



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

INSTITUTO DE HORTICULTURA

BIOCONTROL DE HONGOS FITOPATÓGENOS A PARTIR DE
BULBOS REUTILIZADOS DE *Lilium* híbrido L/A "Indian summer"

TESIS

Que como requisito parcial
para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

Presenta:

ANYGIM SENYASE ITURBIDE ZUÑIGA



DIRECCIÓN GENERAL ACADÉMICA
DPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
DPTO. DE EXAMENES PROFESIONALES

Bajo la supervisión de: Dra. MARÍA TERESA BERYL COLINAS Y
LEÓN



Chapingo, Estado de México a 16 de diciembre 2016,

**BIOCONTROL DE HONGOS FITOPATÓGENOS A PARTIR DE BULBOS
REUTILIZADOS DE *Lilium* HÍBRIDO L/A "Indian summer"**

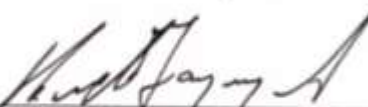
Tesis realizada por **Anygim Senyase Iturbide Zuñiga**, bajo la supervisión del comité asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

DIRECTOR:


Dra. María Teresa Beryl Colinas Y León

ASESOR:


Dr. Héctor Lozoya Saldaña

ASESOR:


Dr. Jesús Axayacatl Cuevas Sánchez

ASESOR:


Dr. Juan Ayala Arreola

LECTOR EXTERNO:


Dr. Sergio Alejandro Medina Moreno

Contenido

DEDICATORIAS	i
AGRADECIMIENTOS	ii
DATOS BIOGRÁFICOS	iii
RESUMEN GENERAL	iv
GENERAL ABSTRACT	v
CAPITULO I	1
INTRODUCCIÓN	1
JUSTIFICACIÓN	2
OBJETIVOS	2
Objetivo general	2
Objetivos específicos	3
HIPÓTESIS	3
CAPITULO II	4
REVISIÓN DE LITERATURA	4
Generalidades de <i>Lilium</i> sp.	4
Clasificación botánica y taxonomía	4
Morfología	5
Fenología	6
Multiplicación de <i>Lilium</i> sp.	8
Multiplicación por semilla	8
Multiplicación por escamas	9
Factores de producción	9
pH	9
Salinidad	9
Luz	10
Humedad	10
Temperatura	11
Nutrición	12
Sustratos	13

Importancia económica de <i>Lilium</i> sp.	14
Situación mundial de <i>Lilium</i> sp.	14
Situación nacional de <i>Lilium</i> sp.	15
Manejo post-cosecha	16
Colecta de bulbos de <i>Lilium</i> sp.	16
Almacenamiento de bulbos <i>Lilium</i> sp.	17
Plagas y enfermedades de <i>Lilium</i> sp.	17
Hongos patógenos de menor incidencia en <i>Lilium</i> sp.	19
Hongos patógenos de mayor incidencia en <i>Lilium</i> sp.	20
<i>Aspergillus niger</i>	21
<i>Fusarium oxysporum</i>	22
<i>Penicillium janthinellum</i>	23
<i>Rhizoctonia solani</i>	24
Proceso de infección de hongos en <i>Lilium</i> sp.	25
Control y manejo de hongos patógenos de <i>Lilium</i> sp.	27
Control cultural de patógenos	27
Control químico de patógenos	28
Control biológico de patógenos	29
Tratamientos Hidrotérmicos	30
CAPITULO III	31
MATERIALES Y MÉTODOS	31
Localización del experimento	31
Material vegetal	31
Material microbiológico	32
Aislamiento e identificación de hongos fitopatógenos silvestres	32
Caracterización de hongos fitopatógenos silvestres	33
Extracción de ADN	33
Análisis molecular	35
Análisis de patogenicidad	36
Obtención del extracto vegetal	37
Cromatografía en capa fina	38
Obtención del extracto vegetal no polar (EVNP)	39

Obtención del extracto medianamente polar (EMP)	39
Obtención del extracto vegetal polar (EVP)	39
Caracterización del extracto vegetal	39
Bioensayos de inhibición (Antibiogramas)	40
Análisis estadístico	41
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	41
Aislamiento e identificación de hongos fitopatógenos silvestres	41
Caracterización morfológica de hongos fitopatógenos silvestres	44
Descripción morfológica macroscópica de <i>Aspergillus niger</i> .	45
Descripción morfológica microscópica de <i>Aspergillus niger</i> .	45
Descripción morfológica macroscópica de <i>Fusarium oxysporum</i> .	46
Descripción morfológica microscópica de <i>Fusarium oxysporum</i> .	46
Descripción morfológica macroscópica de <i>Penicillium janthinellum</i>	47
Descripción morfológica microscópica de <i>Penicillium janthinellum</i> .	48
Descripción morfológica macroscópica de <i>Rhizoctonia solani</i>	49
Descripción morfológica microscópica de <i>Rhizoctonia solani</i> .	49
Caracterización molecular de hongos fitopatógenos silvestres	50
Extracción de ADN	50
Calidad del ADN	51
PCR-ITS	51
Cotejo de las secuencias génicas	59
Análisis de Patogenicidad	60
Obtención del Extracto Vegetal	61
Cromatografía en capa fina (CCF)	62
Caracterización del Extracto Vegetal	63
Bioensayos de inhibición	65
CONCLUSIONES	73
BIBLIOGRAFÍA	74

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1 Localización de los puntos de muestreo	32
Cuadro 2 Composición de la mezcla de reacción para PCR	35
Cuadro 3 Mezclas de eluyentes utilizados en cromatografía de capa fina	38
Cuadro 4 Escala de clasificación del efecto inhibitorio de los extractos sobre el crecimiento micelial de los hongos fitopatógenos <i>Rhizoctonia</i> sp, <i>Fusarium</i> sp. <i>Sclerotium</i> sp. (Chávez y Aquino, 2012).	40
Cuadro 5 Muestreo de microorganismos 2014	42
Cuadro 6 Muestreo confirmatorio 2015 recopilación de microorganismos en estados de mayor producción y demanda nacional.	42
Cuadro 7 Resultados morfológicos macroscópicos de <i>A. niger</i>	45
Cuadro 8 Resultados morfológicos microscópicos de <i>A. niger</i>	46
Cuadro 9 Resultados morfológicos macroscópicos de <i>F. oxysporum</i>	46
Cuadro 10 Resultados morfológicos microscópicos de <i>F. oxysporum</i>	47
Cuadro 11 Resultados morfológicos macroscópicos de <i>P. janthinellum</i>	48
Cuadro 12 Resultados morfológicos microscópicos de <i>P. janthinellum</i>	48
Cuadro 13 Resultados morfológicos macroscópicos de <i>R. solani</i>	49
Cuadro 14 Resultados morfológicos microscópicos de <i>R. solani</i>	50
Cuadro 15 Concentración de ADN obtenida de las extracciones de micelio	50
Cuadro 16 Longitudes de onda a las cuales se realizaron las lecturas en espectrofotómetro para determinar la concentración de compuestos	61
Cuadro 17 Absorbancias obtenidas de los extractos vegetales por las diferentes técnicas de obtención	62
Cuadro 18 Compuestos obtenidos del extracto vegetal de <i>Lilium</i> L/A “Indian summer” por tiempos de retención	65
Cuadro 19 Análisis de varianza simultaneo de <i>A. niger</i> , <i>F. oxysporum</i> , <i>P. janthinellum</i> y <i>R. solani</i> a diferentes tiempos de crecimiento	66
Cuadro 20 Comparación de medias del efecto de los diversos Medios + Extracto utilizados a las 48 h de crecimiento micelial.	67
Cuadro 21 Comparación de medias del efecto de los diversos Medios + Extracto utilizados a las 96 h de crecimiento micelial.	68
Cuadro 22 Comparación de medias del efecto de los diversos Medios + Extracto utilizados a las 144 h de crecimiento micelial.	69
Cuadro 23 Comparación de medias del efecto de los diversos Medios + Extracto utilizados a las 192 h de crecimiento micelial.	70
Cuadro 24 Comparación de medias del efecto de los diversos Medios + Extracto utilizados a las 240 h de crecimiento micelial.	71
Cuadro 25 Comparación de medias del efecto de los diversos Medios + Extracto utilizados a las 288 h de crecimiento micelial.	72

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Fenología típica de especies ornamentales <i>Lilium</i> híbrido Longiflorum/Asiático (L/A)	7
Figura 2 Morfología microscópica de <i>Aspergillus niger</i>	21
Figura 3 Morfología microscópica de <i>Fusarium oxysporum</i>	23
Figura 4 Morfología microscópica de <i>Penicillium janthinellum</i>	23
Figura 5 Morfología microscópica de <i>Rhizoctonia solani</i>	25
Figura 6 Hongos donados por el departamento de parasitología UACH a) <i>Aspergillus niger</i> , b) <i>Fusarium oxysporum</i> , c) <i>Penicillium janthinelum</i> , d) <i>Rhizoctonia solani</i>	41
Figura 7 Hongos aislados del Estado de México (2014) a) <i>Aspergillus niger</i> b) <i>Fusarium oxysporum</i> c) <i>Penicillium janthinelum</i> d) <i>Rhizoctonia solani</i>	43
Figura 8 Hongos aislados del estado de Jalisco (2014) a) <i>Aspergillus niger</i> b) <i>Fusarium oxysporum</i> c) <i>Penicillium janthinelum</i> d) <i>Rhizoctonia solani</i>	44
Figura 9 Hongos aislados del estado de Michoacán (2014) a) <i>Aspergillus niger</i> b) <i>Fusarium oxysporum</i> c) <i>Penicillium janthinelum</i> d) <i>Rhizoctonia solani</i>	44
Figura 10 Hongos aislados del estado de Puebla (2014) a) <i>Aspergillus niger</i> b) <i>Fusarium oxysporum</i> c) <i>Penicillium janthinelum</i> d) <i>Rhizoctonia solani</i>	44
Figura 11 Calidad de ADN de las cepas de <i>Aspergillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Rhizoctonia</i> sp. y <i>Penicillium</i> sp. en gel de agarosa al 1.2 %	51
Figura 12 Secuencia génica cruda de <i>Aspergillus niger</i> (forward)	52
Figura 13 Secuencia génica cruda de <i>Aspergillus niger</i> (reverse)	53
Figura 14 Secuencia génica cruda de <i>Fusarium oxysporum</i> (forward)	54
Figura 15 Secuencia génica cruda de <i>Fusarium oxysporum</i> (reverse)	55
Figura 16 Secuencia génica cruda de <i>Rhizoctonia solani</i> (forward)	56
Figura 17 Secuencia génica cruda de <i>Rhizoctonia solani</i> (reverse)	57
Figura 18 Secuencia génica cruda de <i>Penicillium citrinum</i> (forward)	58
Figura 19 Secuencia génica cruda de <i>Penicillium citrinum</i> (reverse)	59
Figura 20 Septo de <i>Lilium</i> L/A después de 96 h bajo infección inducida por cultivo axénico de <i>Fusarium oxysporum</i> .Las flechas señalan las afectaciones al tejido.	61
Figura 21 Cromatografía en capa fina de a) Hexano 100%, b) Hexano 100 % Acetato 100 % (8:2), c.1) Acetato de etilo 10 %, c.2) Acetato de etilo 50 % y c.3) Acetato de etilo 100 %	62
Figura 22 Cromatograma resultado del extracto vegetal no polar (solvente hexano)	64

DEDICATORIAS

A MI MADRE

**LIC. MARIA ANTONIETA ZUÑIGA
MENESES**

Por su increíble paciencia, comprensión e infinito amor que siempre y ante todo me ha demostrado.

TE SUPER AMO MAMA.

A MI ABUELA

SRA. YOLANDA MENESES

Por haber forjado mi carácter y enseñarme a cumplir metas definiendo objetivos; entendiendo que hay diferentes formas de decir “**TE QUIERO**” sin decirlo.

A MIS COMPAÑEROS Y AMIGOS

Por siempre decir las palabras justas, en los momentos correctos y estar a un mensaje de una necesidad. Espero yo haber sido lo mismo para todos.

A MI PADRE

ING. REYNALDO G. CANALES

Por ser mi mejor amigo, mi conciencia en todo momento y de vez en cuando mi cómplice de travesuras. Mi respeto y admiración por el gran hombre y ser humano que se aceptó acompañarnos en este camino.

A MI HIJO

ANTONIO EMILIANO ITURBIDE

Por siempre esperarme con paciencia y un gran entusiasmo; y darme la mejor motivación para concluir estos cuatro años.

A DIOS

Por darme la oportunidad de lograr mis metas y aprender de mis errores. Por colocar personas tan increíbles en mi vida y permitirme disfrutar cada momento con ella.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo de Nacional de Ciencia y Tecnología y a la Universidad Autónoma Chapingo por el apoyo económico brindado durante la realización de mis estudios.

A la Dra. María Teresa Beryl Colinas Y León, por el valioso y constante apoyo brindado, por su ejemplo de profesionalismo e integridad moral.

Al Dr. Héctor Lozoya Saldaña, por los consejos la dedicación y sencillez otorgados durante mi formación en el postgrado.

Al Dr. Jesús Axayacatl Cuevas Sánchez, por su apoyo incondicional en estos cuatro años como docente y asesor en este proyecto.

