

Etiología de la Pudrición de Bulbo y Tallo de la Azucena Híbrida (*Lilium Spp.*) y su Control en el Estado de México

Etiology of Hybrid Lily (*Lilium Spp.*) Bulb and Stem Rot and its Control in the State of Mexico

Kesia Magos-García, Santos Gerardo Leyva-Mir, UACH, Departamento de Parasitología Agrícola, Carr. México–Texcoco, Km. 38.5, CP 56230, Chapingo, Edo. de México; Luis Antonio Mariscal-Amaro, INIFAP-CEVAMEX, Km. 13.5 Carr. Los Reyes-Texcoco, Coatlinchán, Texcoco, Edo. México. Correspondencia: lsantos@correo.chapingo.mx.

(Recibido: Septiembre 07, 2009 Aceptado: Octubre 06, 2010)

Magos-García, K., Leyva-Mir, S.G. y Mariscal-Amaro, L.A. 2010. Etiología de la Pudrición de Bulbo y Tallo de la Azucena Híbrida (*Lilium Spp.*) y su Control en el Estado de México. Revista Mexicana de Fitopatología 28:162-164.

Resumen. La pudrición de bulbo y tallo de la azucena híbrida (*Lilium spp.*) es una enfermedad que apareció recientemente en Xocotlán, Texcoco, Edo. de México, caracterizada por necrosis ascendente que causa la muerte prematura de plantas ocasionando 50 % de pérdidas en producción. Mediante caracterización morfológica del patógeno y PCR, amplificando la región rDNA ITS, se obtuvo una secuencia genética de 562 pares de bases (pb), indicando que el agente causal fue *Fusarium oxysporum* Schelecht. Emend. Syd & Hans. Se evaluó la efectividad biológica de tres fungicidas químicos y un biológico en invernadero observándose que los mejores productos para controlar al hongo fueron Prochloraz (SPORTAK®) y *Trichoderma harzianum* con una eficiencia del 89 % y 82 %, respectivamente.

Palabras clave adicionales: necrosis, *Lilium spp.*, *Fusarium oxysporum*.

Magos-García, K., Leyva-Mir, S.G. and Mariscal-Amaro, L. A. 2010. Etiology of Hybrid Lily (*Lilium Spp.*) Bulb and Stem Rot and its Control in the State of Mexico. Revista Mexicana de Fitopatología 28:162-164.

Abstract. The bulb and stem rot of hybrid lily (*Lilium spp.*) is a disease that recently appeared in Xocotlán, Texcoco, Mexico State, which is characterized by necrosis upwardly; it causes the premature death of plants, as well as 50% loss in production. A gene sequence of 562 base pairs (bp) was obtained throughout morphological characterization of the pathogen and PCR, plus rDNA ITS region amplification, indicating that the causal agent was *Fusarium oxysporum* Schelecht. Emend. Syd & Hans. The biological efficacy of three chemical and biological fungicides in greenhouse was evaluated, observing that the best products to control the fungus were Prochloraz (SPORTAK®) and *Trichoderma harzianum* with an 89% and 82% efficiency, respectively.

Additional keywords: necrosis, *Lilium spp.*, *Fusarium oxysporum*.

INTRODUCCION

La producción de azucena híbrida en México ha aumentado de 33 ha sembradas y 6000 gruesas en 2001 a 108 ha y 3208 gruesas en 2007, siendo el estado de Jalisco y Estado de México las zonas productoras más importantes. En Texcoco, Estado de México, se ha observado una pudrición ascendente del bulbo y tallo de esta flor, que ha causado problemas en su producción causando pérdidas severas de 50 %. El agente causal de esta enfermedad no ha sido caracterizado por lo que no se puede hacer un manejo adecuado del mismo. Los objetivos de esta investigación fueron: 1) Identificar el agente causal de la pudrición del bulbo y tallo de la azucena híbrida (*Lilium spp.*) usando técnicas moleculares y secuenciación

INTRODUCTION

Hybrid lily production in Mexico has increased from 33 planted ha and 6000 thick in 2001 to 108 ha and 3208 thick in 2007, being both the state of Jalisco and the state of Mexico the most important producing areas. An upward bulb rot and stem of this flower has been seen in Texcoco, Mexico State, which has caused issues in production causing 50% severe losses. The causal agent of this disease has not been characterized; therefore, its management cannot be properly performed. The objectives of the study hereby were as follows: 1) Identify the bulb and stem rot causal agent of the hybrid lily (*Lilium spp.*) by means of molecular techniques and DNA sequencing; and 2) Evaluate chemical and biological management alternatives for the disease.

de DNA; y 2) Evaluar alternativas de manejo químico y biológico de la enfermedad.

