de mayor importancia. Para tizón tardío se realizaron inoculaciones de ocho aislamientos en folíolos de jitomate cv. 'ACE', utilizando tres folíolos por aislamiento. Se siguió el siguiente protocolo: Los aislamientos se crecieron en medio de centeno agar durante 17 días a 20°C. A cada caja se le adicionaron 5 mL de agua destilada estéril y se frotó el micelio con un hisopo estéril para desprender los esporangios. La suspensión resultante se colectó en un vaso de precipitados estéril y se colocó a 4°C por 2 h. Posteriormente se colocó a 25°C por 30 min para inducir la liberación de zoosporas, la cual se observó con el microscopio óptico. En los casos en los que no se presentó liberación de zoosporas, la inoculación se realizó con esporangios. Los folíolos se colocaron en cámara húmeda a 25°C y se inocularon con 20 µl de una suspensión de 10³ esporangios o zoosporas por ml, en cuatro puntos. Se observó si presentaban esporulación, siete días después de la inoculación. Se inocularon tres folíolos de jitomate con agua destilada estéril como testigo. En el caso de la cenicilla se inocularon plántulas sanas de jitomate tipo saladette híbrido 'Reserva' (Vilmorin, Inc.) con cuatro hojas verdaderas. El inóculo se tomó de plantas de jitomate con cenicilla colectadas en los invernaderos visitados. Se utilizó un cepillo para transferir micelio y conidios a las plántulas sanas, las cuales se cubrieron con bolsas de plástico humedecidas durante 24 h. Las plántulas inoculadas se mantuvieron a 22±5°C hasta que se observaron síntomas. Dos plantas de jitomate que no fueron inoculadas fueron utilizadas como testigo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Observaciones generales sobre los invernaderos. Los invernaderos visitados han estado en operación con cultivos de jitomate entre 5-10 años; con excepción del invernadero 3, el cual inició su operación el año en que se llevó a cabo este estudio (comunicación personal de los operadores). Los invernaderos 4, 5 y 6 presentaron cultivos de jitomate de edad avanzada con fechas de siembra entre julio y agosto de 2006. Mientras que los demás invernaderos presentaban cultivos con fechas de siembra de febrero a marzo de 2007. En algunos invernaderos, excepto los invernaderos 3 y 6, los restos vegetales del ciclo anterior se

identificación de patógena bacteria was made based on symptoms, color and type of colony, Gram's method and biochemical tests (Jones *et al.*, 1991; Schaad *et al.*, 2001).

Pathogenicity tests. These tests were made only with pathogens collected from late blight and powdery mildew diseases, due to the fact that these were the most important. For late blight, inoculations were performed with on eight isolates of tomato leaflets cv. 'ACE', using three leaflets per isolate. The following protocol was used: The isolates were grown on a rye agar medium for 17 days at 20°C. Five milliliters of sterile distilled water was added to each plate and the mycelium was rubbed with a sterile swab to dislodge the sporangia. The resulting suspension was collected in a sterile beaker and placed at 4°C for 2 h. Subsequently placed at 25°C for 30 min to induce the release of zoospores, which was detected with the use of an optical microscope. In cases in which there was no release of zoospores, inoculation was performed with sporangia. The leaflets were placed in a moist chamber at 25°C and were inoculated with 20 µl of a suspension of 10³ sporangia or zoospores per ml, in four points. They remained in observation for the seven days following the inoculation to detect sporulation. Three tomato leaflets were inoculated with sterile distilled water as control. In the case of powdery mildew, healthy tomato plants type saladette hybrid 'Reserva' (Vilmorin, Inc.) with four true leaves were inoculated. The inoculum was taken from tomato plants with powdery mildew collected in the greenhouses visited. A brush was used to transfer mycelium and conidia to healthy seedlings, which were moistened and covered with moistened plastic bags for 24 h. The inoculated seedlings were maintained at 22±5°C until symptoms were observed. Two non-inoculated tomato plants were used as a control.

RESULTS AND DISCUSSION

General comments on the greenhouses. The visited greenhouses have been in operation with tomato crops between five and 10 years; with the exception of greenhouse 3, which started operations in the same year that this study was performed (personal communication from operators). Greenhouses 4, 5 and 6 had tomato crops of an advanced age with planting dates between July and August, 2006 while the other greenhouses had tomato plants sown from February to March 2007. In some greenhouses, with the exception of greenhouses 3 and 6, the plant remains from the previous cycle were placed in the vicinity of the greenhouse, the damaged plastic cover was not immediately replaced, the aisles in between rows had excess water and the presence of some weeds in the interior of the greenhouse was not uncommon (Table 1). The diseases that are reported in this study were detected since the first visit to each greenhouse.