Al Dr. Juana Ayala Arreola, por su amistad y ayuda otorgados en todo momento

Al Dr. Sergio Alejandro Medina Moreno, por su amistad y apoyo, no solo en este periodo sino en el transcurso de mi desarrollo profesional.

Al Lic. Ricardo Gaspar Hernández, por el apoyo incondicional que siempre me brindo en todo momento y bajo cualquier circunstancia.

A Carina Ayala Cadena, por las infinitas molestias que le produjo los últimos dos años y su paciencia

DATOS BIOGRÁFICOS



Nombre: Anygim Senyase Iturbide Zuñiga

Fecha de nacimiento: 17 de agosto de 1986

Lugar de nacimiento: Ensenada, Baja California, México

CURP: IUZA860817MBCTXN10

Cédula profesional 7001612

DESARROLLO ACADÉMICO

Bachillerato: Centro de Bachillerato Tecnológico Agropecuario No. 67- Técnico en Informática Agropecuaria

Licenciatura: Universidad Politécnica de Pachuca – Ingeniero en Biotecnología

Maestría: Universidad Politécnica de Pachuca – Maestro en Biotecnología

RESUMEN GENERAL

Hoy en día, combatir a microorganismos fitopatógenos, no es una actividad compleja. No obstante la amplia diversidad de compuestos que controlan las poblaciones de la microbiota del suelo, suelen traer como consecuencias la baja producción en cultivos y la intemperización de suelos, debido a la naturaleza química de los mismos.

Sin embargo la reciente incorporación de extractos vegetales con compuestos orgánicos activos, han trascendido notablemente en la industria por la gran diversidad de aplicaciones en los diferentes mercados mundiales. Siendo tal vez el de mayor importancia el sector agrícola.

En el presente trabajo se aislaron de ambiente silvestre, 27 cepas bacterianas y 18 cepas fúngicas de los estados de Jalisco, Michoacán, Puebla y Estado de México. La caracterización morfológica y molecular permitió identificar a *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium citrinum* y *Rhizoctonia solani*.

A partir de bulbo de *Lilium* híbrido L/A “Indian summer”, que finalizaron un ciclo de cultivo, se obtuvo extracto vegetal que fue fraccionado con base a principios de polaridad, obteniendo tres extractos: EVP (extracto vegetal polar), EMP (extracto medianamente polar) y ENP (extracto no polar), los cuales fueron evaluados con antibiogramas, en los cuales el ENP presento la mayor inhibición en el crecimiento micelial del 23 % en *Fusarium oxysporum* y del 18 % en *Rhizoctonia solani*. El EMP presento la mayor inhibición de crecimiento micelial del 27.5 % en *Penicillium citrinum*. Ninguna fracción del extracto vegetal logro la inhibición del crecimiento de *Aspergillus niger*.

La caracterización del extracto vegetal demostró la presencia de ácido valérico tridecil ester, dimetil benzaldehído, metil tridecanoato y ácido octadecanoico metil ester, compuestos responsables de la actividad bactericida, fungicida y nematocida en extractos organicos de *Allium sativum*, *Coriandrum sativum*, *Eugenia caryophyllata*, *Origanum vulgare* y *Rosmarinus officinalis*.

Palabras clave: extractos vegetales, fitopatógenos, fungicida, fungistático

GENERAL ABSTRACT

Today, combating phytopathogenic microorganisms is not a complex activity. In spite of the wide diversity of compounds that control microbiota populations in the soil, they often result in low crop production and soil weathering due to their chemical nature.

However, the recent incorporation of plant extracts with organic compounds has markedly changed the industry due to the great diversity of applications in the different world markets, with perhaps the agricultural sector being the most important.

In this study, 27 bacterial strains and 18 fungal strains were isolated from the natural environment in the provinces of Jalisco, Michoacan, Puebla and Mexico State. The molecular and morphological characterization allowed identifying *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium citrinum* and *Rhizoctonia solani*.

From "Indian Summer" *Lilium* L/A hybrid bulbs, which ended a crop cycle, a plant extract was obtained and fractionated on the basis of polarity principles, obtaining three extracts: PPE (polar plant extract), MPE (moderately polar extract) and NPE (non-polar extract), which were evaluated with antibiograms, in which the NPE presented the highest inhibition of mycelial growth, attaining 23 % in *Fusarium oxysporum* and 18 % in *Rhizoctonia solani*. The MPE presented the highest inhibition of mycelial growth in *Penicillium citrinum*, with 27.5 %. No fraction of the plant extract achieved growth inhibition of *Aspergillus niger*.

The characterization of the plant extract showed the presence of valeric acid tridecyl ester, dimethyl benzaldehyde, methyl tridecanoate and octadecanoic acid methyl ester, compounds responsible for the bactericidal, fungicidal and nematocidal activity in organic extracts of *Allium sativum*, *Coriandrum sativum*, *Eugenia caryophyllata*, *Origanum vulgare* and *Rosmarinus officinalis*.

Key words: plant extracts, phytopathogenic, fungicide, fungistatic.

CAPITULO I

INTRODUCCIÓN

Se dice que es posible llevar a cabo cultivos de *Lilium* sp. en cualquier sustrato, siempre y cuando mantengan una buena permeabilidad y una estructura adecuada (Buschman, 2004). Sin embargo el no considerar al factor microbiológico que interacciona tanto de manera simbiótica como antagónica puede ser crucial para mantener un cultivo de *Lilium* y repercutir en los rendimientos del mismo.

Combatir a microorganismos fitopatógenos hoy en día no es una actividad compleja. No obstante la amplia diversidad de compuestos que controlan las poblaciones de la microbiota, suele ocasionar la baja producción en cultivos, ya que la constante incorporación de estos agentes comúnmente de naturaleza química en los suelos, provocan daños que posteriormente repercuten en la economía del productor sin mencionar los posibles daños a la salud pública.

Entre los microorganismos de mayor incidencia en *Lilium* sp. se encuentran en primer lugar los hongos (*F. oxysporum*, *P. ultimum*, *R. solani*) seguidas por las bacterias (*E. carotovora*) y los virus (LSV), es por ello que incursionar en el uso de complejos vegetales con actividad fungicida nos permite ofrecer una opción en el control de hongos fitopatógenos que sean compatibles con el cultivo o incluso acoplarlos al metabolismo del mismo, además de mantener una actividad de amplio espectro ante una diversidad microbiológica (Muñoz, Fernández, 2000).

Los bulbos de *Lilium* sp. poseen una gran variedad de usos tradicionales derivado de sus propiedades como astringente, analgésico, antiespasmódico,

antitumoral, fungicida, cicatrizante, diurético, estimulador de la fagocitosis entre otros (Wang y Wu, 2014). Por esta razón la necesidad de conocer y explotar sus propiedades como antagonico de hongos patógenos de cultivos hortícolas; además de definir si la actividad pertenece a un compuesto o familia de compuestos del complejo vegetal y evaluar el espectro de acción ante hongos de mayor incidencia en cultivos básicos y ornamentales.

JUSTIFICACIÓN

Debido al gasto económico que representa a los productores el mantener la sanidad de los sustratos así como de los bulbos de *Lilium*, Es la necesidad de estandarizar una técnica de biocontrol basada en la reutilización de estos bulbos, como medida a problemas fitopatógenos orientada principalmente a hongos. Evitando su desecho al término del ciclo de producción y aprovechar los extractos orgánicos disponibles como control biológico sobre *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium* sp. y *Rhizoctonia solani*.

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar la actividad de los extractos vegetales de los bulbos de *Lilium* L/A “Indian summer” como potencial biocontrol de hongos fitopatógenos durante el crecimiento y desarrollo in vitro de *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium janthinellum* y *Rhizoctonia solani*.

Objetivos específicos

1. Aislar e identificar morfológica y molecularmente a *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium janthinellum* y *Rhizoctonia solani* asociadas a enfermedades del bulbo de *Lilium* sp. en localidades de producción comercial
2. Estandarizar la técnica de obtención del extracto vegetal de bulbos de *Lilium* sp. que obtenga los mejores rendimientos sin disminuir la actividad del complejo orgánico.
3. Caracterizar el extracto vegetal de bulbos de *Lilium* híbrido L/A “Indian summer”.
4. Determinar en qué compuesto o familia de compuestos se localiza la actividad antifúngica del complejo vegetal.

HIPÓTESIS

El extracto vegetal derivado de los bulbos de *Lilium* sp posee actividad antimicótica debido a la familia de compuestos orgánicos que lo integran.

CAPITULO II

REVISIÓN DE LITERATURA

Generalidades de *Lilium* sp.

El género *Lilium*, reúne a la mayoría de las plantas conocidas como azucenas o lilis. Son herbáceas perennes originarias del hemisferio norte y presentan bulbos compuestos por brácteas escamosas (Buschman, 2004). Este género ha constituido desde hace muchos años, un signo de nobleza, así como la pureza en la religión cristiana. Sin mencionar que es una de las plantas bulbosas más representadas en los cuadros de celebres pintores del renacimiento.

El cultivo de *Lilium* sp tiene distintas formas de flores, colores, tamaños y morfología de bulbos. Casi una docena crecen en Europa, casi dos docenas en Norte América y aproximadamente 50 a 60 especies son de Asia, solo *L. Martagon* L. es distribuido por Asia y Europa. Cerca de 12 especies son utilizadas para hacer algunas hibridaciones de cultivares asiáticos, tales como, *L. amabile* Palib., *L. bulbiferum* L., *L. concolor* Salisb., *L. dauricum* Ker., *L. davidii* Duch., *L. x hollandicum* Berg., *L. x maculatum* Thunb., *L. leichtlinii* Hook. f., *L. pumilum* D. y *L. tigrinum* Ker-Gawl (García, 2002).

Clasificación botánica y taxonomía

El *Lilium* sp. pertenece a la familia Liliaceae, al igual que importantes especies que se comercializan como flores de corte, tales como tulipanes, narcisos y *allium*. Los cultivares más difundidos pertenecen a estos grupos: híbridos de *Lilium longiflorum* Thunb (las azucenas de flores blancas), los híbridos inter-específicos tipo asiático (de tallos erectos flores con formas y colores muy variados), los híbridos tipo oriental (flores grandes, aromáticas y muy coloridas)

y los híbridos L/A, L/O y O/A (producto de hibridación entre *Lilium Longiflorum* x híbridos asiáticos, *Lilium Longiflorum* x híbridos orientales e híbridos orientales x híbridos asiáticos) (Mc Rae,1998). El amplio surtido de variedades, con una extensa gama de colores, la facilidad en la apertura de la flor y su duración en agua, le dan a esta flor un gran poder competitivo.

Taxonomía

Reino: Plantae

Subreino: Embriobyonta

División: Magnoliophyta/Liliopsida

Clase: Liliopsida/Monocotiledonea

Orden: Liliales/Helobiales

Familia: Liliaceae

Género: *Lilium*

Morfología

El bulbo carente de túnica está conformado por hojas modificadas “las escamas”, las cuales protegen a un meristemo apical que da origen a un tallo folioso no ramificado de crecimiento definido. En el extremo caulinar se desarrollan las flores, solitarias o en inflorescencia racimosas (Herrerros, 1983). El bulbo de la mayoría de los *Lilium* es de tipo escamoso, teniendo un plato o placa basal donde se insertan las escamas, que contienen agua y sustancias de reserva. Hay escamas internas y externas; las internas están más apretadas, rodeando al brote nuevo.

En el plato basal, a lado del brote viejo, se forma la yema con el nuevo meristemo; a su alrededor se forma un nuevo grupo de escamas. Las escamas son sensibles a periodos largos de sequía (De Hertogh y Le Nard, 1993). De la placa basal salen las raíces, que tienen una función importante en la evolución

de las hormonas, por lo que se deben conservar incluso cuando se almacenan. La mayoría de los bulbos forman raíces adventicias o de tallo, que salen por encima del bulbo y juegan un papel importante en la absorción de agua y nutrientes por la planta (Herreros, 1983).

El sistema radicular es abundante, tanto en especies orientales como asiáticas. Las raíces principales se localizan bajo la placa basal, también llamadas “basales”, de característica carnosa, con tonalidades marrones; tienen grosores de 2 a 3 mm de diámetro y longitudes de 15 a 20 cm. Las raíces adventicias aparecen en el tallo sobre el bulbo y permiten el desarrollo aéreo al complementar la función de las raíces basales (Bañón, 1993).

Las hojas pueden estar separadas o apiñadas, de dimensiones variables, sésiles o mínimamente pecioladas, el color es generalmente verde intenso. Las flores llamadas también “campanas”, pueden ser erguidas o colgantes y tener forma de estrella, trompeta o turbante, etc. La gama de colores es bastante amplia: blanco, blanco-crema, amarillo, anaranjado, rosa, así como algunas combinaciones de estos en una misma flor (Herreros, 1983).

El fruto es una capsula trilocular con dehiscencia loculicida independiente y esta provista de numerosas semillas, generalmente alrededor de 200; la semilla es generalmente aplanada y alada.

Fenología

Las etapas típicas del ciclo de crecimiento para la producción de flores de corte de la especie *Lilium* L/A, propuestas por Correa (2003) comprende cuatro fases que son: 1) elongación del tallo, 2) iniciación floral, 3) desarrollo de la flor y 4) senescencia. No obstante, en el ciclo natural del cultivo, se produce una primera etapa correspondiente al receso invernal del bulbo que es necesaria romper para inducir las cuatro fases anteriores.