MATERIALES Y MÉTODOS

En invernaderos de Xocotlán, Texcoco, Edo. de México, se hicieron muestreos dirigidos de plantas adultas de azucena híbrida, variedad "Acapulco", con pudriciones en bulbo y tallo; tomándose cuatro muestras compuestas de 20 plantas que se conservaron en refrigeración a 10 °C en bolsas de plástico. Las muestras se analizaron en el laboratorio de Micología Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo. En un invernadero comercial de 1000 m² con 20 áreas de 1 m² se aplicaron cinco tratamientos para evaluar las alternativas de manejo químico y biológico.

Diagnóstico y pruebas de patogenicidad. Se desinfectaron trozos de material vegetal enfermo y se pusieron cinco en cajas petri con medio de cultivo PDA. Del crecimiento obtenido en las cajas se tomaron pedazos de PDA con micelio que se reaislaron para obtener aislamientos puros. El organismo aislado y purificado se inóculo de forma manual en tres repeticiones de 20 plántulas sanas de azucena variedad "Acapulco" a una concentración de 10⁶ conidios/mL de agua. Las plantas inoculadas se sometieron a humedad relativa (HR) del 100 % con un humidificador por 72 h. Al finalizar este periodo se llevaron a invernadero a 48 % HR y temperaturas de 20 °C a 25 °C. Del patógeno reaislado a partir de material vegetal con síntomas se hicieron preparaciones semipermanentes y se observaron sus características morfológicas en un microscopio compuesto. Se identificó el patógeno usando el manual de laboratorio de Leslie y Summerell (2006).

Identificación molecular mediante PCR. Se utilizaron cepas del reaislamiento obtenido en las pruebas de patogenicidad. La extracción de DNA se realizó con el método AP utilizado en el CINVESTAV (Balbas, 2002), verificándose su calidad mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.2 %; este gel se observó en el fotodocumentador (Bio-Imaging Systems Mini Bis Pro). Para la PCR se prepararon 10 muestras de DNA mismas que se metieron al Termociclador (Termal Cycler 2720 Appliedm Biosystems) para llevar a cabo la amplificación de la región rDNA ITS con los iniciadores universales ITS4 e ITS5. Concluido el paso anterior se visualizaron en el fotodocumentador los fragmentos de ADN amplificados, en un gel de agarosa al 1.2 % donde se incluyó un marcador molecular de 100 pb. La limpieza del producto de la PCR se hizo con el producto comercial WIZARD SV GEL Y PCR CLEAN-UP SYSTEM® (Promega®). Las muestras se secuenciaron en el secuenciador Genetic Analyzer 3100 (Applied Biosystem Corp.®) del Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Prueba de efectividad en invernadero. El experimento se realizó bajo un diseño en bloques completos al azar con cuatro repeticiones y unidades experimentales de 10 plantas. Los tratamientos fueron: 1) Testigo sin aplicación, 2) *T. harzianum* (PHC®T-22®) 5 g/L agua, 3) Benomil (BENOLATE 50PH®) 4 g/L agua, 4) Tiabendazol (TECTO 60®) 5 g/L agua, y 5) Prochloraz (SPORTAK® 45 CE) 0.002

MATERIALS AND METHODS

Directed samples of hybrid lily, "Acapulco" variety with bulb and stem rotting were performed from adult plants in greenhouses located in Xocotlán, Texcoco, Mexico State; thus, four samples were taken consisting of 20 plants that were kept refrigerated at 10°C in plastic bags. The samples were analyzed in the Laboratorio de Micología Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo (Laboratory of Agricultural Mycology of the Chapingo Autonomous University). A total of five treatments were applied in a commercial greenhouse of 1000 m² with 20 ha of 1 m² to evaluate chemical and biological management alternatives.