Pathogen identification. In greenhouse 3 no diseases were detected, it was recently built and of a high technological level (Table 1). Also, the hybrid grown ('Sun 7750') is resistant to various diseases (Ficha técnica, 2011).

Late blight. The disease was detected only in greenhouses 4 and 5, where plants were older. Necrotic lesions were observed irregularly on leaflets, stems and fruit, typical of late blight. On leaflets lesions were present in the

colocaban en la vecindad del invernadero, no se renovaba inmediatamente la cubierta plástica dañada, los pasillos entre camas presentaban exceso de agua y algunas malezas al interior del invernadero eran comunes (Cuadro 1). Las enfermedades que se reportan en este trabajo fueron observadas a partir de la primera visita a cada invernadero.

Identificación de patógenos. En el invernadero 3 no se detectaron enfermedades, este era de reciente construcción y de nivel tecnológico alto (Cuadro 1). Asimismo, el híbrido sembrado 'Sun 7750' presenta resistencia a diversas enfermedades (Ficha técnica, 2011).

Tizón tardío. Esta enfermedad se detectó únicamente en los invernaderos 4 y 5, en donde las plantas eran de edad

form of a yellowish colored halo; on immature fruit, irregular brown spots were observed (Figure 1A), and stems showed necrotic spots. Generally, infections were initiated in the sepal, so the symptoms covered the upper half of the fruit. Preparations of the samples placed in moist chambers revealed the formation of coenocytic mycelium, sporangia from oval to lemon shaped, deciduous and with a superficial cavity and swollen sporangiophores. According to the symptoms observed in the samples and the morphological characteristics of the structures observed in the microscope, the pathogen was identified as *Phytophthora infestans* (Erwin and Ribeiro, 1996), of which eight isolates were obtained. It was determined that all isolates were heterothallic showing

Cuadro 1. Tipos de jitomate y características de los invernaderos utilizados para determinar las principales enfermedades en la zona centro de Michoacán.

Table 1. Tomato types and characteristics of the greenhouses used to determine the main diseases in the central area of Michoacán.

Invernadero	Localidad	Tipo de Jitomate	Híbrido/ Variedad	Tipo de Crecimiento	Tipo de cultivo/Nivel tecnológico*	Tipo de Invernadero
1	Copándaro, Copándaro de Galeana	Saladette	Toro F1	Determinado	Fertirreigo/ Medio	Baticentennial
2	Copándaro, Copándaro de Galeana	Saladette	Cimabue	Indeterminado	Hidropónia/ Medio	Capilla
3	Uruetaro, Tarimbaro	Saladette	Sun 7705	Indeterminado	Hidropónia/ Alto	Baticentennial
4	Atécuaro, Morelia	Bola	Silvana	Indeterminado	Organopónia/ Bajo	Baticentennial
5	Uruapilla, Morelia	Saladette	Reserva F1	Indeterminado	Hidropónia/ Bajo	Capilla
6	Francisco Villa, Zinapécuaro	Saladette	Sun 7705	Indeterminado	Hidropónia/ Alto	Baticentennial en batería

*Alto= cubierta plástica en buen estado, restos del cultivo anterior eliminados, ausencia de malezas en el invernadero, pasillos limpios y secos.

Medio= con una o más de las siguientes características: cubierta plástica con daños, restos del cultivo anterior colocados fuera del invernadero, malezas dentro del invernadero, pasillos húmedos.

Bajo= semi abandonados.

avanzada. Se observaron lesiones necróticas de forma irregular en folíolos, tallos y frutos, típicas del tizón tardío. En folíolos las lesiones presentaron un halo amarillento; en frutos inmaduros, se observaron manchas pardas irregulares (Figura 1A), y los tallos presentaban manchas necróticas. Generalmente, las infecciones se iniciaron en el cáliz, por lo cual los síntomas cubrían la mitad superior del fruto. En las preparaciones de las muestras colocadas en cámara húmeda se observó la formación de micelio cenocítico, esporangios semipapilados de ovoides a limoniformes y caducos,

plerotic oospores. Only mating type A2 was detected which is indicative of a clonal population, in contrast, in populations of *P. infestans* obtained from tomato fields of Michoacan, both mating types have been reported, suggesting that under field conditions the pathogen is reproducing sexually which favors its genetic diversity (Fernández-Pavía *et al.*, 2006). In greenhouses 4 and 5 *P. infestans* was detected with an incidence of 80 and 95%, respectively, during the months of May and June, time of the year when the rainy season starts in the region where these greenhouses are located. Which