En la figura 1 se ilustra el número de semanas después de la plantación de los bulbos necesarios para iniciar las respectivas etapas de desarrollo en los híbridos L/A (Longiflorum/Asiáticos). El perfil fenológico que se muestra puede presentar una variación de días de acuerdo a las diversas variedades o cultivares que se utilicen como especie asiática en el híbrido.

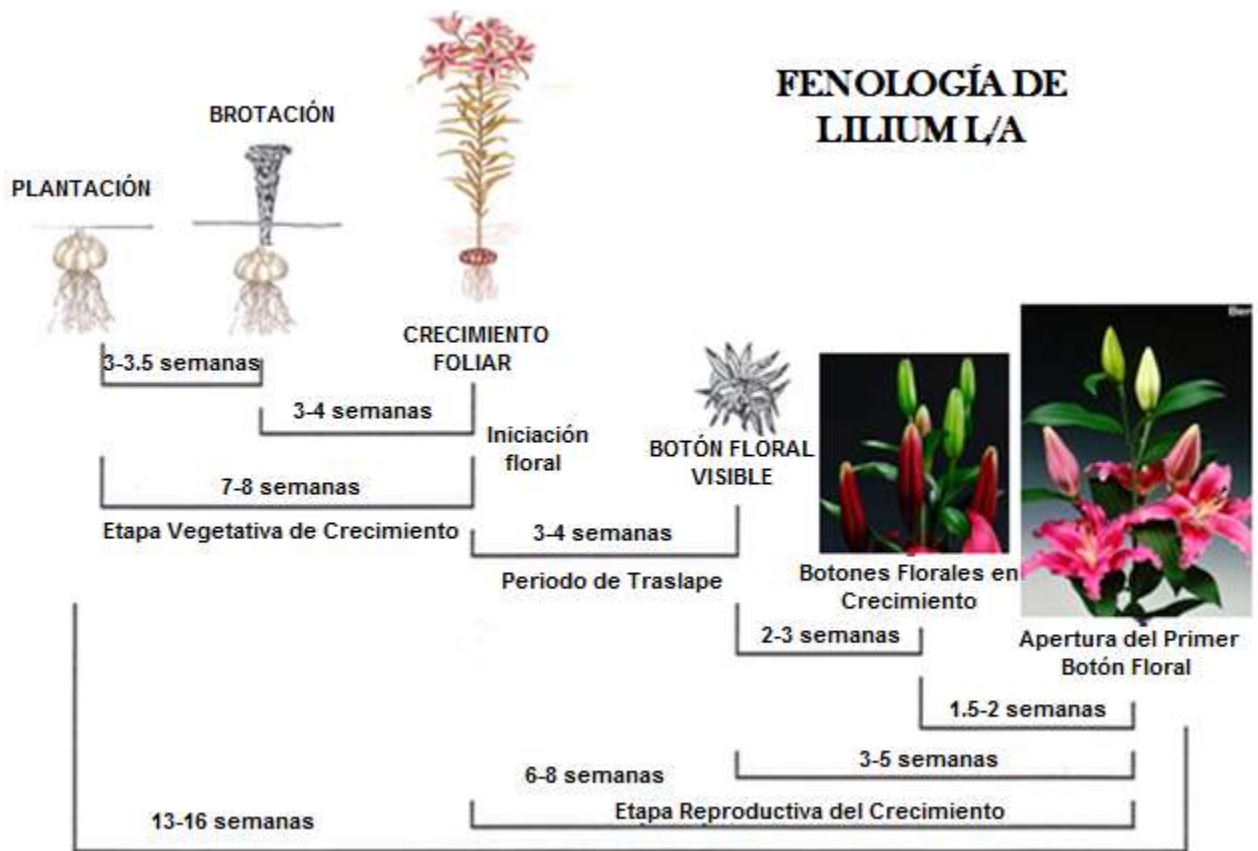


Figura 1 Fenología típica de especies ornamentales *Lilium* híbrido Longiflorum/Asiático (L/A)

Multiplicación de *Lilium* sp.

El *Lilium* se puede multiplicar por semillas, sistema de importancia vital para la obtención de nuevas variedades, utilizando bulbos, bulbillos de las hojas, bulbillos del tallo, escamas del bulbo y por tejidos o meristemos (Herreros, 1983).

Durante la cosecha de *Lilium* sp. la mayoría de los bulbos se encuentran acompañados de pequeños bulbillos cuyo número es muy variable. Si los bulbillos no son removidos, permanecerán adheridos al bulbo madre durante varios años. No obstante si son colocados en camas en viveros, poseen la misma capacidad de crecimiento y desarrollo hasta lograr un calibre floral adecuado de producción (Reinoso, 2005). Cabe mencionar que para adaptar y generar tecnología de producción eficiente de bulbos de *Lilium* sp. en México, es necesario ajustar la tecnología de producción a campo de acuerdo a las exigencias de los híbridos seleccionados, las técnicas empleadas en otros países, las condiciones agroecológicas, tecnológicas y económicas locales.

Multiplicación por semilla

Representa varias dificultades, en especial en la germinación. Hay especies que se prestan más que otras para este proceso. Aunque la flor puede autofecundarse, es mejor efectuar una polinización cruzada. La germinación de la semilla se produce de diferentes maneras según la especie de *Lilium* sp. de que se trate. La temperatura optima es de 20 °C y el tiempo de duración es muy variable entre una especie y otra. Con la multiplicación por semilla se obtienen bulbos comerciales que pueden dar una floración a partir de los dos años (Herreros, 1983).

Multiplicación por escamas

Esta técnica es utilizada desde hace más de dos siglos en Japón y recientemente en Holanda y Alemania. Después de haber dado la flor, se espera a que amarilleen las hojas o se seque el tallo. Posteriormente se extraen los bulbos de la tierra y se someten a una depuración, de la cual, las mejores escamas son seleccionadas para la multiplicación. Comúnmente las escamas externas del bulbo suelen ser las más apropiadas (Herreros, 1983).

Factores de producción

pH

Es importante mantener el pH en un nivel ligeramente ácido para garantizar el desarrollo de las raíces y asegurar una correcta absorción de los elementos nutritivos. Así por ejemplo, un pH demasiado bajo causa exceso de: manganeso, hierro y aluminio entre otros mientras que un pH alto causa insuficiencia del fósforo, hierro y manganeso. Se recomienda mantener un pH de 6-7 para los híbridos asiáticos y 5.5 – 6.5 para los orientales.

Salinidad

El *Lilium* pertenece a los cultivos sensibles a la sal, por ello altos contenidos salinos frenan la absorción de agua de las raíces y por consiguiente el crecimiento y el tamaño del cultivo en general. El contenido de sal del suelo depende de tres factores:

El contenido de sal del abono orgánico

El contenido de sal del agua de riego

El contenido en sal del nivel nutritivo del suelo el cual no debe superar el 1.5 mg/cm³, el contenido en cloro no puede superar 53.25 mg/L

El contenido de sal del agua de riego contribuye al contenido total de sal en el suelo y por lo tanto deberá ser bajo: 0.5 mS/cm o más bajo (C.I.B.F., s/año). La conductividad eléctrica no puede superar 1.5 mg/cm³ y el cloro no puede superar 1.5 mmol/L en caso de que hubiera un exceso de este, se recurre a lavados de suelos.

Luz

La falta de luz puede provocar dos anomalías en la flor de *Lilium sp.*:

Aborto de las flores. Decoloración en la base del botón floral que al final se necrosa o no, pero cesa su desarrollo.

Abscisión. Blanqueamiento del botón floral, seguido de un estrechamiento del pedúnculo que lo sustenta y posterior caída del mismo.

Un exceso de luz hace palidecer los colores y da lugar a tallos demasiado cortos en cultivares de poco crecimiento.

Existen grandes diferencias entre las necesidades de luz de unos y otros cultivares, siendo más exigentes los pertenecientes al grupo *speciosum* y seguidos por los del *longiflorum* y menos los de otros grupos. Entre los híbridos asiáticos suelen ser más exigentes los de ciclo de cultivo más largo. El momento crítico de falta de luz es cuando comienzan a formarse los botones florales. Una escasa iluminación en esa época (fin de otoño, inicio de invierno), puede originar en algunos cultivares la pérdida de floración.

Humedad

El nivel correcto de humedad relativa (HR) para *Lilium sp.* es de 70 a 85 %. Es importante evitar oscilaciones para evitar quemaduras de las hojas en cultivares

sensibles. La ventilación es fundamental para reducir la alta humedad relativa y para el control de la humedad. Se debe evitar que la humedad relativa baje demasiado rápido para evitar daños en las hojas y ocasionar pérdidas de calidad. La humedad relativa alta favorece la presencia de enfermedades.

Cuando la humedad es demasiado elevada, no se debe ventilar el invernadero bruscamente, ya que, se corre el riesgo de un desecamiento rápido, sobre los órganos de las plantas. Esto puede llevar a un empardecimiento de las hojas de las plantas y a ligeras quemaduras de sus limbos.

Temperatura

Para obtener un producto floral de calidad es necesario conseguir una buena formación de raíces. Esto se consigue con temperaturas ambientales de 12 a 13 °C durante el primer mes posterior a la plantación, mantener o exponer a temperaturas más bajas alarga innecesariamente el periodo de crecimiento.

Durante el desarrollo del cultivo, en el caso de los híbridos asiáticos deben mantenerse temperaturas promedio de 14 a 15 °C, para obtener la mejor calidad se requiere que la temperatura oscile entre los 20 a 25 °C durante el día y de 8 a 10 °C durante la noche. Considerando que a temperaturas nocturnas superiores de 15 a 20 °C se reduce la calidad de las flores, si las temperaturas nocturnas son superiores a 20 °C, se afecta la calidad de la vara y temperaturas muy bajas prolongan el cultivo.

Para los híbridos orientales, el manejo de temperaturas es más delicado, debiéndose lograr una temperatura constante de 15 a 17 °C, temperaturas por debajo de los 15 °C pueden causar amarillamiento o caída de las hojas.

Para *Lilium longiflorum* la temperatura óptima esta entre de 14 a 16 °C, pudiendo alcanzar durante el día los 20 a 22 °C, si la temperatura disminuye de 14 °C se observan grietas en los pétalos.

Nutrición

La producción de plantas del genero *Lilium* sp. es importante dentro de la industria de las flores de corte; sin embargo, se reportan pocos trabajos con recomendaciones de fertilización, e inclusive en algunos de ellos se han obtenido resultados contradictorios (Ortega-Blu, 2006).

Debido a la amplia variedad de los cultivares comerciales de *Lilium* sp., las recomendaciones de fertilización deben de realizarse de forma específica, tomando en cuenta el cultivar y su estado fenológico, ya que se ha mencionado que las plantas que se propagan por bulbo poseen poco requerimientos nutrimentales; sin embargo Ohyama *et al.*, (1988) indicaron que el nitrógeno presente en bulbos de tulipán (*Tulipa gesneriana* L.) no es suficiente para cubrir el periodo de crecimiento y asegurar una buena producción floral.

Específicamente para *Lilium* x “Navona”, se recomienda la aplicación de N-P-K durante la elongación del tallo, mientras que para “Fangio” y “Miami” la fertilización debe realizarse durante la iniciación floral (Ortega-Blu, 2006).

La aplicación de nutrientes es una de las líneas de investigación que han atraído recientemente la atención para el desarrollo óptimo de la planta, mejorar la calidad de corte y la vida en florero de diferentes especies ornamentales incluyendo el *Lilium* (Ortega-Blu, 2006; Franco, 2007; Ayala, 2008).

El Calcio ha demostrado ser un auxiliar en el aumento de la vida post-cosecha de productos horto-frutícolas. Su acción benéfica se relaciona con un

incremento en la pared celular, vía su entrecruzamiento con las pectinas, mejorando con ello, la resistencia al maceramiento (Conway, 1988).

Simmonds y Cumming (1976) explican que el tratamiento que mayor atención ha recibido por parte de los investigadores de esta especie, ha sido el hormonal. Los reguladores de crecimiento más utilizados han sido el ácido naftalenacético (ANA), ácido indolbutírico (IBA), ácido indolacético (AIA), ácido succínico, cinetina. Algunos tratamientos cuando se aplican a escamas procedentes de bulbos madre conservados en frío provocan la formación de bulbillos muy débiles ya que parece ser que ello determina menores exigencias en auxinas exógenas, sustancia que ha favorecido la formación de bulbillos, dependiendo del cultivar.

Sustratos

Bañón *et al.* (1993) mencionan que una vez separadas las escamas del bulbo madre se establecen en un sustrato formado por una proporción en volumen del cincuenta por ciento de vermiculita y otro cincuenta por ciento de perlita, en una relación del sesenta por ciento de escamas y un cuarenta por ciento de sustrato.

El medio de cultivo debe de tener una buena estructura y una permeabilidad adecuada, por lo que debe ser suelo ligero, permeable, profundo (25-40 cm) y desinfectado. Un sustrato areno arcilloso y complementado con materia orgánica, asegura una buena retención de agua. Para reunir estas características es necesario elaborar el sustrato con dos partes de arena una parte de arcilla y una parte de composta.

Mezclas de suelo franco, arena, peat moss, perlita, vermiculita, corteza y otros materiales se pueden usar como sustrato para los bulbos, mezclados en varias

cantidades por volumen. La mezcla estándar por volumen 1:1:1 de suelo, arena y peat moss puede ser usada para todos los cultivos de bulbos.

