

ETIOLOGÍA Y RESPUESTA DE VARIEDADES DE CRISANTEMO A LA PUDRICIÓN DEL TALLO EN EL ESTADO DE MÉXICO

R. Solano-Baez; Santos Gerardo Leyva-Mir*;
Bertha Tlapal-Bolaños; L. A. Mariscal-Amaro

Departamento de Parasitología Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo. km 38.5 Carretera México-Texcoco. Chapingo, Estado de México. MÉXICO. C. P. 56230.
(*Autor para correspondencia)

RESUMEN

El crisantemo (*Dendranthema x grandiflorum* Ramat.) es una de las flores cultivadas más importantes a nivel mundial. Las enfermedades fungosas constituyen la mayor causa de pérdidas económicas durante la producción de esta ornamental bajo condiciones de invernadero y cielo abierto. Los objetivos de este estudio fueron identificar al agente causal de la pudrición seca del tallo del crisantemo y evaluar la respuesta a la infección en seis variedades de crisantemo producidas en invernaderos de Texcoco, Estado de México. Con base en el análisis morfológico, molecular y patogénico, se identificó a *Fusarium solani* Appel & Wollenweber (Teleomorfo: *Haemanectria haematococca* Samuels & Nirenberg.) como el agente causal de la enfermedad. Para evaluar la respuesta de variedades de crisantemo a la infección por *F. solani*, se inocularon plántulas de crisantemo con una suspensión conidial de 1×10^6 esporas·ml⁻¹. La severidad de la enfermedad se evaluó de acuerdo a una escala 0-6 a los 15 días después de la inoculación. Los resultados indicaron que las seis variedades evaluadas mostraron ser susceptibles a la infección. 'Polar', 'Leonora', 'Indianápolis' y 'Codorniz' se comportaron como las variedades más susceptibles, mientras que 'Puma' y 'Spider' exhibieron cierta tolerancia.

PALABRAS CLAVE ADICIONALES: *Dendranthema x grandiflorum*, *Fusarium solani*, *Haemanectria haematococca*, patogenicidad.

ETIOLOGY AND RESPONSE OF CHRYSANTHEMUM CULTIVARS TO STEM ROT IN THE STATE OF MEXICO

ABSTRACT

Chrysanthemum (*Dendranthema x grandiflorum* Ramat.) is one of the most important flowers grown in the world. Fungal diseases are the largest cause of economic losses during the production of this ornamental under greenhouse and field conditions. The aims of this study were: to identify the causal agent of chrysanthemum stem rot and to evaluate the response to infection of six chrysanthemum cultivars produced in greenhouses in Texcoco, State of Mexico. The causal agent of this disease was identified as *Fusarium solani* Appel & Wollenweber. (Teleomorph: *Haemanectria haematococca* Samuels & Nirenberg.) based on morphological, molecular and pathogenic characterization. In order to evaluate the response of chrysanthemum cultivars to infection by *F. solani*, plantlets were inoculated with a conidial suspension of 1×10^6 spores·ml⁻¹. Disease severity was assessed on a 0-6 scale at 15 days after inoculation. The results indicated that all six tested cultivars were susceptible to infection. 'Polar', 'Eleonora', 'Indianapolis' and 'Quail' were the most susceptible cultivars, whereas 'Puma' and 'Spider' were relatively tolerant.

ADDITIONAL KEYWORDS: *Dendranthema x grandiflorum*, *Fusarium solani*, *Haemanectria haematococca*, pathogenicity.

INTRODUCCIÓN

En México, la siembra de flor de corte es actualmente de 10,164.5 ha, de las cuales 2,479 ha se destinan para el cultivo de crisantemo (*Dendranthema x grandiflorum* Ramat.), tanto en invernadero como en campo, lo que ubica a éste en segundo lugar en superficie cultivada después de la gladiola. El valor de la producción del crisantemo en el 2011 fue de \$ 988,566,000.00 (Anónimo, 2012).

Diversos factores afectan la producción de crisantemo, pero son las enfermedades fungosas las que más disminuyen el rendimiento y calidad de la planta en cualquier etapa de producción. Aunque se sabe que bajo condiciones de invernadero se pueden controlar las condiciones de humedad relativa, temperatura, cantidad y calidad de luz, el ataque de patógenos es inminente (Flores-Ruvalcaba *et al.*, 2005).

Las enfermedades fungosas que se presentan con mayor frecuencia durante la producción del crisantemo a nivel mundial son pudrición de raíz por *Pythium* spp., pudrición negra de la raíz por *Thielaviopsis basicola*, pudrición de tallo por *Fusarium oxysporum* f. sp. *Chrysanthemi*, pudrición blanca del tallo por *Sclerotinia sclerotiorum*, marchitez por *Rhizoctonia solani*, *Verticillium dahliae* y *V. albo-atrum*, moho gris por *Botrytis cinerea*, tizón por *Didymella ligulicola* (Anamorfo: *Phoma chrysanthemi*), mancha foliar por *Septoria chrysanthemi*, roya blanca por *Puccinia horiana*, roya café por *Puccinia chrysanthemi* y cenicilla por *Golovinomyces cichoracearum* (Horst y Nelson, 1997; Gleason *et al.*, 2009).

En recorridos realizados durante el 2006 y 2007 en invernaderos comerciales de la zona productora de crisantemo en la región de Texcoco, Estado de México, se encontraron plantas de crisantemo de la variedad 'Leonora' con síntomas severos de amarillamiento, necrosis y pudrición seca del tallo. Por lo anterior, los objetivos de este estudio fueron identificar al agente causal de la pudrición seca del tallo de crisantemo en Texcoco, Estado de México y evaluar la respuesta a la enfermedad en seis de las principales variedades de crisantemo que se siembran en dicha región.

MATERIALES Y MÉTODOS

Colecta de material vegetal enfermo

Durante el periodo de julio 2006 - febrero 2007, se realizaron muestreos en diferentes invernaderos del municipio de Texcoco, Estado de México, con la finalidad de coleccionar plantas de crisantemo cv. 'Leonora', con síntomas de amarillamiento, necrosis foliar y pudrición seca en el tercio superior y medio del tallo. Un total de 50 plantas sintomá-

INTRODUCTION

In Mexico, cut flowers are currently grown in 10,164.5 ha, out of which 2,479 ha are allocated for growing chrysanthemum (*Dendranthema x grandiflorum* Ramat.), both in greenhouse and field, which places it second in cultivated area after gladioli. The production value of chrysanthemum in 2011 was \$988,566,000.00 (Anónimo, 2012).