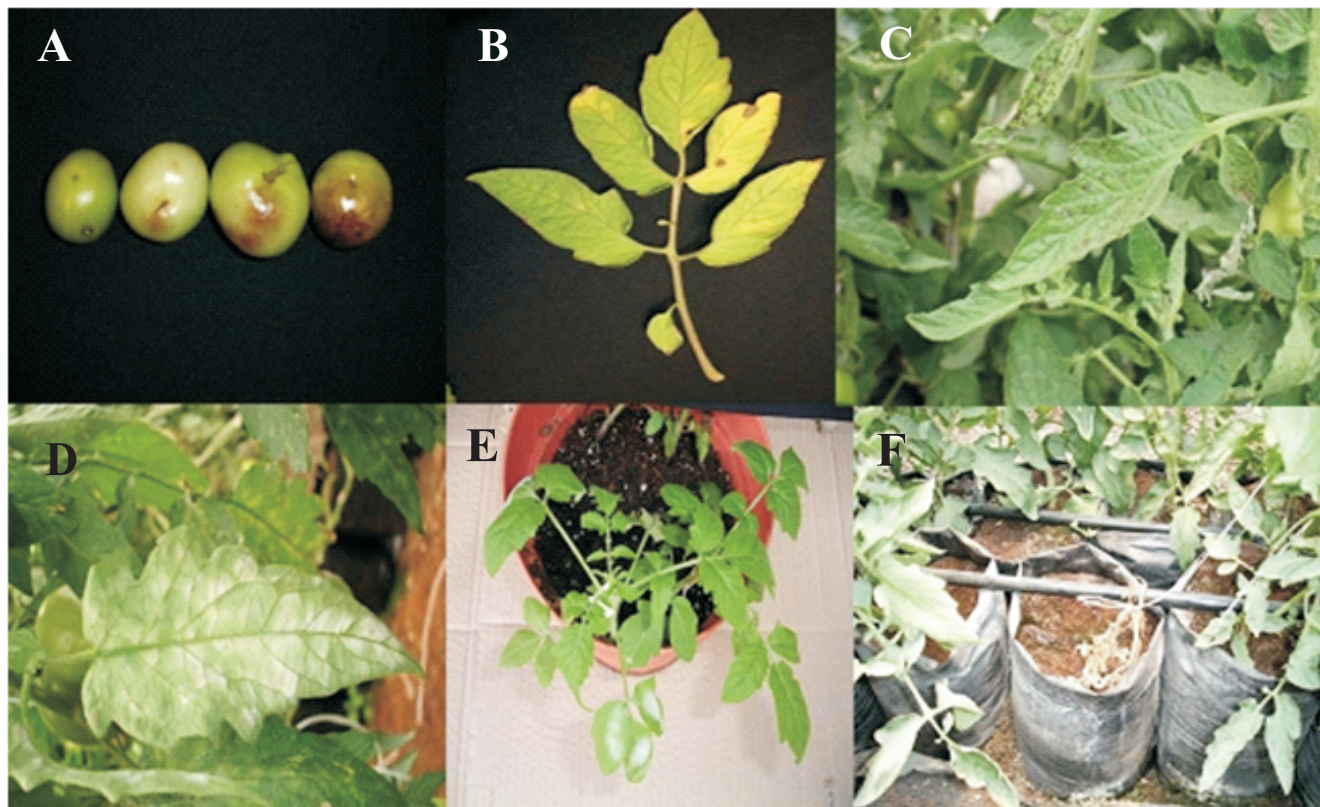


Figura 1. Síntomas causados por diversos patógenos en plantas de jitomate de invernadero en Michoacán. **A.** Tizón tardío, lesiones necróticas en frutos causadas por *Phytophthora infestans*. **B.** Cenicilla, lesiones cloróticas y necróticas causadas por *Oidiopsis taurica*. **C.** Peca bacteriana, lesiones necróticas causadas por *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. **D.** Cenicilla, micelio y conidios de *Oidium neolycopersici* cubriendo haz y envés de foliolos. **E.** Cenicilla, planta inoculada. **F.** Marchitez, síntoma avanzado de marchitez causado por *Fusarium* y/o *Rhizoctonia*.