Importancia económica de *Lilium* sp.

Dentro de la floricultura comercial, las plantas bulbosas ocupan un lugar de gran valor en países en que esta rama de la horticultura se encuentra plenamente desarrollada. La producción mundial de bulbos florales ocupa una superficie total de más de 31,000 ha y Holanda representa el 65 % de la producción mundial con 10,000 millones de bulbos aproximadamente, entre los cuales se incluyen bulbos de tulipán, *Lilium*, Jacinto y narciso (Facchinetti, 2008).

A escala mundial la especie de flor bulbosa más cultivada y comercializada es el tulipán seguida del *Lilium*, narcisos, jacintos e iris. La producción de flores de *Lilium* a nivel mundial ha aumentado por un fuerte incremento en la demanda. Su cultivo puede orientarse a la producción de bulbos o la producción de flores de corte o de planta en maceta. El principal destino de los bulbos importados es la producción de flor cortada. En efecto la velocidad de expansión está condicionada por el precio de los bulbos importados que se puede considerar alto debido principalmente al tipo de cambio vigente (Facchinetti, 2008).

Situación mundial de *Lilium* sp.

El mercado mundial de flores de corte, luego de la caída experimentada en el año 2009 producto de la crisis mundial, muestra signos de recuperación en el año 2010, al crecer sus exportaciones en 3.7 % (Traub, 2012). El comercio internacional de flores llega a unos 35,000 millones de dólares anuales, siendo uno de los rubros más dinámicos dentro de la economía mundial con una tasa anual de crecimiento cercano al 6 %, apoyándose en los avances tecnológicos en comunicaciones y transportes se estima que el consumo de flores continuara

creciendo debido al aumento de la población mundial y a la concentración de esta en núcleos urbanos (Facchinetti, 2008).

El alto porcentaje en la reactivación se explicaría por la recuperación de los principales países importadores. Los diez países más importantes que representan casi el ochenta por ciento del volumen mundial, aumentaron sus importaciones físicas en un promedio de 16.3 %, destacando la recuperación de Holanda, Bélgica, EE.UU y Japón que crecieron un 56.1 %, 36.1 %, 21.4 %, y 14.6 % respectivamente. Alemania, el principal país importador que concentra 16 % de este mercado, creció en solo 3.3 %. (Traub, 2012).

Situación nacional de *Lilium* sp.

La producción de bulbos florales está limitada a pocos países por causas agroecológicas. Teniendo en cuenta los variados requerimientos de los diferentes híbridos y la plasticidad de *Lilium*, su producción es posible en distintas condiciones agroclimáticas. En este punto hay que destacar las ventajas que presenta México con la gran variedad de ambientes y condiciones edafoclimáticas que, junto con la infraestructura existente propiciarían la producción comercial de bulbos de *Lilium* sp. (Facchinetti, 2008).

Por otra parte las posibilidades de México como productor florícola recaen en la cercanía al mercado norteamericano y la firma de tratados de libre comercio como el TLCAN (Tratado de libre comercio de América del norte) en 1994 con América del Norte y en julio del 2000 con la Unión Europea. Actualmente las exportaciones de flores y plantas de *Lilium* han quedado consolidadas.

Los principales estados productores de México son: Puebla, Estado de México y Morelos; aportando respectivamente 48, 22 y 12 % de la producción total de *Lilium* sp. para flor de corte (CESAVEM 2011).

Manejo post-cosecha

Colecta de bulbos de *Lilium* sp.

Los bulbos para comercialización generalmente se cosechan a finales de agosto a octubre en el hemisferio norte. Las temperaturas cálidas estimulan la formación de raíces basales lo que beneficia durante la extracción de bulbos para su trasplante a medida que maduran en el otoño, en este periodo, la parte aérea puede o no haber muerto. Sin embargo, los bulbos se deben manejar con cuidado para impedir lesiones y evitar desecación. El valor comercial de los bulbos depende de su calibre (circunferencia) y su peso en la época que se les extrae del suelo, así como de las condiciones de las raíces y la ausencia de enfermedades en el bulbo (Hartmann y Kester, 1988; Rees, 1992; De Hertogh y Le Nard, 1993). Posteriormente se enfrían en un intervalo de 2 a 5 °C por 6 o 10 semanas, dependiendo de la variedad que se maneje, antes de ser forzados en invernadero. Los efectos de las temperaturas bajas y su duración se han estudiado ampliamente en el *Lilium* “Pascua”, pero no en los *Lilium* asiáticos y orientales (De Hertogh y Le Nard, 1993).

Por otra parte la cosecha de bulbos al culminar el ciclo de floración no posee el mismo seguimiento por parte de los productores de flor de corte, debido a que el bulbo es considerado un desecho del cultivo por no tener la capacidad de obtener una flor de calidad después del primer ciclo de cosecha (Auzaque, 2011) y son extraídos y apilados en cualquier área de forma indistinta esperando su deshidratación o en algunos casos como consecuencia de las condiciones ambientales, la pudrición del tejido vascular, lo que posteriormente se convierte en un vector de enfermedades para la misma zona de producción.

Almacenamiento de bulbos *Lilium* sp.

Generalizando, se dice que *Lilium* se almacenan por 6 a 9 semanas de 1 a 2 °C y posteriormente son forzados en invernadero. Cuando el periodo de vernalización es menor se tiene una disminución del número de botones florales por tallo y si además se superan los niveles térmicos fijados, se produce un acortamiento de la longitud del tallo, disminución de botones florales por tallo, alargamiento del ciclo de cultivo, etc. Sin embargo, si se requiere almacenar por más tiempo, la temperatura puede disminuirse de -1 °C a -2 °C, dependiendo de la variedad y la época del año.

Los bulbos de híbridos asiáticos se pueden almacenar hasta un año sin mayores problemas, a diferencia de los orientales, que resisten menos tiempo y podrían presentar daño en caso de un tiempo prolongado de almacenamiento. Esto permite tener una disponibilidad de bulbos durante todo el año (Mc Rae, 1998).

De Hertogh y Le Nard (1993) reportan que cuando el tiempo de almacenamiento se incrementa, los días de floración disminuyen. Los bulbos de *L. longiflorum* “Croft” almacenados a 2 °C por 4, 8, y 12 semanas florecen en 136, 116 y 106 días, respectivamente. Aunque el almacenamiento en frío reduce el número de yemas florales y en este reporte se dice que la reducción del número de yemas aumentó de acuerdo al tiempo de almacenamiento.

Plagas y enfermedades de *Lilium* sp.

El género *Lilium* sp. es atacado por una amplia diversidad de patógenos como lo son: bacterias, hongos, virus entre otros organismos superiores provocando un sin número de enfermedades que a continuación se describen:

Bañon *et al.* (1993) destacan el ataque bacteriológico de *Erwinia carotovora* que provoca manchas translucidas en las escamas y posterior pudrición del bulbo que termina en la marchitez generalizada y muerte.

La podredumbre del pie puede estar asociada a *Phytophthora parasítica* o *Phytophthora nicotianae*. Los daños provocados se observan a nivel de cuello, causando un decaimiento repentino por la obstrucción de los haces vasculares.

Los daños por virus se caracterizan por producir distorsiones, manchas jaspeadas a nivel foliar y crecimiento enanizante. Existen variedades de *Lilium* sp. sensibles, resistentes e inmunes. Las resistentes pueden actuar como portadoras y contaminar otras variedades sensibles. El LSV (Lily Simptomless Virus) es particularmente importante por provocar manchas cloróticas en las hojas, alargadas paralelamente a las quemaduras y posteriormente se vuelven necróticas.

Los pulgones son una plaga que causan daños directos y son agentes vectores de algunas virosis. Los ataques se localizan en la parte apical de la planta, en la brotación más tierna y junto al hampa floral. Los daños producidos son ocasionados principalmente al alimentarse los adultos succionando jugos nutritivos de la planta se localizan tanto en las hojas inferiores como en botones florales. Ataques importantes pueden provocar deformaciones foliares y en los botones florales.

El acaro del bulbo (*Rhizoglyphus echinopus-fum*), es un pequeño acaro de 0.65 mm de largo y de color blanco amarillento, que desarrolla su actividad parasitaria en el interior del bulbo e incluso puede afectar a las raíces. Provoca una serie de heridas por las que pueden penetrar posteriores enfermedades criptogámicas que aceleran la pudrición del bulbo y pérdida de la planta. Las hojas de las plantas atacadas, amarillean para luego secarse por partes.

Hongos patógenos de menor incidencia en *Lilium* sp.

Los hongos tienen hábitats muy diversos; sin embargo la mayoría son terrestres y habitan en el suelo, desempeñan una actividad importante en la mineralización del carbono orgánico. Cuando se compara a los hongos con las bacterias, en general estos tienen requerimientos nutricionales muy simples, pero su desarrollo es más lento, por lo que requieren mayor tiempo de incubación para su cultivo.

En el aislamiento cultivo y cuenta de la mayoría de los hongos se aprovechan ciertas características especiales de ellos, como su tolerancia a pH ácido y su preferencia por medios de cultivo con gran cantidad de azúcar fácilmente degradable. Además su resistencia a la penicilina y estreptomicina permite usar estos antibióticos, los que al ser agregados al medio de cultivo disminuye la incidencia de bacterias contaminantes.

Los hongos fitopatógenos son los que han recibido mayor atención por la gran variedad de especies y amplio rango de hospedantes así como por su crecimiento microscópico sobre la superficie de su huésped (Cañedo y Ames, 2004.)

Botrytis P. Micheli ex Pers es un hongo de estructura anamórfica de coloración grisácea cuyo anamórfo es *Botryotinia whetzel* el cual es un género cosmopolita de actividad patógena conocido por causar atizonamiento en varios hospedantes cultivados en diversas regiones de México. Las plantas de *Lilium* enfermas manifiestan síntomas necróticos representados por grandes manchas en las hojas descendiendo por el tallo y también en los botones y las flores. En condiciones de humedad elevada se observa sobre las lesiones la presencia de un moho gris oscuro (Cabrera, 2005).

Pythium ultimum produce una lesión al cuello que afecta el sistema radicular adventicio. Las raíces se vuelven café claro y de textura vidriosa, derivando de una putrefacción general que termina con el corte del tallo, dando muerte a la planta.

Cylindrocarpon destructans y *Cylindrocarpon radicicola* producen pudrición de escamas y en el interior del bulbo.

Hongos patógenos de mayor incidencia en *Lilium sp.*

Los hongos imperfectos. Principalmente hongos que no se ha observado un ciclo sexual. Comprende una gran cantidad de especies de hongos (unas 15,000) en las que la reproducción se realiza solamente por mecanismos asexuales o para sexuales. Debido a que los Deuteromycetes aparentemente carecen de una fase de reproducción sexual, también llamada “perfecta”, por lo general son denominados hongos imperfectos o técnicamente fungi imperfecti. La subdivisión deuteromycotina se encuentra dividida en tres clases, Blastomycetes, Hyphomycetes y Coelomycetes.

La mayoría de los Deuteromycetes es terrestre aunque hay muchos acuáticos tanto marinos como dulceacuícolas. La mayor parte de ellos son saprofitos o parásitos débiles de plantas. Pocos son parásitos de otros hongos y algunos son destructores de nematodos. Para el hombre son de gran trascendencia las actividades químicas de estos hongos por su participación en la producción industrial de diversas sustancias incluyendo los antibióticos (Alexopoulos, 1996; Herrera, 1998).

Los organismos pertenecientes al grupo deuteromycotina típicamente forman un micelio bien desarrollado, septado y ramificado, con los compartimentos o células generalmente multinucleadas. Los septos de las hifas en la mayoría de las especies son del tipo encontrado en los ascomicetes, con un poro central

que permite el paso de núcleos y organelos citoplasmáticos de un compartimiento a otro.

Los hongos de este grupo son *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Botrytis* sp., *Chrysonilia* sp., *Cladosporium* sp., *Curvularia* sp., *Fusarium oxysporum*, *Penicillium* sp., *Scopulariopsis* sp., *Scytalidium dimidiatum*, *Trichoderma* sp., *Ulocladium* sp.

Aspergillus niger

Aspergillus niger es un hongo que presenta colonias con pliegues, de micelio blanco que cambia a amarillo suave. La producción de conidios se observa por la presencia en la superficie del micelio de puntos negros similares a la pimienta, que pueden volverse tan densas con el tiempo. El reverso de la colonia queda de color gamuza o crema.

Microscópicamente las hifas son tabicadas con conidióforos largos y lisos. Vesículas esféricas, da origen a grandes métuladas y fiálides más pequeñas desde las cuales se producen conidias negras que oscurecen la superficie de la vesícula. Presentan vesículas globosas de 50-100 μm de diámetro métula de 6.5-10 x 3-5 μm , fiálides que van directamente sobre la vesícula o sobre la medula de 7.0-9.5 x 3-4 μm y conidias globosas o subglobosas de 3.5-5 μm de diámetro (Koneman, 1996).