Several factors affect chrysanthemum production, but fungal diseases most reduce yield and plant quality at every production stage. Although it is known that under greenhouse conditions relative humidity, temperature, light quantity and quality can be controlled, pathogen attack is inevitable (Flores-Ruvalcaba *et al.*, 2005).

Fungal diseases that occur most frequently in chrysanthemum production worldwide are root rot by *Pythium* spp., black root rot by *Thielaviopsis basicola*, stem rot by *Fusarium oxysporum* f. sp. *Chrysanthemi*, white stem rot by *Sclerotinia sclerotiorum*, wilting by *Rhizoctonia solani*, *Verticillium dahliae* and *V. albo-atrum*, gray mold by *Botrytis cinerea*, blight by *Didymella ligulicola* (Anamorfo: *Phoma chrysanthemi*), leaf spot by *Septoria chrysanthemi*, white rust by *Puccinia horiana*, coffee rust by *Puccinia chrysanthemi* and mildew by *Golovinomyces cichoracearum* (Horst and Nelson, 1997; Gleason *et al.*, 2009).

In visits made in 2006 and 2007 to commercial greenhouses in the chrysanthemum-producing area in the Texcoco region, chrysanthemum plants ('Eleonora' cultivar) with severe yellowing, necrosis and dry stem rot symptoms were found. Because of that, the aims of this study were to identify the causal agent of chrysanthemum dry stem rot in Texcoco, State of Mexico and to assess the response to the disease in the six major chrysanthemum cultivars planted in this region.

METHODS AND MATERIALS

Collection of sick plant material

Between July 2006 and February 2007, samplings were conducted in different greenhouses in Texcoco, State of Mexico, with the purpose of collecting 'Eleonora' chrysanthemum cv. plants, with symptoms of yellowing, leaf necrosis and dry rot in the upper and middle third of the stem. A total of 50 symptomatic plants were transported in paper bags to the Mycology Laboratory at the Universidad Autónoma Chapingo for processing.

Isolation and purification

To isolate the causal agent, five stem pieces were cut from the transition zone between healthy and diseased tissue from each of the samples. The pieces were disinfected by

ticas se transportaron en bolsas de papel al laboratorio de Micología Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo para su procesamiento.

Aislamiento y purificación

Para aislar al agente causal, se cortaron cinco piezas de tallo a partir de la zona de transición entre tejido sano y enfermo de cada una de las muestras. Las piezas se desinfectaron por inmersión en una solución de hipoclorito de sodio al 3 % durante 5 min, se enjuagaron dos veces con agua destilada estéril por 3 min, se colocaron en papel secante estéril y se transfirieron a cajas Petri con medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA). Las cajas se incubaron a 25 °C y se revisaron cada 24 h. Las colonias predominantes se transfirieron a nuevas cajas con PDA y con medio hojas de clavel-agar (CLA), con el propósito de incrementar los crecimientos que se presentaron. Se realizó la purificación de los aislamientos mediante la técnica de cultivos monospóricos en medio PDA descrita por Leslie y Summerell (2006).

Identificación cultural y morfológica

Las características culturales del aislamiento predominante se registraron a partir de colonias cultivadas en medio PDA en cajas Petri y en medio pulpa de papa-agar (PPA) en tubos de ensayo, en donde se consideró el tipo de crecimiento, pigmentación en el medio de cultivo, así como la formación y coloración de esporodocios. Los aislamientos se transfirieron a cajas de Petri con PDA y otras con CLA, con la finalidad de inducir la formación de estructuras de reproducción (conidios) y resistencia (clamidosporas). Las estructuras morfológicas se analizaron en un microscopio compuesto, en donde se registró la medida de 100 repeticiones de cada estructura (macroconidios, microconidios, fiálides y clamidosporas). La identificación de los géneros de los hongos aislados se realizó con las claves taxonómicas de Barnett y Hunter (2006), mientras que la identificación a nivel de especie se llevó a cabo con las descripciones de Toussound y Nelson (1976), Nelson *et al.* (1983) y Leslie y Summerell (2006). La identificación a nivel de especie únicamente se realizó para el caso del hongo con antecedentes de patogenicidad sobre plantas de crisantemo.

Prueba de patogenicidad

La prueba de patogenicidad se llevó a cabo con un aislamiento de *Fusarium* sp., que fue la especie fungosa encontrada con mayor frecuencia y la cual es reportada en literatura como la de mayor potencial patogénico. Un aislamiento monospórico se inoculó en 100 plántulas de crisantemo de la variedad 'Leonora', las cuales se cultivaron en macetas. El inoculo constó de una suspensión de conidios a una concentración de 1×10^6 esporas·ml⁻¹, en la cual

immersion in a sodium hypochlorite solution at 3 % for 5 min, rinsed twice with sterile distilled water for 3 min, placed on sterile filter paper and transferred into Petri dishes with potato dextrose agar (PDA) culture medium. The dishes were incubated at 25 °C and were checked every 24 h. The predominant colonies were transferred to new dishes with PDA and carnation leaf agar medium (CLA), with the purpose of enhancing the resulting growth. The purification of the isolates was performed using the monosporic cultures technique in PDA medium as described by Leslie and Summerell (2006).

Cultural and morphological identification

The cultural characteristics of the predominant isolate were recorded from colonies grown on PDA medium in Petri dishes and in potato-agar pulp (PPA) in test tubes, where the type of growth, pigmentation in the culture medium and sporodochia formation and pigmentation were considered. The isolates were transferred to Petri dishes containing PDA and to others with CLA, in order to induce the formation of reproductive structures (conidia) and resistance (chlamydospores). The morphological structures were analyzed in a compound microscope, with which 100 replicates were measured for each structure (macroconidia, microconidia, phialides and chlamydospores). Identification of the genera of the isolated fungi was performed using the taxonomic keys of Barnett and Hunter (2006), while the identification at species level was based on the descriptions by Toussound and Nelson (1976), Nelson *et al.* (1983), and Leslie and Summerell (2006). The identification at species level was conducted only for fungus with a history of pathogenicity on chrysanthemum plants.