Figure 1. Symptoms cauded by diverse phathogens on tomató plants in greenhouse in Michoacan. **A.** Late blight, necrotic injures on fruits caused by *Phytophthora infestans*. **B.** Mildew, chlorotic and necrotic injures caused by *Oidiopsis taurica*. **C.** Bacterial speck, necrotic spots caused by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. **D.** Powdery mildew, mycelium and conidia of *Oidium neolycopersici* on upper and underside of leaflets. **E.** Mildew, inoculated plant. **F.** Wilt, advanced symptoms of wilt caused by *Fusarium* and/or *Rhizoctonia*.

esporangióforos con hinchamientos. De acuerdo con los síntomas observados en las muestras y las características morfológicas de las estructuras observadas en el microscopio, se identificó al patógeno como *Phytophthora infestans* (Erwin y Ribeiro, 1996), del cual se obtuvieron ocho aislamientos. Se determinó que todos los aislamientos fueron heterotáticos presentando oosporas pleróticas. Únicamente se detectó el tipo de compatibilidad A2 lo cual es indicativo de que es una población clonal; en contraste, en las poblaciones de *P. infestans* obtenidas de jitomate de campo en Michoacán, se han reportado los dos tipos de compatibilidad, lo cual sugiere que en condiciones de campo el patógeno se está reproduciendo sexualmente lo cual favorece su diversidad genética (Fernández-Pavía *et al.*, 2006). En los invernaderos 4 y 5 se detectó a *P. infestans* con una incidencia de 80 y 95%, respectivamente, durante los meses de mayo y junio, época del año en la que comienza la temporada de lluvias en la región donde se localizan estos invernaderos. Lo cual concuerda con las condiciones de alta

agrees with the conditions of high humidity (90 to 100%) that favor the development of this pathogen (Agrios, 2005). Furthermore, these were low-tech greenhouses, especially greenhouse 4, in which organic farming was practiced and no fungicides were applied. The effectiveness of chemical control is also affected by the incorrect identification of the causal agent, as farmers have previously confused *P. infestans* with *Botrytis cinerea* Pers.:Fr., the gray mold fungus that produces Botrytis fruit rot; although this disease has been detected in Michoacan it was not present in the studied greenhouses. Late blight caused by the oomycete *P. infestans* is one of the most significant tomato diseases due to the fact that the great majority of varieties are susceptible (Jones *et al.*, 1991). This pathogen has caused numerous outbreaks in North America, causing significant economic losses (Legard *et al.*, 1995). In Mexico, it has been reported that there is diversity in the genotypes of *P. infestans* collected from isolates from field and greenhouse grown tomatoes in Michoacan (Fernández-Pavía *et al.*, 2006). This hinders the

humedad relativa (90 a 100%) que favorecen el desarrollo de este patógeno (Agrios, 2005). Asimismo, estos invernaderos presentaban una tecnología baja, especialmente el invernadero 4, en el cual se practicaba la organoponía o manejo orgánico del cultivo sin aplicaciones de fungicidas. La efectividad del control químico también es afectada por la incorrecta identificación del agente causal, ya que los productores han confundido a *P. infestans* con *Botrytis cinerea* Pers.: Fr., hongo causante del moho gris; esta enfermedad aunque si se ha detectado en Michoacán no estuvo presente en los invernaderos en estudio. El tizón tardío causado por el oomiceto *P. infestans*, es una de las enfermedades más importantes del jitomate ya que la mayoría de las variedades son susceptibles (Jones *et al.*, 1991). Este patógeno ha ocasionando numerosas epidemias en Norteamérica, causando pérdidas económicas importantes (Legard *et al.*, 1995). En México, se ha reportado que existe diversidad en los genotipos de *P. infestans* obtenidos de jitomate presentes en Michoacán aislados de campo e invernadero (Fernández-Pavía *et al.*, 2006). Lo anterior sugiere que esto dificulta el control de la enfermedad en el estado, pudiendo ocasionar pérdidas considerables.

Cenicilla polvorienta. Se observaron dos tipos de cenicillas polvorientas. El primer tipo ocasionó clorosis en follaje, puntos necróticos en el haz y micelio blanco algodonoso en el envés de los folíolos. En el haz de las hojas senescentes se observaron lesiones necróticas rodeadas por una zona de color amarillo (Figura 1B). En observaciones al microscopio compuesto se detectaron conidióforos con dos células, una célula basal alargada y una célula pequeña en la parte superior así como conidios lanceolados y cilíndricos. En base a la sintomatología observada en las muestras y a las características morfológicas de las estructuras reproductivas, se identificó al patógeno como *Oidiopsis taurica* (Braun *et al.*, 2002). Esta enfermedad se detectó en la primera visita a los invernaderos 4, 5 y 6 con una incidencia de 1, 10 y 100%, respectivamente. En el estado de Morelos también se detectó en invernaderos de jitomate una incidencia de *Oidiopsis* (31%) mayor con respecto a otras enfermedades (Ortega-García *et al.*, 2010). En el segundo tipo de cenicilla los síntomas de la enfermedad se iniciaron con el desarrollo de puntos pequeños de micelio de color blanco en diferentes partes del haz de las hojas jóvenes y maduras. A medida que la infección avanzó se observó que el micelio blanco cubrió casi por completo las hojas afectadas (Figura 1D). Se observaron conidióforos formados por dos o tres células (Figura 2), con una longitud promedio de 103.75 μm y un rango de 80 a 120 μm . Así como conidios ovoides con una longitud promedio de 36.65 μm y un rango de 30 a 42.5 μm , y un ancho promedio de 19.65 μm y un rango de 15 a 27.5 μm . De acuerdo con la sintomatología que se observó en las plantas infectadas y las características morfológicas del patógeno se identificó al agente causal de esta enfermedad como *Oidium neolycopersici* (Kiss *et al.*, 2001, 2005). Las plántulas inoculadas en las pruebas de patogenidad mostraron síntomas después de 10 días. La sintomatología y las características morfológicas del hongo fueron similares a las observadas en el invernadero (Figura 1E). Se observó un