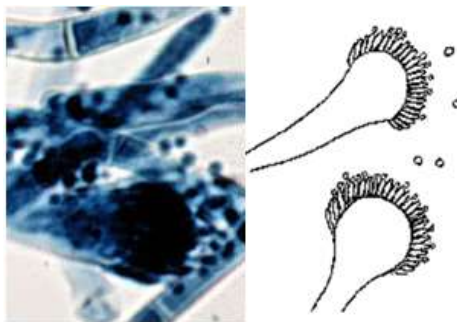


Figura 2 Morfología microscópica de *Aspergillus niger*

Diversos cultivos básicos poseen una microbiota particular de bacterias, insectos y hongos que pueden causarles daño. Entre ellos el género fúngico *Aspergillus* y, de este las especies *A. flavus*, *A. niger* y *A. parasiticus* son las más importantes, debido a la producción de aflatoxinas que provocan gran variedad tóxicos en seres vivos expuestos al grano contaminado. Actualmente, las regulaciones mexicanas establecen límites permisibles solo para aflatoxinas en cereales y sus productos, excluyendo otras micotoxinas (Martínez *et al.*, 2013).

Fusarium oxysporum

Fusarium oxysporum es un hongo que se presenta como saprofita en el suelo o también como patógeno especializado, denominado forma especial (f. sp.), según la planta hospedante u hospedantes relacionadas que afecte. Es posible distinguir patotipos o razas fisiológicas de una misma forma, cuando se determina la variedad de la especie vegetal que ataca y aún en poblaciones clónales al analizar características moleculares. No obstante con referencia a la especificidad como fitopatógenos, pruebas de patogenicidad realizadas en condiciones de invernadero con el hongo causante del marchitamiento vascular en tomate (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*) causó infecciones en plantas de clavel y rábano en un 20 % y 47 %, respectivamente.

En 1993 Gardini y colaboradores utilizando la cepa *Fusarium oxysporum* f. sp. *erythroxyli* causó el 100 % de la marchitez vascular en plantas de coca y el 25 % y 12.5 % en achote y tomate. (Garcés de Granada, 2001).

Fusarium oxysporum f. sp. *Lilii* y f. sp. *narcisii* es el agente causal de la pudrición basal en bulbos. Los síntomas del ataque son podredumbre parda oscura, que comienza en el disco basal para extenderse por toda la planta. La parte externa presenta marchitez afectando incluso el botón floral, los cuales no serán viables o tendrán antesis antes de su fecha de floración.

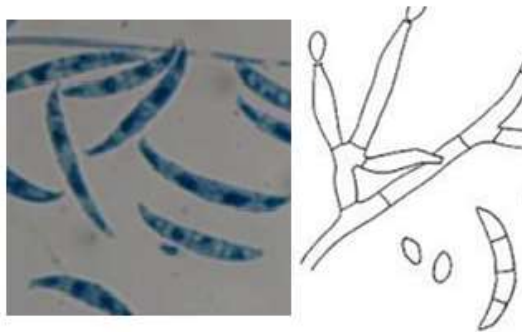


Figura 3 Morfología microscópica de *Fusarium oxysporum*

Penicillium janthinellum

El género *Penicillium* del latín *penicillius* (pincelito), fue publicado por primera vez en la obra “Observationes in ordines plantarum naturales” en 1809. El mismo hace referencia a la morfología de la estructura conidiógena característica del género, que se asemeja a un pequeño pincel.



Figura 4 Morfología microscópica de *Penicillium janthinellum*.

El género *Penicillium* es saprofita, ubicuo y oportunista. Con exigencia nutricional baja; es capaz de desarrollarse casi en cualquier entorno (Pitt y Hocking, 2009). El daño a *Lilium* es provocado principalmente en almacenamiento de bulbos debido a la producción de enzimas extracelulares como celulasas y hemicelulasas, referido como moho azul, pudrición blanda o pudrición de almacén (Ellis, 2013). Al mismo tiempo de la pudrición, también se producen metabolitos secundarios tóxicos conocidos como micotoxinas que

pueden tener efecto neurotóxico o nefrotóxico como la penitrem A, citrinina o carcinógeno como el ácido penicílico (Overy, 2005).

Durante el desarrollo de *Lilium*, *Penicillium* provoca infecciones a través de heridas y sitios de ruptura; se encuentra presente en un 90 % de material vegetal aparentemente sano. Dentro de los daños que se conocen, está la pudrición de bulbos de flor o de vegetales (Overy, 2005; Hernández-Anguiano, 2006). La interacción de *Penicillium*-hombre, ha originado diversos efectos, algunos benéficos como la producción de antibióticos o perjudiciales como el daño en cultivos y post-cosechas.

Entre otros auxiliares en la identificación de especies del género *Penicillium*, se encuentra el comportamiento cultural y micromorfológico, lo cual ha sido el criterio más recurrente desde 1973 que se establecieron condiciones estandarizadas como criterio taxonómico (Pitt y Hocking *et al.*, 2009); también se cuenta con la secuencia molecular, la cual se ha convertido en un método de rutina para la identificación de levaduras y hongos filamentosos (*Aspergillus sp*, *Fusarium sp* y *Penicillium sp*), esto a cargo de la secuenciación de la región ITS del ADN ribosomal y con los genes constitutivos como la calmodulina, β -tubulina y el factor de elongación 1- α (Samson *et al.*, 2004; Pitt y Hocking *et al.*, 2009).

Rhizoctonia solani

Este hongo produce su daño a nivel de sustrato, su presencia en *Lilium* y en varias especies bulbosas se distingue porque el brote apical presenta retraso en la emergencia y las primeras hojas están podridas, las cuales caerán dejando cicatrices en el tallo. En el caso de una infección ligera los daños se limitarán a las hojas más próximas al suelo y a las hojas verdes de la parte inferior de los rebrotes. En estos casos las hojas presentarán unas manchas de un ligero color marrón, dando lugar a una especie de corrosión en las hojas sin demasiada

importancia. Por lo que en casos de infección ligera las plantas pueden llegar a florecer aunque bastante retrasadas y con una calidad mediocre.

En caso de que la infección sea más grave la brotación se hace con dificultad y se suelen dañar la mayoría de las hojas. El aspecto de *Lilium* es similar a un raquitismo como consecuencia de un desarrollo muy pobre de las raíces, del tallo y dando lugar todo ello a una floración de mala calidad en la que muchas ocasiones los botones florales llegan desecarse antes de abrir.

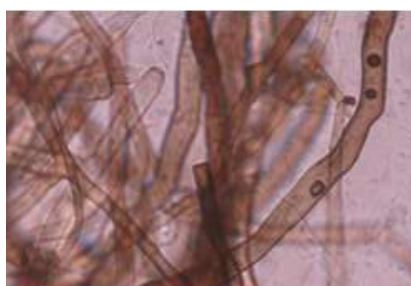


Figura 5 Morfología microscópica de *Rhizoctonia solani*

Proceso de infección de hongos en *Lilium* sp.

Ciertos hongos poseen características muy especiales que les permiten sobrevivir en forma parasítica sobre los insectos y plantas y en forma saprofita material vegetal en descomposición (Cañedo y Ames, 2004).

En las enfermedades producidas por hongos (micosis) (Tanada y Kaya, 1993) se pueden identificar tres fases durante esta.

1. Adhesión y germinación de la espora en la cutícula de la planta o semilla (hospedero):

El proceso de adhesión, dependiendo del hongo, puede ser un fenómeno específico o no específico. Mientras que la germinación de las esporas es un proceso mediante el cual una espora emite

uno o varios pequeños tubos germinativos que al crecer o alargarse da origen a las hifas, este proceso depende de las condiciones de humedad y temperatura ambiental. En menor grado la luz condiciona el ambiente alimenticio. Las esporas que germinan en la superficie del huésped forman un tubo germinativo el cual funciona como una hifa de penetración de la cutícula. También puede producir una estructura llamada apresorio, la cual ayuda a la adhesión de la espora. El éxito de la germinación y la penetración no depende necesariamente del porcentaje de germinación sino del tiempo de duración de la germinación, modo de germinación, agresividad del hongo, tipo de espora y susceptibilidad del hospedante (Samson, 1988).

2. Penetración dentro del tejido:

Esta penetración por parte de la hifa es el resultado de la degradación enzimática de la cutícula y la presión mecánica ejercida por el tubo germinativo. Además depende de la cutícula, grosor, esclerotización, presencia de sustancias nutricionales y estado de desarrollo del huésped. La digestión de las capas externas de los tejidos se produce mediante las enzimas (proteasas, aminopeptidasas, lipasas, estereasas y quitinasas). Cuando la hifa ha llegado a los tejidos se pueden producir diferentes reacciones de defensa del huésped hacia un cuerpo extraño como la fagocitosis, encapsulación celular y la formación de compuestos antimicrobianos como las lisozimas, aglutininas y melanización. En este caso el hongo debe vencer el sistema inmunológico del hospedante antes de entrar a la hemolinfa y desarrollarse dentro del huésped.

3. Desarrollo del hongo y posible muerte de hospedante:

Luego de que llega al tejido, el hongo puede evitar la defensa inmune del hospedante produciendo células parecidas a levaduras llamadas blastosporas, que se multiplican y dispersan rápidamente, desarrollan protoplastos, elementos discretos ameboides, sin pared celular que no son reconocidos por los hemocitos del hospedante y produciendo micotoxinas. La dispersión de estos en el hemocoele depende de la especie del hongo.

Las toxinas producidas juegan un papel muy importantes, la muerte del hospedante es más rápida debido a cantidades considerables de toxinas, ya que se adiciona la toxemia a la destrucción de los tejidos y a las deficiencias nutricionales.

Control y manejo de hongos patógenos de *Lilium* sp.

La implementación de programas de control de enfermedades provocadas por hongos fitopatógenos en sistemas intensivos de producción, es la solución que ha llevado a los agricultores, a intentar erradicar la población de agentes perjudiciales, logrando apenas reducir las altas tasas de crecimiento de patógenos, Sin considerar las consecuencias en el medio ambiente. En temas siguientes se describirán técnicas que han sido de apoyo en la agricultura tanto en México como en países subdesarrollados

Control cultural de patógenos

En general los hongos producen decaimiento en los bulbos de *Lilium* en almacén y aunque algunos son considerados como patógenos débiles, el programa de manejo integrado recomienda evitar daño mecánico y eliminación del material enfermo (Dreistadt, 2001). Otra alternativa es la rotación de

cultivos, alternando con aquellos que no son afectados por estos fitopatógenos, por lo que se recomienda seguir el manejo que se da con *Fusarium oxysporum* (Riaz, 2009); sin embargo se corre el riesgo de remplazar la producción de flor de *Lilium*, limitando la disponibilidad de terrenos para su producción. Otro punto a considerar es el almacenamiento que debe ser adecuado; la temperatura para el bulbo en almacén se ajusta de acuerdo a la fecha de siembra programada; 2-5 °C con la humedad relativa de 70-80 % si se requiere un periodo largo de almacenamiento; sin embargo se reporta que bajo estas condiciones el ataque por *Penicillium* aumenta (Chauhan y Saaltink, 1969). Para periodos cortos de almacén, la temperatura ambiente es adecuada.

Control químico de patógenos

Un funguicida sintético comúnmente utilizado es el “Procloraz”, que actúa inhibiendo la síntesis del ergosterol en ascomicetos, basidiomicetos y deuteromicetes. Lado *et al.* (2011) menciona que en ambientes donde se han aplicado continuamente, se ha observado poblaciones de patógenos resistentes a las dosis comerciales. Sin embargo no es el único agente químico de amplio espectro comercial, el imazalil, tiabendazol, benomilo y carbendazim son opciones en la prevención, tratamiento y control de micosis.

El benomilo y el tiabendazol son protectantes y curativos eficaces; mientras que el imazalil y Procloraz inhibe la esporulación, en cualquier caso se recomienda el cuidado de las aplicaciones constantes pues las poblaciones patógenos tienden a crear resistencia a las dosis comerciales (Ram, 2004; Hao, 2010; Lado, 2011).

Hao *et al.* (2010) reportaron que el control de la pudrición ocasionada por *Penicillium* se puede mejorar si el fungicida “Procloraz” se combina con derivados naturales y que estos compuestos fueron más efectivos que el Procloraz solo. De los derivados naturales que mejor se conocen por sus

efectos fungicidas y fungistáticos in vitro e in vivo, están los obtenidos de hoja de guayaba (*Psidium guajava* L.) y epazote (*Chenopodium ambrosioides* L.) (Kumar, 2007; Bakkali, 2008; Dhiman, 2011) y que previamente ya han sido utilizados en el control de *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli* que también ocasiona pudrición en el cormo de gladiolo. (Garduño-Pizaña, 2010).

Control biológico de patógenos

En los últimos años el uso de productos químicos para el control de enfermedades en plantas se ha intensificado, incrementando los costos de producción. Para reducir el uso de estos productos, la agricultura debe establecer nuevas alternativas. Una de ellas es el uso de extractos vegetales, que ha capturado el interés de productores e investigadores, presentando resultados satisfactorios, tanto en laboratorio como en campo, con el fin de determinar especies de plantas, que podrían utilizarse efectivamente para el control de los diferentes hongos fitopatógenos en los cultivos de *Lilium* entre otros.