Pathogenicity test

The pathogenicity test was conducted with an isolate of *Fusarium* sp., which was the most frequently found fungal species and which is also reported in the literature as having the greatest pathogenic potential. A monosporic isolate was inoculated into 100 chrysanthemum plantlets of the cultivar 'Eleonora,' which were cultivated in pots. The inoculum consisted of a conidia suspension at a concentration of 1×10^6 spores·ml⁻¹, in which the chrysanthemum plantlet roots were introduced for 30 min. After this period, the plantlets were potted and watered until reaching soil saturation. Ten plantlets, which served as a control, were only watered with sterile distilled water. All plantlets were incubated in a growth chamber at 95 % relative humidity and 18 °C for four days. Subsequently, the pots were placed in a greenhouse at 25 ± 2 °C. The progress of symptom expression was recorded every 48 h.

Molecular characterization

To confirm the morphological identification of the fungus used in pathogenicity tests, this isolate was grown in

se introdujeron las raíces de las plántulas de crisantemo durante 30 min. Pasado el tiempo, las plántulas se incorporaron a macetas y se regaron hasta obtener la saturación del suelo. Diez plántulas, que sirvieron como control, únicamente se regaron con agua destilada estéril. Todas las plántulas se incubaron en una cámara bioclimática a 95 % de humedad relativa y 18 °C durante cuatro días. Posteriormente, las macetas se colocaron en un invernadero a 25 ± 2 °C. El avance de la expresión de síntomas se registró cada 48 h.

Caracterización molecular

Para confirmar la identificación morfológica del hongo usado en pruebas de patogenicidad, dicho aislamiento se cultivó en medio papa-dextrosa (PD) bajo agitación constante a 25 °C durante seis días. Mediante la técnica de extracción CTAB (Young-Mi *et al.*, 2000), se extrajo el ADN genómico total a partir del micelio desarrollado en medio PD. La amplificación de las regiones ITS (Internal Transcribed Spacer) se realizó usando los iniciadores universales ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') e ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3'), de acuerdo al protocolo propuesto por White *et al.* (1990) y Young-Mi *et al.* (2000).

Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1.2 %, y se observaron en un fotodocumentador (Bio-Imaging Systems Mini Bis Pro®, USA). La cámara de electroforesis se mantuvo a 80 V por 60 min a temperatura de 20 ± 2 °C.

Los productos de PCR se purificaron con el kit Wizard SV Gel (PCR Clean-up System®, USA). Los fragmentos obtenidos se secuenciaron en un secuenciador Genetic Analyzer 3100 (Applied Biosystem®, USA). La secuencia obtenida se depositó en la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information) bajo el número de acceso EU109673. Esta secuencia se alineó con las secuencias disponibles en la base de datos del NCBI y se comparó con el programa Clustal W.

Reacción de variedades

Para evaluar la respuesta a la infección por el hongo en variedades de crisantemo, se utilizaron 120 plántulas de cada una de las siguientes variedades: 'Leonora', 'Indianapolis', 'Puma', 'Codorniz', 'Polar' y 'Spider'. Se estableció un diseño experimental completamente al azar y cada tratamiento presentó seis repeticiones, en donde cada unidad experimental constó de 20 plantas inoculadas. El testigo lo representaron 20 plantas sin inocular (inmersión de raíces en agua destilada estéril). La inoculación se realizó tal y como se describió anteriormente en la prueba de patogenicidad. La evaluación de la severidad se realizó 15 días posteriores a la inoculación, con el uso de una escala visual, en donde 1) planta asintomática = 0 %; 2) hojas ver-

potato-dextrose (PD) medium under constant stirring at 25 °C for six days. Using the CTAB extraction technique (Young-Mi *et al.*, 2000), total genomic DNA was extracted from the mycelium developed in PD medium. Amplification of the ITS (Internal Transcribed Spacer) regions was performed using the universal primers ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') and ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') according to the protocol proposed by White *et al.* (1990) and Young-Mi *et al.* (2000).

The PCR products were analyzed by electrophoresis in agarose gel at 1.2 %, and observed in a gel documentation system (Bio-Imaging Systems Mini Bis Pro®, USA) for photodocumentation. The electrophoresis chamber was kept at 80 V for 60 min at 20 ± 2 °C.

The PCR products were purified with the Wizard SV Gel Kit (PCR Clean-up System®, USA). The fragments obtained were sequenced in a Genetic Analyzer 3100 sequencer (Applied Biosystems®, USA) sequencer. The obtained sequence was deposited in the NCBI (National Center for Biotechnology Information) database with access number EU109673. This sequence was aligned with available sequences in the NCBI database and compared using the Clustal W program.

Reaction of cultivars

To assess the response to fungal infection in chrysanthemum cultivars, 120 plantlets were used for each of the following cultivars: 'Eleonora', 'Indianapolis', 'Puma', 'Quail', 'Polar', and 'Spider'. A completely randomized experimental design was established, and each treatment had six repetitions, in which each experimental unit consisted of 20 inoculated plants. The control consisted of 20 uninoculated plants (roots immersed in sterile distilled water). The inoculation was performed as previously described in the pathogenicity test. The severity assessment was performed 15 days after inoculation, using a visual scale, where 1) asymptomatic plant = 0 %; 2) green leaves with onset of wilting and yellowing = 20 %; 3) lower leaves wilted = 40 %; 4) lower middle third of plant with yellowing, and necrosis and wilting on leaves = 60 %; 5) yellowish parts, necrosis on leaves and stem, and wilting on most of it = 80%; and 6) dead plant = 100 %.

Statistical Analysis

Once the evaluation of the cultivars concluded, disease severity was calculated with the following formula:

$$P = \sum_{i=1}^6 \frac{n_i \times V_i}{V_i \times N} \times 100$$

Where

des con inicio de marchitez y amarillamiento = 20 %; 3) hojas inferiores marchitas = 40 %; 4) tercio medio inferior de la planta amarillento, y con necrosis y marchitez en hojas = 60 %; 5) partes amarillentas, necrosis en hojas y tallo, además de presentar marchitez en su mayoría = 80 %; y 6) planta muerta = 100 %.