control the disease in the state, which could lead to considerable losses.

Powdery mildew. Two types of powdery mildew were observed. The first type resulted in leaf chlorosis, necrotic spots on the upper side and cottony white mycelium on the underside of the leaflets. Necrotic lesions surrounded by a yellow zone were detected on the top side of senescent leaves (Figure 1B). During observation with a compound microscope conidiophores were detected with two cells, an elongated basal cell and a small cell on the upper part as well as cylindrical and lanceolate conidia. Based on the symptoms observed in the samples and the morphological characteristics of the reproductive structures, the pathogen was identified as *Oidiopsis taurica* (Braun *et al.*, 2002). The disease was detected in the first visit to greenhouses 4, 5 and 6 with an incidence of 1, 10 and 100%, respectively. In the state of Morelos an incidence of *Oidiopsis* was also detected in tomato greenhouses with a higher degree of incidence (31%) compared to other diseases (Ortega-García *et al.*, 2010). In the second type of powdery mildew, the symptoms of the disease began with the development of small dots of white colored mycelium in different parts of the tops of young and mature leaves. As the infection progressed it was observed that the white mycelium almost completely covered the affected leaves (Figure 1D). Conidiophores were observed consisting of two or three cells (Figure 2), with an

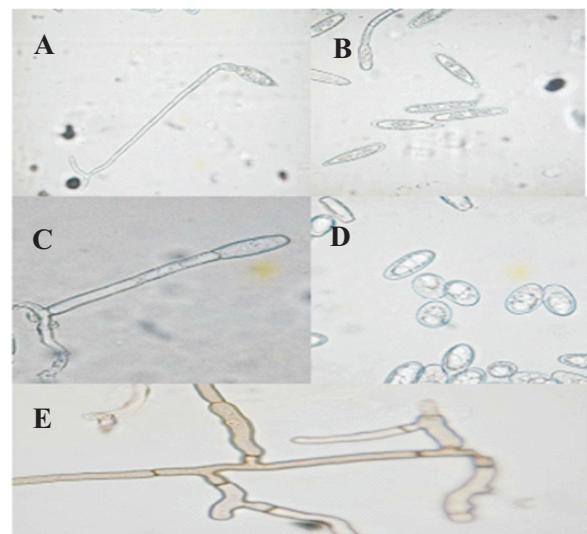


Figura 2. Estructuras morfológicas y reproductivas de patógenos causantes de enfermedades en plantas de jitomate en Michoacán. A, B. Conidióforo y conidios de *Oidiopsis taurica*. B, C, D. Conidióforo y conidios de *Oidium neolycopersici*. E. Hifas de *Rhizoctonia* mostrando ramificaciones típicas del hongo en ángulo recto.

Figure 2. Morphological and reproductive structures of pathogens that cause disease in tomato plants in Michoacan. A, B. Conidiophores and conidia *Oidiopsis taurica*. B, C, D. Conidiophores and conidia of *Oidium neolycopersici*. E. *Rhizoctonia* hyphae of the fungus showing typical branching at right angles.

100% de incidencia en el invernadero 5. Este patógeno se ha detectado en Florida (EUA), Francia, Turquía y Venezuela (Kiss *et al.*, 2001; Marois y Momol, 2001, Mantilla *et al.*, 2007; Yolageldi *et al.*, 2007), infectando jitomate en campo y en invernadero. La presencia de este patógeno ha sido reportada previamente en Michoacán (Rodríguez-Alvarado *et al.*, 2007) y en el Estado de México (Yáñez-Morales, *et al.*, 2009). En Morelos recientemente se ha reportado la presencia de *Oidium* (Ortega-García *et al.*, 2010). El hecho de que este patógeno se haya descrito recientemente en México cuando ya se había reportado en el continente Americano, podría deberse a que se le confundió con la cenicilla causada por el hongo *Oidiopsis taurica* o que se introdujo recientemente en el país.