Rosca-Casian *et al.* (2007) Comprobó la actividad antifúngica in vitro del extracto hidroalcohólico de las hojas de sábila (*Aloe vera*), al inhibir el crecimiento micelial de hongos aislados de plantas ornamentales del genero *Iridaceae*; los hongos aislados fueron: *Botrytis gladiolorum*, *Fusarium Oxysporum*, *Heterosporium pruneti* y *Penicillium gladioli*; tres de los cuales se conocen por daños a plantas ornamentales y en conjunto en cultivos básicos. Por otro lado Gómez *et al.* (2007) mencionaron la eficacia de extractos del árbol *Fagara monophylla*, el cual gracias a sus componentes alcaloides y propiedades antibióticas mostraron actividad sobre *Aspergillus terreus*, *A. flavus*, *Penicillium digitatum*, *P. funicolosum*, *P. citrinum*, *Paecilomyces* y *Candida albicans*. Parvu *et al.* (2011) mostraron la actividad del extracto de ajo (*Allium senescens*) contra *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea*, *B. paeoniae*, *Fusarium oxysporum* f sp *tulipae* y *Penicillium gladioli*.

El uso de extractos vegetales es más factible en cultivos intensivos donde el principal problema es ocasionado por hongos del suelo como *Rhizoctonia* sp., *Fusarium* sp., *Sclerotium* sp. y *Penicillium* sp. causando la enfermedad conocida como “Damping off”. Se conoce con este nombre a la incapacidad de las semillas de germinar en el terreno y también a la muerte de plántulas en post-emergencia debido a la acción patógena de muchos microorganismos (Fernández Valiela, 1978).

También existe el control alternativo o control natural de acuerdo con Stoll (1989), que consiste en la utilización de los medios que proporciona la naturaleza para la protección de los cultivos conforme a lo mencionado por Hernández *et al.* (2007), las plantas producen sustancias con propiedades antimicrobianas que pueden ser empleadas para controlar diferentes enfermedades. La obtención de los extractos vegetales y el estudio de sus compuestos activos propician su empleo contra diferentes fitopatógenos, como los causantes del “Damping off.”

Tratamientos Hidrotérmicos

El calor pre-almacenamiento es un método de post-cosecha no químico (Sharma y Tripathi, 2008), los tratamientos con calor afecta el comportamiento de la síntesis de proteínas. Las nuevas proteínas sintetizadas se conocen como “proteínas de choque térmico” y se generan tanto en el patógeno como en el hospedero. Estas proteínas producen un efecto de inhibición- resistencia; y se involucran tanto en la recuperación del estrés por calor como en la termo-resistencia. Cuando la temperatura de los tratamientos es moderada, se da la oportunidad de crear resistencia en el patógeno; por lo que el principio de los tratamientos térmicos se basa en la idea de que el patógeno es más termo sensible que el tejido del hospedero, de modo que se inhibe el crecimiento del

patógeno y se activa la resistencia natural del hospedero al aplicar temperaturas altas (Sharma y tripathi, 2008).

La hidrotermia es una técnica comúnmente utilizada en geófitas (plantas de crecimiento subterráneo) como liatris (*Liatris spicata*), gladiolo (*Gladiolus spp.*), narciso (*Narcissus spp.*), tulipán (*Tulipa spp.*) y Jacinto (*Hyacinthus spp.*) (Ramos-García, 2009).

CAPITULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

En la siguiente sección, se describe la metodología así como los procedimientos analíticos llevados a cabo para poder cubrir los objetivos particulares establecidos.

Localización del experimento

El experimento se desarrolló en el periodo de enero del 2014 a febrero del 2016 en la Universidad Autónoma Chapingo, en los laboratorios destinados al área de fisiología vegetal de investigación de posgrado localizados en el km 38.5 Carretera México-Texcoco, Chapingo, México, en coordenadas 19° 29'02.6" N, 98°53'07.4 W a una altitud media 2250 msnm.

Material vegetal

El material vegetal (especies ornamentales en maceta) seleccionado para el aislamiento de microorganismos patógenos fue elegido de diversos viveros del Estado de México, Jalisco, Michoacán y Puebla (Cuadro 1).

Cuadro 1 Localización de los puntos de muestreo

Estado	Municipio	Empresa
Estado de México	Texcoco	- Viveros de Antonio Segura
Jalisco	Mascota	- Viveros forestales de mascota - Viveros y suministros de jardinería
Michoacán	Morelia	- UACH - Mercado de flores
Puebla	Atlixco	- Flores y artículos de decoración González

Los bulbos de *Lilium* sp utilizados durante las etapas de experimentación para la obtención de los extractos vegetales pertenecieron a un único lote de importación de la empresa “Van den Bos Flowerbulbs B.V” provenientes de Dijkweg 115, Honselersdijk, Holanda. El lote estuvo conformado por 300 piezas de bulbos calibre 14/16 del genero *Lilium* híbridos L/A (longiflorum/asiático) de la variedad “Indian summer”.

Material microbiológico

Las cepas de hongos seleccionadas fueron aisladas y/o donadas de diferentes lugares, ambientes y condiciones. *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium janthinellum*, y *Rhizoctonia solani*, fueron proporcionadas por el departamento de Parasitología de la Universidad Autónoma Chapingo. Las cepas silvestres fueron aisladas de plantas con visible infección micótica de los viveros mostrados en el cuadro 1.

Aislamiento e identificación de hongos fitopatógenos silvestres

El aislamiento de hongos se realizó en especies ornamentales variadas, que presentaron daño aparente, ocasionado por infesta micótica. En campana de

flujo laminar, se tomó una muestra del tejido dañado y en algunos casos con pudrición y fue colocado en cajas Petri de vidrio con medio agar papa dextrosa (PDA) incubándose durante 10 d a 28 °C a media luz. Las diversas colonias se aislaron, resembraron y purificaron hasta obtener cultivos monospóricos y axénicos. La conservación de cepas fúngicas se realizó con la técnica de cultivo seriado (Mateos, 2002). Una vez obtenido el crecimiento micelial se determinaron los patógenos presentes con ayuda de claves de identificación (Barnett y Hunter, 1998). Las estructuras microscópicas del micelio aislado se observaron al microscopio (Olympys CH20), las imágenes fueron tomadas con una cámara digital del 14.2 MPX (Samsung WB150F).

Las cepas obtenidas de los muestreos en viveros que mostraron presencia de polvo y moho característico de la sintomatología de micosis, siguieron el protocolo de Hernández-Moreno *et al.* (2013); colocando el polvo provocado por este tipo de pudrición en cajas Petri con medio agar papa dextrosa (PDA), se incubaron durante 10 d a 28 °C en oscuridad total. Las diversas colonias se aislaron, resembraron y purificaron hasta obtener cultivos monospóricos, en medio agar-agua por el método de dilución decimal seriada; se incubaron en condiciones ambientales de laboratorio por 36 h algunas esporas germinadas se transfirieron a caja Petri con PDA. La conservación de cepas fúngicas se realizó con la técnica de silica-gel (Chang y Elander, 1986).

Caracterización de hongos fitopatógenos silvestres

Extracción de ADN

Con base al protocolo propuesto por castellanos (2007). A partir de un cuadrante de 5 x 5 mm de área, proveniente de un cultivo axénicos se inocularon 50 mL de medio caldo papa dextrosa y se incubo 4 d a 28 °C.

El micelio se recuperó con papel filtro estéril (Papel Whatman®, Grado 1); posteriormente el micelio se maceró y trituró con nitrógeno líquido en un mortero de porcelana. En tubos Eppendorf, se agregó 0.2 g del micelio macerado (aproximadamente hasta la marca 150 µL) más 700 µL de buffer de extracción con proteinasa K, se homogeneizó la mezcla mediante vórtex e incubó a baño María a 65 °C durante 1 h, durante este periodo se mezcló por inversión manual cada 20 min.

Después de la incubación se agregó 0.5 volúmenes de acetato de amonio 7.5 M y se mezcló por inversión del tubo para ser incubado a temperatura ambiente por 10 min. Finalizando la incubación se centrifugó a temperatura ambiente a 12,000 rpm durante 10 min. Posteriormente se rescató el sobrenadante evitando contaminar con la interfase y trasladando la muestra a un nuevo tubo Eppendorf de 1.5 mL; a continuación se adicionó 1 volumen igual de una solución de cloroformo y alcohol isoamílico (24:1) y se centrifugó a 12,000 rpm durante 10 min a temperatura ambiente. Se rescató el sobrenadante y se colocó en un nuevo tubo Eppendorf de 1.5 mL, seguido de esto se agregó acetato de sodio 3 M de pH 5.2 (1/10 del volumen del sobrenadante) y se homogeneizó manualmente por inversión.

Posteriormente se agregó isopropanol frío en una relación 1:1 y se homogeneizó suavemente por inversión del tubo manualmente. La muestra obtenida se incubó a -20 °C durante toda la noche, para posteriormente centrifugar a 14,000 rpm durante 10 min a temperatura ambiente, seguido de la eliminación del sobrenadante. A continuación se lavó el pellet (pastilla) con 800 µL de etanol frío al 70 %, y se centrifugó a 14,000 rpm durante 5 min. Se volvió a eliminar el sobrenadante y se dejó secar el pellet a temperatura ambiente. Se diluyó el pellet en el buffer 1X TE añadiendo 2 µL de RNAasa (1 mg/mL) y se incubó a 37 °C durante 1 h. Finalmente se almacenó el ADN a -20 °C.

La pureza del ADN obtenido, se verificó por electroforesis en un gel de agarosa al 4 % teñido con 3 µL de marcador molecular GelRed 10,000x (0.1µg/µL) y se observó en un fotodocumentador molecular (UVP High Performance UV Transiluminator, Modelo Digi doc it Darkroom). Se determinó la concentración de ADN en el nanodrop (Thermo Scientific modelo NanoDrop Lite) para posteriormente ajustarla a 50 ng/µL utilizando la formula $C_1V_1 = C_2V_2$, como parte de los requerimientos del laboratorio para cuantificación y secuenciación.

Análisis molecular

Una vez determinada la calidad óptima del ADN se realizó la secuenciación del mismo, para lo cual la reacción de PCR requirió una mezcla de reacción constituida por los componentes y volúmenes mostrados en el cuadro 2.

Cuadro 2 Composición de la mezcla de reacción para PCR

Componente	Volumen µL/reacción
DNA (20ng)	4
dNTPs (1 mM)	5
Buffer 5X	5
MgCl₂ (25 mM)	2.5
ITS5* (10 pM)	1
NL4** (10 pM)	1
Taq Poly 5u/µL	0.3
Agua grado HPLC	6.2

*Secuencia del primer ITS5 5' GGA AGG AGA AGT CGT AAC AAG G 3'

**Secuencia del primer NL4 5' GGT CCG TGT TTC AAG ACG G 3'

Las condiciones de termociclaje fueron: un ciclo a 95 °C, por 4 min durante 35 ciclos [95 °C, 1 min; 57 °C, 1 min; 72 °C, 2 min] y un ciclo de extensión final a 72 °C por 10 min. La limpieza de los fragmentos ITS amplificados se llevó a cabo con las enzimas Sap y Exol. La secuencia se realizó con los primers (iniciadores) internos ITS1 (5' TCC GTA GGT GAA CCT GCG G 3') e ITS4 (5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3').

El análisis de la secuencia se realizó con diferente software, siendo CHROMAS PRO (<http://technelysium.com.au/wp/chromaspro/>) fue el programa que se utilizó para limpiar el cromatograma y preparar la secuencia para el ensamble. El programa MEGA ver 5.0 (http://www.megasoftware.net/download_form) se utilizó para realizar las alineaciones y por último el CLUSTAL OMEGA (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) se utilizó para realizar los alineamientos múltiples.

Análisis de patogenicidad

Se utilizaron 10 bulbos de *Lilium* sanos variedad “Indian summer” calibre 14/16, ocho bulbos para los ensayos de patogenicidad por duplicado con cada cepa de hongo y dos como tratamiento testigo. Se despojó a los bulbos de las escamas deshidratadas o que presentaron cualquier daño físico, se lavaron con solución jabonosa y enjuagaron con agua potable. Bajo condiciones estériles se desinfectaron con solución de hipoclorito de sodio al 1.5 % por 2 min, se enjuagaron con agua destilada en dos ocasiones y se colocaron sobre papel secante (Kuklinsky, 1993). Al secar los bulbos se colocaron en bolsas herméticas con cierre dentado nuevas y desinfectadas.

Cada par de septos se inocularon con cultivo de *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium janthinellum* y *Rhizoctonia solani* de 10 d respectivamente. Los septos inoculados se incubaron por 30 d a temperatura ambiente. Los métodos de inoculación fueron: “infiltración de suspensión de esporas” en el caso de los géneros *Penicillium* y *Aspergillus*, según la metodología propuesta por González-Pérez (2011); la suspensión se ajustó a una concentración de 10^5 esporas·mL⁻¹. Se infiltró un mL en el brote apical y 1 mL en la placa basal. Inoculación con micelio en el caso de los géneros *Fusarium* y *Rhizoctonia*; se basó en la metodología propuesta por Cruz-Miranda (2011), para lo cual se colocó micelio en una herida hecha de 3 mm de diámetro, con un bisturí cerca del brote apical.

Como tratamiento interno se adicionó la vernalización de 5 de los 10 septos (4 °C por 12 semanas) y como variables de respuesta del daño externo se consideró la decoloración del tejido hundimiento del color café y la presencia de micelio en sus variantes de colores, realizando finalmente 10 tratamientos con 2 repeticiones, en un diseño experimental completamente al azar.

Obtención del extracto vegetal

La obtención del extracto vegetal crudo siguió tres protocolos propuestos por diversos autores con la finalidad de estandarizar la técnica de obtención de extractos en bulbos de *Lilium* sp. para lograr la mayor obtención de compuestos orgánicos activos, durante la manipulación tanto física como química.