Análisis estadístico

Una vez concluida la evaluación de las variedades, la severidad de la enfermedad se calculó con la siguiente fórmula:

$$P = \sum_{i=1}^6 \frac{n_i \times V_i}{V_i \times N} \times 100$$

Donde

P= porcentaje de severidad,

n_i = número de plantas de la categoría i ,

V_i = valor numérico de la categoría i ,

N= Tamaño de muestra.

El experimento completo se realizó dos veces. Los datos obtenidos en cada uno de los experimentos se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) y comparación de medias con la prueba de Tukey ($P < 0.05$), usando el programa estadístico SAS, versión 9.1.3 (Anónimo, 2003).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Síntomas en material colectado

Las plantas colectadas en los invernaderos presentaron hojas amarillentas, curvadas y con necrosis (Figura 1A), además de tallos con rayado horizontal morado. En casos avanzados se observaron tallos curvados con pudrición seca interna (Figura 1B). Los síntomas de pudrición seca del tallo descritos anteriormente coinciden con los síntomas reportados por Armstrong *et al.* (1970) para el caso de *F. oxysporum* f. sp. *chrysanthemi* en plantas de crisantemo. Asimismo, concuerdan con los síntomas descritos por Engelhard y Woltz (1971), y García-Velasco *et al.* (2003), quienes además mencionaron que la presencia de necrosis en el tallo ocasiona la muerte de la planta.

Frecuencia de hongos aislados

Un total de 200 aislamientos de hongos se obtuvieron a partir de tejidos sembrados en medio de cultivo PDA. La

P = severity percentage,

n_i = plant number in category i ,

V_i = numerical value of category i ,

N = sample size.

The complete experiment was performed twice. Data from each experiment were subjected to analysis of variance (ANOVA) and comparison of means by the Tukey test ($P < 0.05$), using SAS statistical software, version 9.1.3 (Anónimo, 2003).

RESULTS AND DISCUSSION

Symptoms in collected material

The plants collected in the greenhouses had yellowed, curved leaves with necrosis (Figure 1A), as well as horizontally-striped purple stems. In advanced cases curved stems with internal dry rot were observed (Figure 1B). The dry stem rot symptoms described above match those symptoms reported by Armstrong *et al.* (1970) for the case of *F. oxysporum* f. sp. *chrysanthemi* in chrysanthemum plants. Furthermore, they are consistent with the symptoms described by Engelhard and Woltz (1971), and García-Velasco *et al.* (2003), who also mentioned that the presence of necrosis in the stem causes plant death.

Frequency of isolated fungi

A total of 200 fungal isolates were obtained from tissues grown in PDA culture medium. The frequency of each isolated fungi genus is shown in Figure 2. *Fusarium* sp. had the highest frequency (57 %), followed by *Alternaria* sp., *Cladosporium* sp., *Epicoccum* sp., *Nigrospora* sp., and *Aspergillus* sp. However, these genera were discarded, because they mainly exhibit saprophytic habits (Barnett and Hunter, 2006), so only *Fusarium* sp. was used.

Cultural and morphological identification

Mycelial growth in tubes with PPA culture medium showed greenish and orange coloring in the center (Figure 1C), consistent with that reported by Nelson *et al.* (1983), Li *et al.* (2000), and Leslie and Summerell (2006), whereas the PDA and CLA culture media proved to be useful for the production of fungal reproductive structures. However, the best mycelial growth and greatest sporulation were obtained 18 days after planting in PDA medium, which is consistent with that mentioned by Leslie and Summerell (2006). Colonies in PDA showed a creamy-white color, with a yellow halo and greenish coloring at the center (Figure 1D). Sporodochia were abundantly produced and presented cream, blue and green coloring, as noted by Nelson *et al.* (1983).