Marchitez. En los invernaderos 1 y 2 se observaron plantas con síntomas de marchitamiento en plantas jóvenes con cuatro a ocho hojas verdaderas y en plantas adultas (Figura 1F). La severidad de los síntomas varió de acuerdo a la edad de la planta afectada. En las plantas jóvenes afectadas se observó pudrición de raíces y de la parte basal del tallo, flacidez de tallo y hojas, y muerte de plantas, en el invernadero 2. De estas plantas enfermas se aisló consistentemente al hongo *Rhizoctonia* sp., el cual produjo micelio algodonoso y de color café claro en medio PDA. Se observaron al microscopio hifas hialinas o con tonos de color café claro, con ramificación de hifas en ángulo recto y un septo cerca de la ramificación. En plantas maduras se observó clorosis generalizada del follaje, con hojas amarillas principalmente en la base de la planta, pudrición de raíces, flacidez de hojas con recuperación de turgencia en la noche, y necrosis de haces vasculares en corte transversal del tallo. De las plantas enfermas maduras se aisló consistentemente al hongo *Fusarium*. Los aislamientos de este hongo produjeron micelio algodonoso abundante con pigmentación de color violeta claro en medio PDA. Además, presentaron esporodocios de color anaranjado claro con abundantes macroconidios. Los macroconidios fueron ligeramente curvos y delgados y presentaron tres septos. Los microconidios se observaron en gran abundancia, sin septos y ovales, producidos en monofialides y en falsas cabezas. En medio CLA se observó la formación de clamidosporas, generalmente formadas en forma individual, terminales o intercalares. La especie se identificó como *F. oxysporum* de acuerdo con las características morfológicas y el crecimiento de la colonia en PDA (Leslie y Summerell, 2006). El híbrido 'Toro' sembrado en el invernadero 1 es resistente a *Fusarium oxysporum* lo cual concuerda con la baja incidencia observada de la enfermedad (Cuadro 2). Estos hongos *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia* sp. son patógenos prevalentes del jitomate en campo y en sistemas de producción bajo cubierta, los cuales son difíciles de controlar (Jones *et al.*, 1991; Howard, 2005), por lo cual es importante que la incidencia sea baja para evitar pérdidas en siembras subsecuentes.

Peca bacteriana. En el invernadero 2 se detectaron plantas con pequeñas lesiones necróticas de forma irregular en el follaje de plantas maduras de jitomate (Figura 1C). Con base a la sintomatología y a las colonias obtenidas se

averagelength of 103.7 μm and a range of 80 to 120 μm . As were ovoid conidia with an average length of 36.6 μm and a range of 30 to 42.5 μm , with an average width of 19.6 μm and a range of 15 to 27.5 μm . According to the symptoms observed on the infected plants and the morphological characteristics of the pathogen the causal agent of this disease was identified as *Oidium neolycopersici* (Kiss *et al.*, 2001, 2005). The seedlings inoculated in the pathogenicity tests showed symptoms after 10 days. The symptoms and morphological characteristics of the fungus were similar to those observed in the greenhouse (Figure 1E). An incidence of 100% was observed in greenhouse 5. This pathogen has been detected in Florida (USA), France, Turkey and Venezuela (Kiss *et al.*, 2001; Marois and Momol, 2001, Mantilla *et al.*, 2007; Yolageldi *et al.*, 2007), infecting tomatoes in fields and greenhouses. The presence of this pathogen has previously been reported in Michoacan (Rodríguez-Alvarado *et al.*, 2007) and in the state of Mexico (Yáñez-Morales *et al.*, 2009). The presence of *Oidium* (Ortega-García *et al.*, 2010) has recently been reported in Michoacan. The fact that this pathogen has only recently been described in Mexico when it had previously been reported in the American continent suggests that either it had been previously been confused for the fungus *Oidiopsis taurica* or that it was recently introduced into the country.

Wilt. Plants with wilt symptoms were observed in greenhouses 1 and 2 in young plants with four to eight true leaves and in adult plants (Figure 1F). The severity of the symptoms varied according to the age of the infected plant. Rotting of the root and the basal part of the stem, flaccidity of the stem and leaves and death of plants was observed in young plants in greenhouse 2. The fungus *Rhizoctonia* sp. was consistently isolated from these diseased plants which produced cottony brown colored mycelium in PDA medium. Hyaline or light brown colored hyphae were observed microscopically, with hypha branching in right angles and a septum near the branching point. Widespread chlorosis of foliage was observed in mature plants, with yellow leaves primarily in the base of the plant, root rot, flaccidity of leaves with recovery of turgor at night, and necrosis of vascular bundles in cross-section with the stem. *Fusarium* was constantly isolated from diseased mature plants. Isolates from this fungus produced abundant light violet colored, cottony mycelium in PDA medium. Furthermore, they presented orange colored sporodochia with abundant macroconidia. The macroconidia was slightly curved and thin and showed three septa. The microconidia were observed in great abundance, without septa and oval shaped, produced in monophialides and false heads. The formation of chlamydospores on CLA medium was observed, usually formed individual, terminal or intercalarily. The species was identified as *F. oxysporum* in accordance with the morphological characteristics and growth of the colony on PDA (Leslie and Summerell, 2006). The hybrid 'Toro' planted in greenhouse 1 is resistant to *Fusarium oxysporum* which is consistent with the observed low incidence of the disease (Table 2). These fungi *Fusarium oxysporum* and *Rhizoctonia* sp. are prevalent pathogens of tomato grown under field and