Técnica 1

La selección de los bulbos siguió el protocolo antes expuesto por (Kuklinsky, 1993) para la selección y sanitación de septos, posteriormente, se pesaron 150 g de bulbos fresco de *Lilium* híbrido L/A “Indian summer” que fueron licuados por 2 min en un litro de agua destilada, se dejó reposar por 60 min y posteriormente se filtró el sobrenadante primeramente con un paño de algodón y posteriormente con filtro de papel. El extracto obtenido se llevó a refrigeración a 4 °C hasta su utilización (Chávez, 2012).

Técnica 2

Los bulbos se limpiaron retirando impurezas, se desprendieron los septos más afectados por daño físico, se pesaron 150 g y se maceraron en un mortero con 50 mL de etanol al 100 % grado analítico, una vez lograda una masa homogénea y sin presencia de sólidos, se colocó en un matraz por 60 min para reposar y lograr la precipitación del bagazo, posteriormente se extrajo el etanol y se adicionó 50 mL más de etanol al 100 % y se dejó reposar a un tiempo

equivalente. A continuación se extrajo el sobrenadante (etanol) y se confinó a 4 °C.

Técnica 3

Se pesaron 150 g de bulbos *Lilium* híbrido L/A “Indian summer”, que no presentaron marchitamiento, fisuras o deshidratación, inmediatamente se separaron los septos de la placa basal, los cuales fueron lavados en una solución jabonosa y enjuagados con agua potable. Posteriormente, se desinfectaron con solución de hipoclorito de sodio al 1.5 % por 2 min, a continuación se cortaron en trozos homogéneos, se expusieron a deshidratación a temperatura ambiente durante 4 d, evitando la luz directa. Al finalizar este periodo se maceraron en mortero con 50 mL de etanol al 100 % grado analítico y se continuó con el protocolo “2” (Sarubbi, 2002).

Cromatografía en capa fina

Una vez obtenido el extracto vegetal crudo, se procedió al fraccionamiento de este por afinidad en la polaridad de compuestos analizando por cromatografía de capa fina (CCP) en el cual se emplearon placas de sílica gel GF 254 de 0.25 mm de espesor y se corrieron en diferentes eluyente y concentraciones como lo muestra el cuadro 3.

Cuadro 3 Mezclas de eluyentes utilizados en cromatografía de capa fina

Eluyente	Proporción
Hexano 100 %	1
Acetato de metilo 100 %	1
Acetato de metilo 50 %	1
Acetato de metilo 10 %	1
Etanol 100 %	1
Hexano 100 % - Acetato 100 %	1:1
Hexano 100 % - Acetato 100 %	8:2

Obtención del extracto vegetal no polar (EVNP)

En 30 mL de extracto vegetal crudo se adicionó 60 mL de hexano grado analítico se agitó en un vórtex por 5 min, se extrajo el sobrenadante (hexano) en el que interactúan los compuestos no polares, y en rota vapor (Yamato Rotary Evaporator RE601) se extrajo el hexano (68.7 °C – 1 atm) concentrando el extracto vegetal no polar del extracto crudo conteniendo en su mayoría ácidos grasos, ceras, fosfolípidos, esfingolípidos etc.

Obtención del extracto medianamente polar (EMP)

En 30 mL de extracto vegetal crudo se adicionó 60 mL de acetato de metilo se agitó en un vórtex por 5 min y se extrajo el sobrenadante (acetato de metilo) en el que interactúan los compuestos medianamente polares, con ayuda del rota vapor (56.3 °C – 1 atm) se concentró el extracto vegetal medianamente polar del extracto crudo, conteniendo en su mayoría alcaloides, flavonas etc.

Obtención del extracto vegetal polar (EVP)

En 30 mL de extracto vegetal crudo se adicionó 60 mL de etanol 100 % grado analítico se agitó en vórtex por 5 min y con ayuda del rota vapor se extrajo el etanol (78.3 °C - 1 atm) y posteriormente el agua (100 °C – 1 atm) concentrando el extracto vegetal polar del extracto crudo, conteniendo en su mayoría azúcares.

Caracterización del extracto vegetal

Se realizó en el laboratorio de nutrición de frutales del departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo. En un equipo de cromatógrafo de gases-masas (Perkin Elmer Instruments Turbo Mass Gold Spectrometer Auto System XL Gas Chromatograph, USA), se utilizó la columna capilar de sílica-gel SP TM 2380. Se utilizó helio como gas portador a 1.5

mL/min, después de la inyección de la muestra, la columna se mantuvo a una temperatura inicial de 150 °C por 2 min, luego se incrementó 10°C/min hasta alcanzar 250 °C manteniéndose así por 8 min. La identificación positiva de los diferentes componentes se llevó a cabo mediante el análisis de los tiempos de retención.

Bioensayos de inhibición (Antibiogramas)

Para la realización de los antibiogramas, previamente se adicionó 30 mL del extracto vegetal crudo con 100 mL de PDA para su esterilización, posteriormente se distribuyó en cajas Petri (Araujo, 2008). Una vez solidificado el medio de cultivo se procedió a inocular en el centro de cada placa, un cuadrante de 5 x 5 mm con cultivo axénicos maduro el cual fue previamente reactivado en medio líquido (caldo nutritivo) por 24 h y transferido a medio sólido (PDA) por las 72 h siguientes, teniendo una cepa fúngica con una carga enzimática activa capaz de realizar un crecimiento típico.

Este procedimiento se efectuó con 5 repeticiones para cada uno de los hongos blanco, cada 24 h se realizó la medición del halo de crecimiento micelial con ayuda de una regla milimétrica (vernier), determinando el área del mismo y expresando los resultados en cm². Se clasificó el efecto inhibitorio de acuerdo al radio del crecimiento micelial de los hongos en 6 rangos (cuadro 4), utilizando la escala adaptada de Viveros y Castaño *et al.* (2006).

Cuadro 4 Escala de clasificación del efecto inhibitorio de los extractos sobre el crecimiento micelial de los hongos fitopatógenos Rhizoctonia sp, Fusarium sp. Sclerotium sp. (Chávez y Aquino, 2012).

RANGOS	RADIO DE INHIBICIÓN (cm)
Alto	>2.25
Medio	1.8-2.25
Bajo	1.1-1.7
Muy bajo	0.6-1
Bajo	0.2-0.5
Sin efecto	<0.2

Asimismo se observó la morfología del mismo, esperando diferencias en la coloración y el desarrollo y crecimiento típico del hongo a analizar. Posteriormente se realizó la misma metodología con el extracto vegetal no polar, medianamente polar y polar.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza (ANAVA), y habiendo diferencias estadísticas, se llevó a cabo la comparación de medias por la test de Tukey con un nivel de significancia del 5 %.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento e identificación de hongos fitopatógenos silvestres

Las cepas fúngicas donadas por el departamento de parasitología de la Universidad Autónoma Chapingo (figura 6) caracterizadas previamente por el laboratorio en resguardo, sirvieron como punto de partida en la caracterización morfológica asociada a la descripción de las claves de identificación.

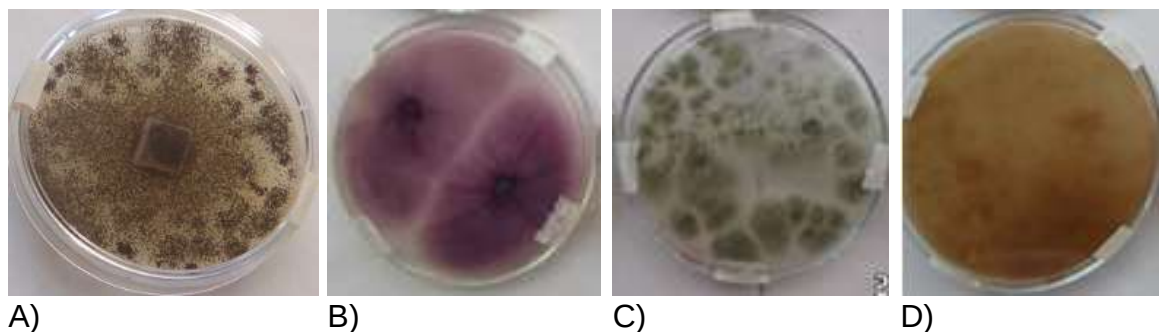


Figura 6 Hongos donados por el departamento de parasitología UACH a) *Aspergillus niger*, b) *Fusarium oxysporum*, c) *Penicillium janthinelum*, d) *Rhizoctonia solani*.

Posteriormente en marzo del 2014 se realizó el primer muestreo (cuadro 5) para la recopilación de cepas fúngicas que presentaran una evidente infección masiva en diversas especies ornamentales en estados de la república mexicana con mayor producción y demanda tanto nacional como internacional (INEGI, 2015).

Cuadro 5 Muestreo de microorganismos 2014

Lugar	Plantas	Hongos	Bacterias
Estado de México	11	5	8
Jalisco	7	7	4
Michoacán	14	7	5
Puebla	6	4	3

Sin embargo las condiciones climáticas, geográficas e incluso culturales, influyen en la microbiota natural del suelo destinado a la horticultura ornamental. Por tal motivo se estableció un segundo muestreo denominándolo “confirmatorio” el cual se llevó a cabo en marzo del 2015 (cuadro 6) en fechas similares al muestreo original, con la finalidad de corroborar la presencia de las especies fúngicas en estas localidades y su periódica incidencia en variedades ornamentales ampliamente reportadas y de interés comercial.

Cuadro 6 Muestreo confirmatorio 2015 recopilación de microorganismos en estados de mayor producción y demanda nacional.

Lugar	Plantas	Hongos	Bacterias
Estado de México	10	7	6
Jalisco	10	9	7
Michoacán	10	7	8
Puebla	10	6	8

Como resultado de este estudio, se obtuvo un mayor número de cepas viables cultivables, aumentando el catálogo de hongos interno en un 26 % y de bacterias en un 45 % incluyendo los géneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* y *Rhizoctonia*. Cabe mencionar, que en el muestreo confirmatorio se tomaron muestras de suelo complementarias a las muestras de tejido vegetal afectado para una mejor determinación de la relación de microorganismos simbios y parásitos. Los microorganismos se encuentran actualmente en confinamiento en el cepario de la Universidad Politécnica de Pachuca como retribución al apoyo concedido a la realización de este proyecto.

De las cepas obtenidas se seleccionaron los microorganismos que presentaron morfología macroscópica evidente de los géneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* y *Rhizoctonia*, formando las siguientes paletas representativas de cada lugar de muestreo (figura 7, 8, 9 y 10)

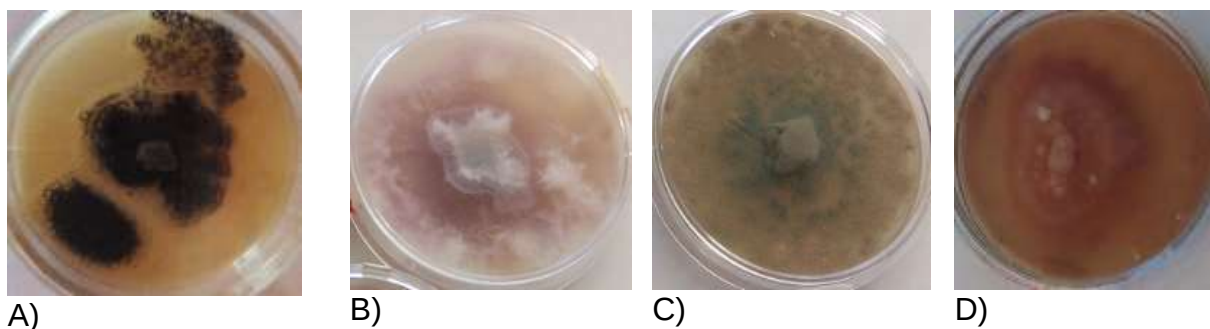


Figura 7 Hongos aislados del Estado de México (2014) a) *Aspergillus niger* b) *Fusarium oxysporum* c) *Penicillium janthinelum* d) *Rhizoctonia solani*



Figura 8 Hongos aislados del estado de Jalisco (2014) a) *Aspergillus niger* b) *Fusarium oxysporum* c) *Penicillium janthinelum* d) *Rhizoctonia solani*

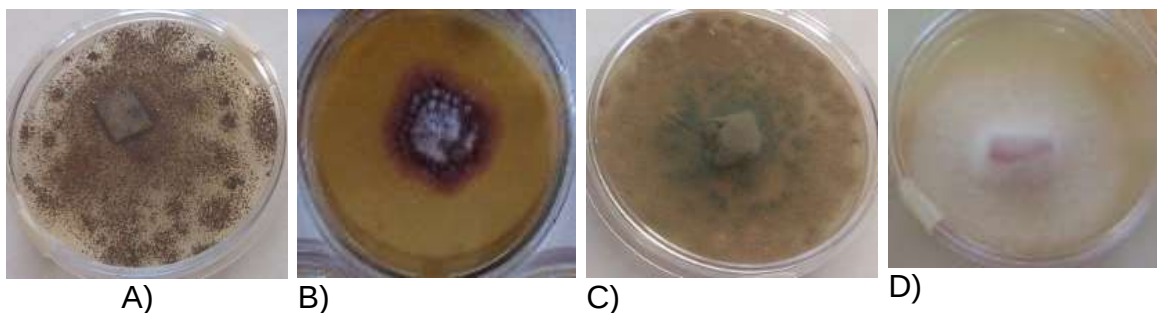


Figura 9 Hongos aislados del estado de Michoacán (2014) a) *Aspergillus niger* b) *Fusarium oxysporum* c) *Penicillium janthinelum* d) *Rhizoctonia solani*