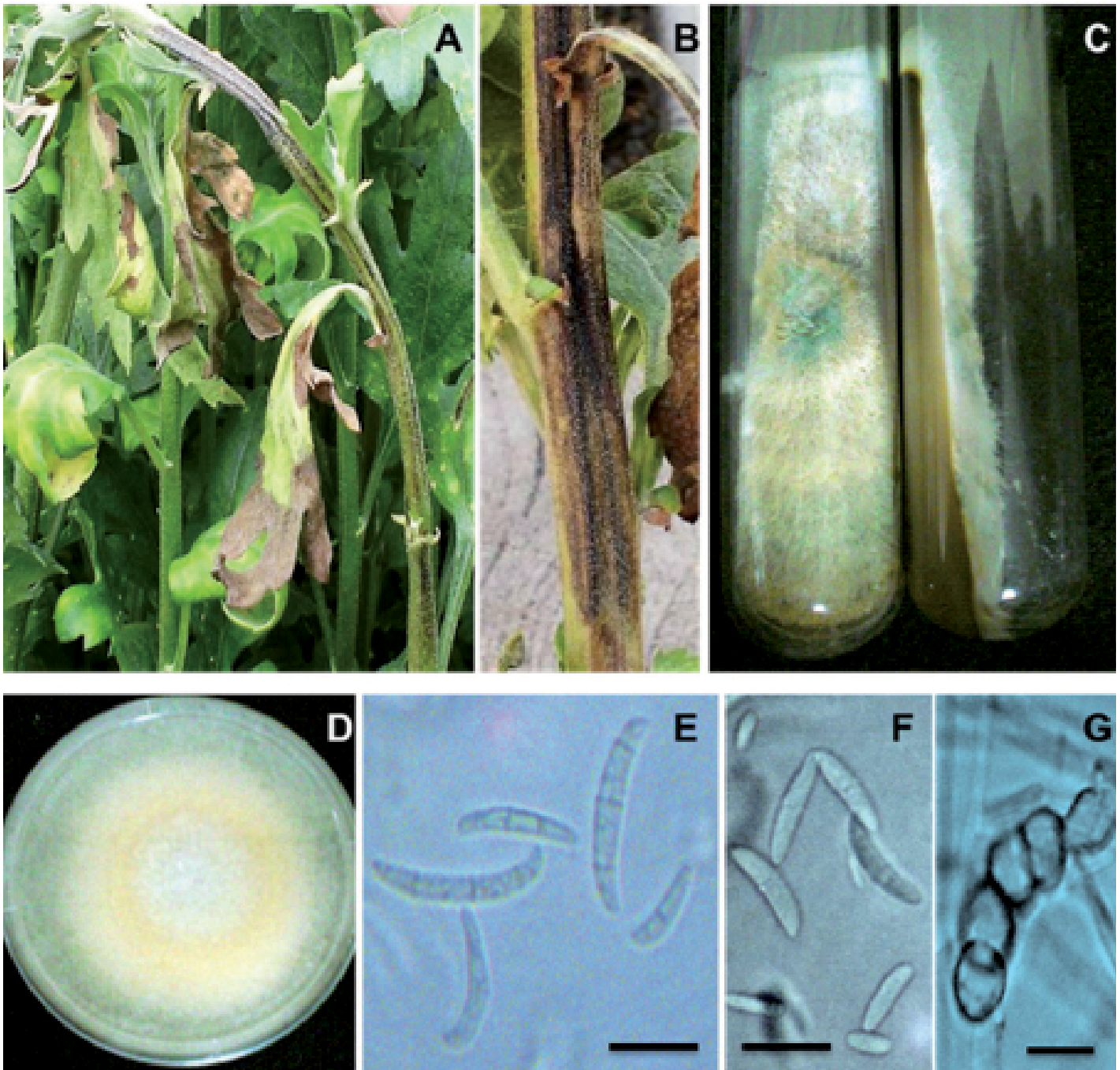


FIGURA 1. Síntomas y estructuras de reproducción de *Fusarium solani* en plantas de crisantemo. A) Necrosis en el tercio superior del tallo, coloración café oscura-purpura. B) Necrosis y pudrición seca en el interior del tallo. C) Colonias amarillentas con centro verdoso y naranja en medio pulpa de papa. D) Crecimiento con micelio aéreo de color blanco y con halo amarillo-crema en medio PDA. E) Macroconidios. F) Microconidios. G) Cadena de clamidosporas. Barras= 25 μm (E), 10 μm (F y G).

FIGURE 1. Symptoms and reproductive structures of *Fusarium solani* in chrysanthemum plants. A) Necrosis in the upper third of the plant, dark brown-purple coloring. B) Necrosis and dry rot inside the stem. C) Yellowish colonies with greenish and orange center in potato pulp medium. D) Growth with white aerial mycelium and yellow-cream halo in PDA medium. E) Macroconidia. F) Microconidia. G) Chain of chlamydoconidia. Bars = 25 μm (E), 10 μm (F y G).

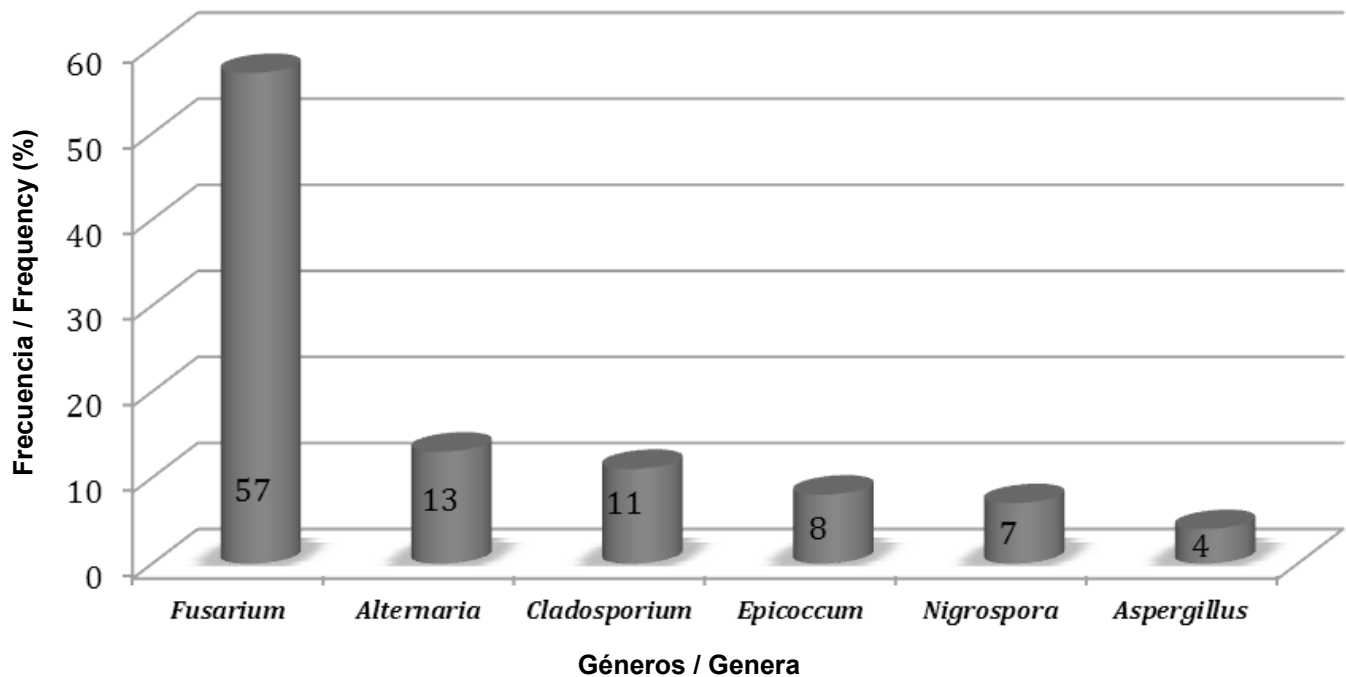


FIGURA 2. Frecuencia de hongos aislados a partir de síntomas de pudrición seca del tallo en plantas de crisantemo colectadas durante julio 2006 - febrero 2007 en la región de Texcoco, Estado de México.