Diagnosis and pathogenicity tests. Pieces of diseased plant material were disinfected and five of them were set in Petri dishes with a PDA culture medium PDA. Pieces of PDA with mycelium were taken from the growth obtained in the Petri dishes, which were reisolated aiming to obtain pure isolated. The isolated and purified organism was manually inoculated in three replicates of 20 lily "Acapulco" variety plantlets at a 10⁶ conidia/mL water concentrations. The inoculated plants were subjected to a 100% relative humidity (RH) with a humidifier for 72 h. Afterwards, they were taken to a greenhouse at 48% HR and temperatures ranging from 20°C to 25°C. Semi-permanent preparations were made from the symptomized plant material reisolated pathogen, having their morphological characteristics observed through a light microscope. The pathogen became identified by means of the Leslie and Summerell laboratory manual (2006) usage.

Molecular identification using PCR. Reisolation strains were used, which had been obtained in the pathogenicity tests. The DNA extraction was performed with the AP method used at CINVESTAV (Balbas, 2002), having its quality verified by electrophoresis in agarose gel at 1.2 %; the gel was observed using a Bio-Imaging Systems Mini Bis Pro for photodocumentation. A total of 10 samples were prepared for PCR, which were taken into the Thermal Cycler 2720 Applied Biosystems to carry out the rDNA ITS region amplification with the ITS4 and ITS5 universal primers.

Having completed the previous step, the DNA amplified fragments were visualized through the Bio-Imaging Systems Mini Bis Pro for photodocumentation in an agarose gel at 1.2%, which included a 100 bp molecular marker. The cleaning of the PCR product was made with the commercial product WIZARD SV GEL AND PCR CLEAN-UP SYSTEM® (Promega®). The samples were sequenced in the Genetic Analyzer 3100 sequencer (Applied Biosystem Corp.®) from the Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Nacional Autónoma de México (Molecular Biology Laboratory of the National Autonomous University of Mexico).

Greenhouse effectiveness test. The experiment was performed under a design in a randomized complete block with four replicates and experimental units of 10 plants. The treatments were: 1) Control without application; 2) *T. harzianum* (PHC®T-22®) 5 g/L water, 3) Benomyl (BENOLATE 50PH®) 4 g/L water, 4) Thiabendazole (TECTO 60®) 5 g/L water, and 5) Prochloraz (SPORTAK® 45 CE) 0.002 L/L water. A total of 200 "Acapulco" variety lily

L/L agua. Se inocularon 200 plantas de azucena de la variedad "Acapulco" siguiendo el mismo procedimiento que en las pruebas de patogenicidad, 50 por bloque y 10 plantas por cada tratamiento. Cada fungicida químico se asperjó directamente al cuello de las plantas, para *T. harzianum* se retiraron las plantas del sustrato y se inoculó la raíz. Las evaluaciones de porcentaje de control se hicieron a los 30 y 65 dda. Con los datos obtenidos se hizo un análisis de varianza (ANOVA) y prueba de Tukey ($\alpha=0.05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La incidencia de la enfermedad en invernadero fue 74 % con síntomas presentes en etapa de formación de botones, coincidiendo con Kenneth y Horst (1997) quien observó síntomas en el estado de floración. Los síntomas fueron plantas con hojas amarillentas y curvadas, una coloración púrpura del cuello y en algunos casos necrosis. Las colonias del patógeno en PDA fueron de color blanco con un halo púrpura y micelio algodonoso; presentando gran cantidad de macroconidios coincidiendo con Li *et al.*, (2000) y Leslie y Sumerell (2006). Las características morfológicas del hongo correspondieron al género *Fusarium* spp, y mediante las claves taxonómicas para la identificación de especies de *Fusarium* spp., se comprobó que el agente causal fue *F. oxysporum* coincidiendo con Romero (1988), Forsberg (1975) y Leslie y Summerell (2006). Con la técnica de extracción mediante AP se obtuvieron muestras de DNA de buena calidad mismas que mostraron una fuerte amplificación en la PCR y cuyo resultado fue un producto de 600 pb. Estas secuencias obtenidas se compararon con las del GenBank del NCBI, con el programa Clustal, el cual mostró que las secuencias pertenecieron a *F. oxysporum*, con un porcentaje de alineación del 98%. Mediante la graficación de las secuencias se determinó que la fase sexual del hongo fue *Gibberella moniliformis*, coincidiendo con Leslie y Summerell (2006). El análisis de varianza y la prueba de Tukey indicaron que Prochloraz (SPORTAK®) mostró un porcentaje de eficiencia de 89 % de control, *T. harzianum* alcanzó un 82 %, y los productos con menor efecto fueron Tiabendazol con 73 % y Benomil con 59 %.