determinó que el agente causal fue de origen bacteriano. En la literatura se reportan dos especies de bacterias que causan este tipo de síntomas, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* y *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Doidge) Dye. (Jones *et al.*, 1991). Aislamientos bacterianos de las lesiones fueron Gram (-), desarrollaron colonias circulares, lisas, elevadas y con pigmentación fluorescente en medio B de King al observarlas bajo luz ultravioleta (Schaad *et al.*, 2001). Las pruebas de utilización de DL-lactato y eritritol resultaron positivas. Las características anteriores de las colonias y los síntomas indicaron que lo observado en el invernadero 2 coincide con lo reportado para *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, por lo que se determinó que esta es el patógeno causante de la enfermedad (Jones *et al.*, 1991). La baja incidencia detectada (11%) concuerda con la tolerancia a esta bacteria, reportada para el híbrido 'Cimabue', sembrado en este invernadero.

De las enfermedades determinadas, el tizón tardío y las cenicillas resultaron ser las más importantes por el número de invernaderos afectados y los grados altos de incidencia detectados. *P. infestans* se encontró en dos invernaderos, presentando incidencias del 80 y 96%. Mientras que *Oidiopsis taurica* se presentó en tres invernaderos, mostrando una variación de incidencia desde el 1 hasta 100% de plantas afectadas. La cenicilla causada por *Oidium neolyopersici*,

covered crop production systems, which are difficult to control (Jones *et al.*, 1991; Howard, 2005), thus the importance of having a low incidence to avoid losses in subsequent crops.

Bacterial speck. In greenhouse 2 plants were detected with small irregular necrotic lesions in the foliage of mature tomato plants (Figure 1C). Based on the symptoms and the obtained colonies it was determined that the causal agent was bacterial in origin. Literature reports two species of bacteria that cause such symptoms, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* and *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Doidge) Dye. (Jones *et al.*, 1991). Bacterial isolates from the lesions were Gram (-), developed circular colonies, smooth, raised and with a fluorescent pigmentation in King B medium when observed under ultraviolet light (Schaad *et al.*, 2001). The DL-lactate and erythritol utilization tests were positive. The above characteristics of the colonies and indicated symptoms observed in greenhouse 2 coincides with that reported for *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, therefore it was determined that this was the pathogen causing the disease (Jones *et al.*, 1991). The low incidence detected (11%) agrees with the tolerance of this bacterium reported for the 'Cimabue' hybrid planted in the greenhouse.

Of the detected diseases, late blight and powdery mildew were the most important in terms of the number of

Cuadro 2. Sintomatología e incidencia de las enfermedades detectadas en invernaderos de jitomate en la zona centro de Michoacán.

Table 2. Symptomatology and incidence of the diseases detected in tomato greenhouses in the central region of Michoacan.

Patógenos y los síntomas que ocasionan	Invernaderos					
	Incidencia de enfermedades (%)					
	1	2	3	4	5	6
<i>Phytophthora infestans</i> causante de tizón tardío. Necrosis en follaje, frutos y tallos				80	95	
<i>Oidiopsis taurica</i> causante de cenicilla. Puntos necróticos con halo amarillo en el haz de las hojas. Micelio blanco en el envés de las hojas.				1	10.6	100
<i>Rhizoctonia</i> sp. causante de marchitez. Plantas jóvenes y plántulas con necrosis en raíces y en la base del tallo, flacidez, muerte.		2				
<i>Fusarium oxysporum</i> causante de marchitez. Plantas maduras con clorosis y flacidez en el follaje.	1					
<i>Oidium neolyopersici</i> causante de cenicilla. Micelio abundante de color blanco en el haz de las hojas.					90	
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> causante de la peca del jitomate. Lesiones y puntos necróticos en hojas y frutos.		11				

solamente se detectó en un invernadero con un 90% de incidencia (Cuadro 2). La incidencia de estas enfermedades fue en general alta por lo que estos patógenos representan un problema en la producción de jitomate en Michoacán. La falta de asesoría para los productores ocasiona generalmente un mal diagnóstico por parte de los mismos, y consecuentemente un control inapropiado. Debido entre otras cosas a lo anteriormente mencionado, en algunos invernaderos la producción se volvió incosteable y han dejado de producir jitomate como es el caso del invernadero 5 ubicado en Uruapilla, Mich. De acuerdo con Sánchez-Del Castillo (citado por Salinas-Cesáreo, 2010) el 60% de los invernaderos de hidroponía fracasan por falta de capacitación y Michoacán podría no ser la excepción.