FIGURE 2. Frequency of isolated fungi from dry stem rot symptoms in chrysanthemum plants collected between July 2006 and February 2007 in the Texcoco region, State of Mexico.

frecuencia de cada uno de los géneros de hongos aislados se muestra en la Figura 2. *Fusarium* sp. presentó la mayor frecuencia (57 %), seguido por *Alternaria* sp., *Cladosporium* sp., *Epicoccum* sp., *Nigrospora* sp. y *Aspergillus* sp. Sin embargo, estos últimos géneros se descartaron, debido a que estos hongos exhiben principalmente hábitos saprofiticos (Barnett y Hunter, 2006), por lo que únicamente se trabajó con *Fusarium* sp.

Identificación cultural y morfológica

El crecimiento micelial en tubos con medio de cultivo PPA mostró coloraciones verdosas y naranja en el centro (Figura 1C), acordes con lo reportado por Nelson *et al.* (1983), Li *et al.* (2000), y Leslie y Summerell (2006), mientras que los medios de cultivo PDA y CLA mostraron ser útiles para la producción de estructuras de reproducción del hongo. Sin embargo, el mejor crecimiento micelial y la mayor esporulación se obtuvieron a los 18 días posteriores a la siembra en medio PDA, que coincide con lo mencionado por Leslie y Summerell (2006). Las colonias en PDA presentaron color blanco-crema, con un halo amarillo y en la parte del centro una coloración verdosa (Figura 1D). Los esporodocios se produjeron en abundancia y exhibieron coloración crema, azul y verde, tal y como lo indicó Nelson *et al.* (1983).

En microscopía de luz se observaron las siguientes características:

The following characteristics were observed in light microscopy:

-Straight to slightly curved macroconidia, 50 x 5.5 μm , with rounded ends, 3 - 6 septa, the apical cell obtuse-rounded, whereas the basal cell showed different shapes (straight, cylindrical and rounded) (Figure 1E).

-Oval-ellipsoidal microconidia, with or without septum, 9.5-11.5 x 3-4 μm (Figure 1F), formed around false heads or on relatively long monophialides.

-Conidiophores branched in monophialides; phialides of 52-78 x 2.6-2.9 μm .

-Chlamydospores usually formed within 2-4 weeks, globose-oval, intercalary or terminal, 10 x 9 μm , with smooth or rough wall (Figure 1G).

All of the observed characteristics coincide with those described by Toussound and Nelson (1976), Nelson *et al.* (1983), and Leslie and Summerell (2006) for the case of *Fusarium solani* (Teleomorph: *Haemanectria haematococca*).

Up until now, all reports of stem rot, wilting and leaf necrosis in chrysanthemum plants had reported *Fusarium oxysporum* as the disease causal agent. However, the iso-

-Macroconidios rectos a ligeramente curvos, de 50 x 5.5 μm , con las terminaciones redondeadas, con 3-6 septos, la célula apical obtusa-redondea, mientras que la célula basal mostró diferentes formas (rectas, cilíndricas y redondeadas) (Figura 1E).

-Microconidios ovales-elipsoides, con o sin septo, de 9.5-11.5 x 3-4 μm (Figura 1F), formados alrededor de falsa cabezas o sobre monofiálides relativamente largas.

-Conidióforos ramificados en monofiálides; fiálides de 52-78 x 2.6-2.9 μm .

-Clamidosporas generalmente formadas en 2-4 semanas, globosas-ovales, intercalares o terminales, de 10 x 9 μm , con pared lisa o rugosa (Figura 1G).

Todas las características observadas coincidieron con las descritas por Toussound y Nelson (1976), Nelson *et al.* (1983), y Leslie y Summerell (2006) para el caso de *Fusarium solani* (Teleomorfo: *Haemanectria haematococca*).

Hasta la fecha, todos los reportes de pudrición de tallo, marchitez y necrosis foliar en plantas de crisantemo habían reportado a *Fusarium oxysporum* como el agente causal de la enfermedad. Sin embargo, los aislamientos identificados en este estudio no presentaron los caracteres representativos de *F. oxysporum*.

Muchos investigadores confunden a *F. solani* con *F. oxysporum*. Esta confusión refleja la superposición en algunos aspectos de la morfología y nichos ecológicos. Según Leslie y Summerell (2006), *F. solani* y *F. oxysporum* pueden ser diferenciados mediante la examinación de las fiálides donde se desarrollan los microconidios. Las monofiálides largas que llevan microconidios de *F. solani* son bastante diferentes de las monofiálides relativamente cortas de *F. oxysporum*. Otra diferencia marcada es que los microconidios de *F. solani* tienden a ser más anchos, ovales y con paredes más gruesas que los microconidios de *F. oxysporum*. Además, *F. solani* presenta microconidios con hasta dos septos, mientras que los de *F. oxysporum* generalmente son sin septos.

Prueba de patogenicidad

El 100 % de las plántulas inoculadas con el aislamiento de *F. solani* desarrollaron síntomas de la enfermedad a los 15 días después de la inoculación, mientras que, las plantas control permanecieron libres de la enfermedad. El tiempo de aparición de síntomas coincidió con lo mencionado por Strider (1985), Hung-Chang *et al.* (1992), García-Velasco *et al.* (2003) y Garibaldi *et al.* (2009) para el caso de variedades de crisantemo inoculadas con *F. oxysporum*.

lates identified in this study did not present the representative characters of *F. oxysporum*.

Many researchers confuse *F. solani* with *F. oxysporum*. This confusion reflects the overlap in some morphology and ecological niche aspects. According to Leslie and Summerell (2006), *F. solani* and *F. oxysporum* can be distinguished by examining the phialides where microconidia develop. The long monophialides carrying *F. solani* microconidia are very different from the relatively short *F. oxysporum* monophialides. Another marked difference is that *F. solani* microconidia tend to be wider, oval and with thicker walls than *F. oxysporum* microconidia. Furthermore, *F. solani* presents microconidia with up to two septa, while those of *F. oxysporum* are usually without septa.

Pathogenicity test

One hundred percent of the plantlets inoculated with *F. solani* isolate developed disease symptoms 15 days after inoculation, whereas control plants remained disease free. The time for the symptoms to appear coincided with that reported by Strider (1985), Hung-Chang *et al.* (1992), García-Velasco *et al.* (2003) and Garibaldi *et al.* (2009) for the case of chrysanthemums inoculated with *F. oxysporum*.