CONCLUSIONES

El agente causal de la pudrición del bulbo y tallo de la azucena híbrida fue la especie *F. oxysporum* corroborándose con la técnica de PCR. El biofungicida *T. harzianum* y el fungicida Prochloraz (SPORTAK®) presentaron el mejor control de *F. oxysporum* en invernadero.

LITERATURA CITADA

- Balbas, P. 2002. De la Biología molecular a la biotecnología. Ed. Trillas. México. 105 p.
- Forsberg, J. L. 1975. Diseases of ornamental plants. University of Illinois Press. Chicago, USA. 2nd Edition. pp 28-29.
- Kennet, R., and Horst, R. K. 1997. Compendium of chrysanthemum diseases. Amer. Phytopathological Society. 62 p.
- Leslie, J. F. and Summerell, S. B. 2006. The *Fusarium*

plants were inoculated following the same procedure as in the pathogenicity tests, 50 blocks and 10 plants per treatment. Each chemical fungicidal was sprayed directly to the neck of the plant; plants were removed from the substrate and inoculated root for *T. harzianum*. The control rate assessments were performed at 30 and 65 DAA. A variance analysis (ANOVA) and a Tukey test ($\alpha=0.05$) were carried out with the data obtained.

RESULTS AND DISCUSSION

The disease incidence in greenhouse conditions was 74% with symptoms present in the buttons formation stage, which is consistent with Kenneth and Horst (1997) who noticed symptoms in the flowering stage. The symptoms were plants with yellowed and curved leaves, a purple neck and sometimes necrosis. Colonies of pathogens on PDA were white with a purple halo and a fluffy mycelium, featuring lots of macro-conidia, coinciding with Li *et al.*, (2000) and Leslie and Sumerell (2006). The fungus morphological characteristics corresponded to *Fusarium* spp. It was confirmed by using taxonomic keys for species identification of *Fusarium* spp., that the causal agent was *F. oxysporum*, which coincides with Romero (1988), Forsberg (1975) and Leslie and Summerell (2006). A strong PCR amplification was revealed by the DNA good quality samples obtained by the technique of extraction with AP, and the result was a product of 600 bp. These obtained sequences were compared with those of the GenBank from the NCBI, with the Clustal program, revealing that the sequence belonged to *F. oxysporum*, with an alignment average of 98%. It was determined, by plotting the sequences, that the sexual stage of the fungus was *Gibberella moniliformis*, coinciding with Leslie and Summerell (2006). It was indicated by the variance analysis and Tukey test that the Prochloraz (SPORTAK®) revealed an efficiency percentage of 89% of control; an 82% was reached by *T. harzianum*. The products with less effect were Thiabendazole with 73% and Benomyl with 59%.

CONCLUSIONS

The causal agent of bulb and stem rot of the lily hybrid was the *F. oxysporum* species, being corroborated by the PCR technique. A better *F. oxysporum* control in greenhouse conditions was revealed by the *T. harzianum* biofungicide and the Prochloraz fungicide (SPORTAK®).

laboratory manual. Firts edition. Ed. Blackwell Publishing. Iowa, USA. 388 p.

- Li S., Tam, Y. K., and Hartman, G. L. 2000. Molecular differentiation of *Fusarium solani* f. sp. *glycines* from other *F. solani* based on mitochondrial small subunit rDNA sequences. Phytopathology 90:491-497.
- Romero, C. S. 1988. Hongos fitopatógenos. Universidad Autónoma Chapingo, Chapingo, Estado de México. 347 p.