CONCLUSIONES

Se identificaron seis patógenos en los invernaderos de jitomate estudiados, estos fueron: *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia* sp., *Phytophthora infestans*, *Oidiopsis taurica*, *Oidium neolycopersici* y *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. Las enfermedades cenicilla polvorienta y el tizón tardío fueron las enfermedades más importantes en cuanto a la incidencia observada.

LITERATURACITADA

- Agrios, G.N. 2005. Plant Pathology. Fifth Edition. Elsevier, Inc. Burlington, Maryland, USA. 922p.
- Barnett, H.L. and Hunter, B.B. 1998. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. Second ed. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, USA. 218p.
- Braun, U., Cook, R.T.A., Inman, A.J. and Shin, H.D. 2002. The taxonomy of the powdery mildew fungi. Pp:13-55. In: Belanger, R.R., Bushnell, W.R., Dik, A.J. and Carver, T.W. (eds.). The Powdery Mildews. A Comprehensive Treatise. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, USA. 292p.
- Erwin, D.C. and Ribeiro, O.K. 1996. *Phytophthora* Diseases Worldwide. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, USA. 562p.
- Espinosa-Zapata, C. 2004. Producción de jitomate en invernadero. Memorias del IV Simposio Nacional de Horticultura, Invernaderos: Diseño, Manejo y Producción. Torreón, Coah., México. 43p.
- Fernández-Pavía, S.P., Rodríguez-Alvarado, G., Garay-Serrano, E., Belmar-Díaz, C.R., Flie, W. y Lozoya-Saldaña, H. 2005. Caracterización de aislamientos de *Phytophthora infestans* provenientes de Michoacán, México. Revista Mexicana de Fitopatología 23:191-197.
- Fernández-Pavía, S.P., Tovar-García, L.H., Rodríguez-Alvarado, G., Belmar-Díaz, C., Garay-Serrano, E. y Lozoya-Saldaña, H. 2006. Variabilidad de aislamientos de *Phytophthora infestans* obtenidos de papa y jitomate en Michoacán, México. XXII Congreso de la Asociación Latinoamericana de la Papa. Toluca, Edo. México. Resumen O-30.
- Fernández-Pavía, S.P., Rodríguez-Alvarado, G. y Fernández-Pavía, Y.L. 2008. Enfermedades forestales de cultivos agrícolas en el estado de Michoacán. Biológicas 10:28-38.
- F i c h a t é c n i c a , 2 0 1 1 .
www.sunseeds.com/uploads/VarietyTechReports/sun770_5_spanish
- Howard, R. 2005. Management of major greenhouse vegetable diseases. Canadian Greenhouse Conference. Greenhouse Canada. Toronto, Ontario, Canada. www.canadiangreenhouseconference.com/talks/2005/2005-Tk-Howard.pdf. (Consulta, agosto 2010).
- Israel, G.D. 2009. Determining sample size. University of Florida, IFAS Extension. Publication #PEOD6 (http://edis.ifas.ufl.edu/PD006).
- Jones, J.B., Jones, J.P., Stall, R.E. and Zitter, T.A. (eds.). 1991. Compendium of Tomato Diseases. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, USA. 73p.
- Kiss, L., Cook, R.T.A., Saenz, G.S., Cunningham, J.H., Takamatsu, S., Pascoe, I., Bardin, M., Nicot, P.C., Sato, Y. and Rossman, A.Y. 2001. Identification of two powdery mildew fungi, *Oidium neolycopersici* sp. nov. and *O. lycopersici*, infecting tomato in different parts of the world. Mycological Research 105:684-697.
- Kiss, L., Takamatsu, S. and Cunningham, J.H. 2005. Molecular identification of *Oidium neolycopersici* as the causal agent of the recent tomato powdery mildew epidemics in North America. Plant Disease 89:491-496.
- Legard, D.E., Lee, T.Y. and Fry, W.E. 1995. Pathogenic specialization in *Phytophthora infestans*: Aggressiveness on tomato. Phytopathology 85:1356-1361.
- Leslie, J.F. and Summerell, B.A. 2006. The *Fusarium* Laboratory Manual. Blackwell Publishing. 388p.