From symptomatic inoculated plants, *F. solani* was isolated again. These isolates showed the same morphological characteristics as the inoculated isolates, with which Koch's Postulates were completed and *F. solani* was confirmed as the disease-inducing agent.

Molecular characterization

The isolate used in this research showed strong DNA amplification in the PCR, using the aforementioned primers, resulting in a product of 600 bp, which coincide with those reported by Li *et al.* (2000) and Young-Mi *et al.* (2000). The sequence obtained in this study (Genbank access number EU109673) showed 99 % similarity to the JQ277276 *Fusarium solani* sequence deposited in the NCBI database.

The ITS region sequence confirmed the result of the morphological and cultural identification, indicating that *F. solani* is the inducing agent of stem rot and wilting of chrysanthemum plants in greenhouses in the Texcoco region. This result differs from that reported by Armstrong *et al.* (1970), Hung-Chang *et al.* (1992), García-Velasco *et al.* (2003) and Garibaldi *et al.* (2009), who only noted *F. oxysporum* f. sp. *chrysanthemi* as responsible for causing these symptoms.

Cultivar reaction

All six chrysanthemum cultivars evaluated in this study proved to be susceptible to *Fusarium solani*, because they

CUADRO 1. Respuesta de seis variedades de crisantemo a la infección por *Fusarium solani*.

TABLE 1. Response of six chrysanthemum cultivars to *Fusarium solani* infection.

Variedad / Cultivar	Severidad / Severity (%)
Polar	93.94 a*
Leonora / Eleonora	89.47 ab
Indianápolis / Indianapolis	80.52 b
Codorniz / Quail	70.57 b
Puma	39.47 c
Spider	29.47 c

*Medias con la misma letra no difieren significativamente de acuerdo con la prueba de Tukey a una $P \leq 0.05$.

*Means with the same letter are not significantly different according to the Tukey test at $P \leq 0.05$.

A partir de plantas inoculadas sintomáticas, se volvió a aislar a *F. solani*. Dichos aislamientos presentaron las mismas características morfológicas que los aislamientos inoculados, con lo que se completaron los Postulados de Koch y se confirmó que *F. solani* es el agente inductor de la enfermedad.

Caracterización molecular

El aislamiento usado en este trabajo mostró fuerte amplificación de ADN en la PCR, utilizando los iniciadores antes mencionados, lo que resultó en un producto de 600 pb, que coinciden con lo mencionado por Li *et al.* (2000) y Young-Mi *et al.* (2000). La secuencia obtenida en este estudio (No. de acceso del Genbank EU109673) mostró un 99 % de similitud con la secuencia JQ277276 de *Fusarium solani* depositada en la base de datos del NCBI.

La secuencia de la región ITS confirmó el resultado de la identificación morfológica y cultural, lo que indicó que *F. solani* es el agente inductor de la pudrición de tallos y marchitez de plantas de crisantemo en invernaderos de la región de Texcoco. Este resultado difiere con lo reportado por Armstrong *et al.* (1970), Hung-Chang *et al.* (1992), García-Velasco *et al.* (2003) y Garibaldi *et al.* (2009), quienes únicamente señalaron a *F. oxysporum* f. sp. *chrysanthemi* como el responsable de causar los síntomas mencionados.

Reacción de variedades

Las seis variedades de crisantemo evaluadas en este estudio mostraron ser susceptibles a *Fusarium solani*, debido a que presentaron síntomas característicos de la enfermedad como amarillamiento, marchitez, necrosis en hojas y en tallo. Sin embargo, el análisis de varianza mostró diferencias significativas en el porcentaje de severidad entre variedades (Cuadro 1). Las variedades 'Polar', 'Leonora', 'Indianápolis' y 'Codorniz' mostraron porcentajes de severidad mayores a 70 %, por lo que se considera-

presented characteristic symptoms of the disease such as yellowing, wilting, and necrosis in leaves and stem. However, the analysis of variance showed significant differences in the severity percentage among cultivars (Table 1). The 'Polar', 'Eleonora', 'Indianapolis', and 'Quail' cultivars showed severity percentages higher than 70 %, so they were considered highly susceptible to the pathogen. Plant death was observed in severe infection cases. The 'Polar' cultivar showed the greatest number of plants with this characteristic. This coincides with studies conducted by García-Velasco *et al.* (2003), who indicated that the 'Polar' cultivar is highly susceptible to *Fusarium oxysporum* attack in greenhouses in the State of Mexico.

On the other hand, the 'Puma' and 'Spider' cultivars behaved as the most tolerant to infection by *Fusarium solani*, presenting the lowest severity percentages. According to Strider (1985), Gardiner *et al.* (1989) and Garibaldi *et al.* (2009), the most efficient control method for *Fusarium* spp. in chrysanthemum plants is the use of tolerant and resistant cultivars. This study confirmed that in Mexico there are chrysanthemum cultivars that are tolerant to infection by *F. solani*. However, it is recommended to conduct further studies with the use of a wider range of chrysanthemum genotypes, in order to find sources of resistance to this pathogen.

CONCLUSIONS

By means of morphological, molecular and pathogen-ic characterization, it was determined that *Fusarium solani* is the causal organism of chrysanthemum dry stem rot in greenhouses in Texcoco, State of Mexico.

The 'Polar', 'Eleonora', 'Indianapolis', and 'Quail' cultivars proved to be highly susceptible to infection by *Fusarium solani*, whereas the 'Puma' and 'Spider' cultivars were tolerant to infection by the pathogen.

End of English Version

ron como altamente susceptibles al patógeno. En casos de infecciones severas, se observó muerte de plantas. La variedad 'Polar' exhibió el mayor número de plantas con esta característica. Lo anterior coincide con los estudios realizados por García-Velasco *et al.* (2003), quienes indicaron que la variedad 'Polar' es altamente susceptible al ataque por *Fusarium oxysporum* en invernaderos del Estado de México.

Por otra parte, las variedades 'Puma' y 'Spider' se comportaron como las más tolerantes a la infección por *Fusarium solani*, al presentar los más bajos porcentajes de severidad. Según Strider (1985), Gardiner *et al.* (1989) y Garibaldi *et al.* (2009), el método de control más eficiente para *Fusarium* spp. en plantas de crisantemo es el uso de variedades tolerantes y resistentes. Este estudio confirmó que en México existen variedades de crisantemo que presentan tolerancia a la infección por *F. solani*. Sin embargo, se sugiere llevar a cabo futuros trabajos con el uso de una gama más amplia de genotipos de crisantemo, con la finalidad de encontrar fuentes de resistencia para este patógeno.

CONCLUSIONES

Mediante caracterización morfológica, molecular y patogénica, se determinó que *Fusarium solani* es el organismo causal de la pudrición seca del tallo del crisantemo en invernaderos de Texcoco, Estado de México.

Las variedades 'Polar', 'Leonora', 'Indianápolis' y 'Cordorniz' mostraron ser altamente susceptibles a la infección por *Fusarium solani*, mientras que, las variedades 'Puma' y 'Spider' fueron tolerantes a la infección por el patógeno.

LITERATURA CITADA

ANÓNIMO. 2003. Statistical Analysis System Version 9.1.3. SAS Institute Inc., Cary. N.C., USA.

ANÓNIMO. 2012. Cierre de la producción agrícola por cultivo. Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera. <http://www.siap.gob.mx/index>.

ARMSTRONG, G. M.; ARMSTRONG, J. K.; LITRELL, R. H. 1970. Wilt of chrysanthemum caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *chrysanthemi*, forma specialis nov. Phytopathology 60: 496-498. doi: 10.1094/Phyto-60-496

BARNETT, H. L.; HUNTER, B. B. 2006. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. Fourth Edition. St. Paul, Minnesota. 241 p.

ENGELHARD, A. W.; WOLTZ, S. S. 1971. Fusarium wilt of chrysanthemum: symptomatology and cultivar reactions. Florida Agricultural Experiment Stations Journal 4153:

351-354. <http://www.fshs.org/Proceedings/Password%20Protected/1971%20Vol.%2084/351-354%20%28ENGELHARD%29.pdf>

- FLORES-RUVALCABA, J. S.; BECERRIL-ROMÁN, A. E.; GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ, V. A.; TIJERINA-CHÁVEZ, L.; VÁSQUEZ-ROJAS, T. 2005. Crecimiento vegetativo y floral del crisantemo *Dendratema x grandiflorum* (Ramat) Kitamura en respuesta a la presión osmótica de la solución nutritiva. Revista Chapingo Serie Horticultura 11(2): 241-249. <http://www.chapingo.mx/revistas/horticultura/contenido.php?file=f5f2f3f1e7d9a5b68117e8b03ec24a56&ext=pdf>
- GARCÍA-VELASCO, R.; OCHOA-MARTÍNEZ, D.; ZAVALETA-MEJÍA, E.; MORA-AGUILERA, G.; GAYTÁN-ACUÑA, E. A. 2003. Etiología de la marchitez del crisantemo (*Dendratema grandiflora* Tzevelec) cv. Polaris. Revista Mexicana de Fitopatología 21: 75-78. <http://www.sociedadmexicanadefitopatologia.org/archives/61221112.pdf>
- GARDINER, D. C.; HORST, R. K.; NELSON, P. E. 1989. Influence of night temperature on disease development in *Fusarium* wilt of chrysanthemum. Plant Disease 73: 34-37. http://www.apsnet.org/publications/PlantDisease/BackIssues/Documents/1989Articles/PlantDisease73n01_34.pdf
- GARIBALDI, A.; BERTETTI, D.; GULINNO, M. L. 2009. Susceptibility of chrysanthemum and paris daisy varieties to several isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *chrysanthemi*. Commun. Agric. Appl. Biot. Sci. 47(3): 657-657. http://pubget.com/paper/20222547/Susceptibility_of_chrysanthemum_and_Paris_daisy_varieties_to_several_isolates_of_Fusarium_oxysporum_f_sp_chrysanthemi
- GLEASON, M. L.; DAUGHTREY, M. L.; CHASE, A. R.; MOORMAN, G. W.; MUELLER, D. S. 2009. Diseases of Herbaceous Perennials. American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, USA. 281 p.
- HORST, R. K.; NELSON, P. E. 1997. Compendium of Chrysanthemum Diseases. American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, USA. 62 p.
- HUNG-CHANG, H.; PHILLIPPE, L. M.; MARSHALL, H. H.; COLLICUTT, L. M.; NEISH, G. A. 1992. Wilt of hard Chrysanthemum caused by a new race of *Fusarium oxysporum* f. sp. *chrysanthemi*. Plant Pathology Bulletin 1: 57-61.
- LESLIE, J. F.; SUMMERELL, B. A. 2006. The Fusarium Laboratory Manual. Blackwell Publishing. Iowa, USA. 388 p.
- LI, S.; TAM, Y. K.; 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. doi: 10.1094/PHYTO.2000.90.5.491

- NELSON, P. E.; TOUSSOUN, T. A.; MARASAS, W. F. 1983. *Fusarium* Species: An Illustrated Manual for Identification. The Pennsylvania State University Press. Pennsylvania, USA. 193 p.
- STRIDER, D. L. 1985. Fusarium wilt of chrysanthemum: cultivar susceptibility and chemical control. *Plant Disease* 69: 564-568. doi: 10.1094/PD-69-564
- TOUSSOUN, T. A.; NELSON, E. P. 1976. *Fusarium*: A Pictorial Guide to the Identification of *Fusarium* species according to the taxonomic system of Snyder and Hansen. Second Edition. The Pennsylvania State University Press. Pennsylvania, USA. 45 p.
- WHITE, T. J.; LEE, B. S.; TAYLOR, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. pp. 315-322. *In*: Innis, M.A., D. A. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White (eds). *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Academic Press, CA, USA.
- YOUNG-MI, L.; YONG-KEEL, C.; BYUNG-RE, M. 2000. Molecular characterization of *Fusarium solani* and its formae speciales based on sequences analysis of the internal transcribed spacer (ITS) region ribosomal DNA. *Mycobiology* 28(2): 82-88. <http://www.mycobiology.or.kr/Synapse/Data/PDFData/0184MB/mb-28-82.pdf>