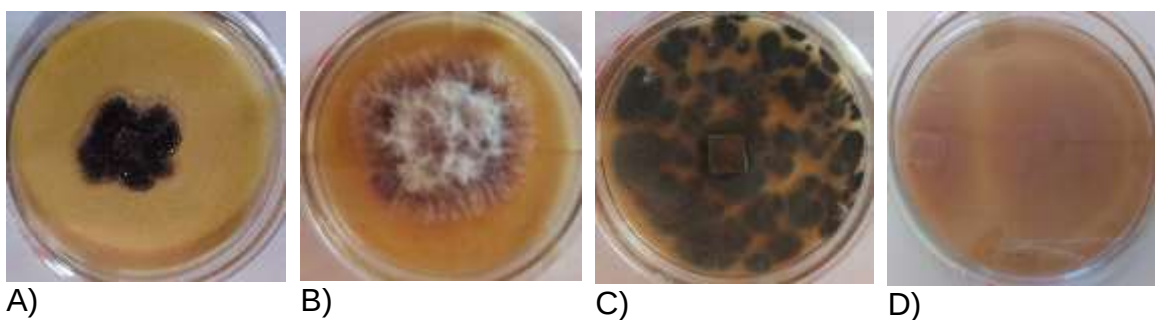


Figura 10 Hongos aislados del estado de Puebla (2014) a) *Aspergillus niger* b) *Fusarium oxysporum* c) *Penicillium janthinelum* d) *Rhizoctonia solani*

Caracterización morfológica de hongos fitopatógenos silvestres

Considerando la descripción morfológica macroscópica y microscópica de *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium janthinelum* y *Rhizoctonia solani*, reportados en literatura, se procedió a la observación e identificación de las cepas silvestre aislada que cumplía macroscópicamente con la morfología típica de la especie, comprobando así la estabilidad estructural y predecir la presencia de patotipos.

Descripción morfológica macroscópica de *Aspergillus niger*.

Las observaciones correspondieron a las características señaladas en las claves de identificación (Barnett y Hunter, 1998) corroborando un diámetro de 50 mm en una semana, una topografía lisa y expansiva, una textura pulverulenta, una coloración verde azulada con un margen blanquecino y un reverso color crema, en el cuadro 7 se describe las características morfológicas visiblemente evidentes para la determinación de la cepa *Aspergillus niger*.

Cuadro 7 Resultados morfológicos macroscópicos de A. niger

Medio	Descripción	
PDA	Colonias al principio blancas y posteriormente negras (72 h), textura similar a la pimienta.	
Agar		
Sabouraud		

Descripción morfológica microscópica de *Aspergillus niger*.

Las observaciones coincidieron a las indicadas por las claves de identificación referente a las características microscópicas de la cepa, definiendo conidióforos vesiculares, conidias pequeñas y muy numerosas, masa de esporas en forma de columna, conidióforos cortos, vesículas en forma de pera, sin presencia de métulas, fiálides agrupadas con puntas hacia arriba cubriendo únicamente los 2/3 partes de la vesícula, las conidias son redondas de 2.5-3.5 μm de diámetro con una superficie ligeramente rugosa (Barnett y Hunter, 1998), en el cuadro 8 se describe las características morfológicas microscópicas visiblemente evidentes para la determinación de la cepa *Aspergillus niger*.

Cuadro 8 Resultados morfológicos microscópicos de *A. nige*

Estructura	Descripción	
Hifas	Septadas hialinas	
Conidióforos	Pared lisa, hialinos, largos	
Vesículas	Globosa grande, subesférica	
Fiálides	Bisériadas	
Conidias	Globosa negras, subesféricas	

Descripción morfológica macroscópica de *Fusarium oxysporum*.

Los resultados coinciden con las claves de identificación que describen un crecimiento de 64 mm por semana en cultivo de PDA a 25 °C, un micelio aéreo abundante y algodonoso, a veces afelpado y de color blanquecino con tonalidades rosa violáceo y púrpura, principalmente en el centro de la colonia y una pigmentación variable, con predominio de los colores rosa violáceo y púrpura en el anverso de la placa, y azul grisáceo en el reverso de la misma (Barnett y Hunter, 1998), en el cuadro 9 se describe las características morfológicas macroscópicas visiblemente evidentes para la determinación de la cepa *Fusarium oxysporum*.

Cuadro 9 Resultados morfológicos macroscópicos de *F. oxysporum*

Medio	Descripción	
PDA	Colonias al principio blancas y posteriormente púrpuras, algodonosas o lanosas (96	
Agar Sabouraud	h), producción de pigmento púrpura difusible en el medio	

Descripción morfológica microscópica de *Fusarium oxysporum*.

Desde el punto de vista morfológico las claves de identificación especifican conidióforos que surgieron lateralmente de las hifas en el micelio aéreo, simples y ramificados; esporodoquios ausentes, células conidiógenas monolocales y

subcilíndricas; macroconidios hialinos, de semicurvos a casi rectos a curvados, puntiagudos en sus extremos, con tres a cinco septos de $26.10-36.74 \times 3 - 4.54 \mu\text{m}$ y célula basal en forma de pie. Los microconidios hialinos en forma en falsas cabezas y abundantes en forma oval elíptica, con uno o dos septos de $3.58- 4.06 \times 2.06 - 3.02 \mu\text{m}$ y clamidosporas de $6.6 - 10.19 \mu\text{m}$ de tamaño, abundantes, esféricas, de paredes lisas, terminales e intercalares y dispuestas individualmente o en pares a lo largo de la hifa (Barnett y Hunter, 1998), en el cuadro 10 se describe las características morfológicas microscópicas visiblemente evidentes para la determinación de la cepa *Fusarium oxysporum*.

Cuadro 10 Resultados morfológicos microscópicos de F. oxysporum

Estructura	Descripción	
Hifas	Hialinas ramificadas	
Conidióforos	Cortos, simples	
Microconidias	Elipsoidales a cilíndricas abundantes	
Macroconidias	Abundantes, delgado con una célula apical, ligeramente curva	

Descripción morfológica macroscópica de *Penicillium janthinellum*

La morfología típica macroscópica de esta cepa termodimórfica presenta colonias filamentosas, lisas con surcos radiales a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Las colonias son azuladas, gris, verdosas en el centro y blancas en la periferia. Presentan un pigmento soluble negro rápidamente difusible al medio observado desde el reverso es típico de los cultivos maduros. A $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ las colonias de *Penicillium janthinellum* son cremosas a levemente rosadas y con textura glabra y plegada (Barnett y Hunter, 1998), en el cuadro 11 se describe las características morfológicas macroscópicas visiblemente evidentes para la determinación de la cepa *Penicillium janthinellum*.

Cuadro 11 Resultados morfológicos macroscópicos de *P. janthinellum*

Medio	Descripción	
PDA	Colonias de color verde-gris planas aterciopeladas fasciculadas con producción de exudados.	
Agar Sabouraud	Colonias color café, planas aterciopeladas fasciculadas con producción de exudados.	

Descripción morfológica microscópica de *Penicillium janthinellum*.

Penicillium posee hifas septadas hialinas (1.5-5 μm de diámetro), con conidióforos simples o ramificados, métulas, fiálides y conidias. Las conidias (2.5-5 μm de diámetro) son redondas unicelulares y observadas como cadenas no ramificadas en el extremo de las fiálides. En su fase filamentosa es microscópicamente similar a otras especies de *Penicillium*. En su fase de levadura presenta células globosas o alongadas con forma de cilíndrica alongada (3-5 μm) que se multiplican por fisión (Barnett y Hunter, 1998), en el cuadro 12 se describe las características morfológicas microscópicas visiblemente evidentes para la determinación de la cepa *Penicillium janthinellum*.

Cuadro 12 Resultados morfológicos microscópicos de *P. janthinellum*

Estructura	Descripción	
Hifas	Septadas	
Conidióforos	Hialinos, largos hialinos, ramificados	
Métulas	Ramificadas de constitución gruesa	
Fiálides	Forma de botella con cuello angosto agrupado	
Conidias	Globosas, lisas, hialinas, esféricas	

Descripción morfológica macroscópica de *Rhizoctonia solani*

Rhizoctonia solani es un hongo hidrófilo y termófilo muestra un crecimiento micelial de color marrón a castaño algodonoso a 25 °C. Sin embargo a 30 °C la coloración se empárdece pigmentando con mayor intensidad del centro a las capas exteriores y a 37 °C el micelio toma una consistencia gelatinosa en las hifas más alejadas del centro (Barnett y Hunter, 1998), en el cuadro 13 se describe las características morfológicas macroscópicas visiblemente evidentes para la determinación de la cepa *Rizoctonia solani*.

Cuadro 13 Resultados morfológicos macroscópicos de *R. solani*

Medio	Descripción	
PDA	Colonias de color café-pardo planas al inicio y formación de superficie algodonosa aérea blanquecina posteriormente, la pigmentación se vuelve más oscura.	
Agar Sabouraud	Colonias color café claro con una tendencia a amarillo al inicio, planas aterciopeladas y con producción de micelio algodonoso al cubrir el área determinada.	

Descripción morfológica microscópica de *Rhizoctonia solani*.

Rhizoctonia solani produce esclerocios en una textura uniforme con redes hifales, ramificación cerca del septo central en la hifa vegetativa joven, formación de septos a una corta distancia del punto donde se originan las ramas hifales, septos doliporos y células multinucleadas en la hifa vegetativa joven (Barnett y Hunter, 1998), en el cuadro 14 se describe las características morfológicas microscópicas visiblemente evidentes para la determinación de la cepa *Rizoctonia solani*.

Cuadro 14 Resultados morfológicos microscópicos de *R. solani*

Estructura	Descripción	
Hifas	Septadas, hialinas	
esclerocio	Superficie dura y resistente	
conidias	No presentes en fase asexual	
Métulas	Ramificadas de constitución gruesa	
Fiálides	Forma de botella con cuello angosto agrupado	

Caracterización molecular de hongos fitopatógenos silvestres

Extracción de ADN

Los resultados de la extracción de ADN obtenidas se muestran en el cuadro 15, en los cuales se describen con el sufijo numérico el lugar de aislamiento de la especie del hongo a analizar. Designando como “1” a Texcoco, Edo de México, “2” a Mascota, Jalisco, “3” a Morelia, Michoacán y “4” a Atlixco Puebla. Las muestras que no presentan sufijo son las especies donadas por el departamento de parasitología de la UACH las cuales fueron secuenciadas por el mismo.

Cuadro 15 Concentración de ADN obtenida de las extracciones de micelio

Muestra	Cantidad (ng)	Relación 260/280	Muestra	Cantidad (ng)	Relación 260/280
A1	46.4	1.17	R3*	258.9*	1.91*
F1	14.7	1.82	P3	1246.4	1.24
R1	24.5	1.89	A4*	1750.4*	1.94*
P1	6.5	1.61	F4	77.5	1.58
A2	329.5	1.87	R4	240.9	1.63
F2*	90.5*	1.90*	P4*	1265.3*	1.90*
R2	127.1	1.84	A	466.6	1.84
P2	527.8	1.67	F	132.1	1.78
A3	245.1	1.71	R	255.2	1.92
F3	86.2	1.85	P	633.9	1.89

A: *Aspergillus niger*, F: *Fusarium oxysporum*, P: *Penicillium citrinum*, R: *Rhizoctonia solani*.

Las muestras señaladas con asterisco, representan las cepas que presentaron la mayor concentración de ADN en base al protocolo definido por Castellanos *et al.* (2007) siendo utilizadas para continuar con el protocolo de secuenciación de ADN.

Calidad del ADN

Se determinó la calidad de las muestras de ADN seleccionadas en gel de agarosa al 1.2 % el cual corrió a un voltaje de 90 voltios. El resultado del gel se muestra en la figura 11 en el cual se observan bandas nítidas denotando ADN de alta calidad.

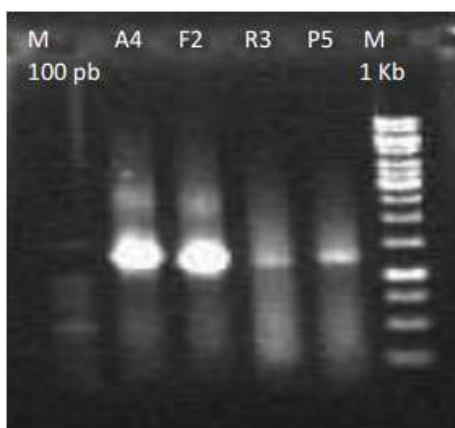


Figura 11 Calidad de ADN de las cepas de *Aspergillus sp.*, *Fusarium sp.*, *Rhizoctonia sp.* y *Penicillium sp.* en gel de agarosa al 1.2 %

PCR-ITS

El producto de las amplificaciones con los iniciadores ITS1 e ITS4 de las cepas de *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium janthinellum* y *Rhizoctonia solani* se muestra a continuación en los cuales se pueden observar las bases difusas (basura) y que fueron sometidas a limpieza y secuenciación.

Figura 12 Secuencia génica cruda de *Aspergillus niger* (forward)

Aspergillus niger

(Reverse)

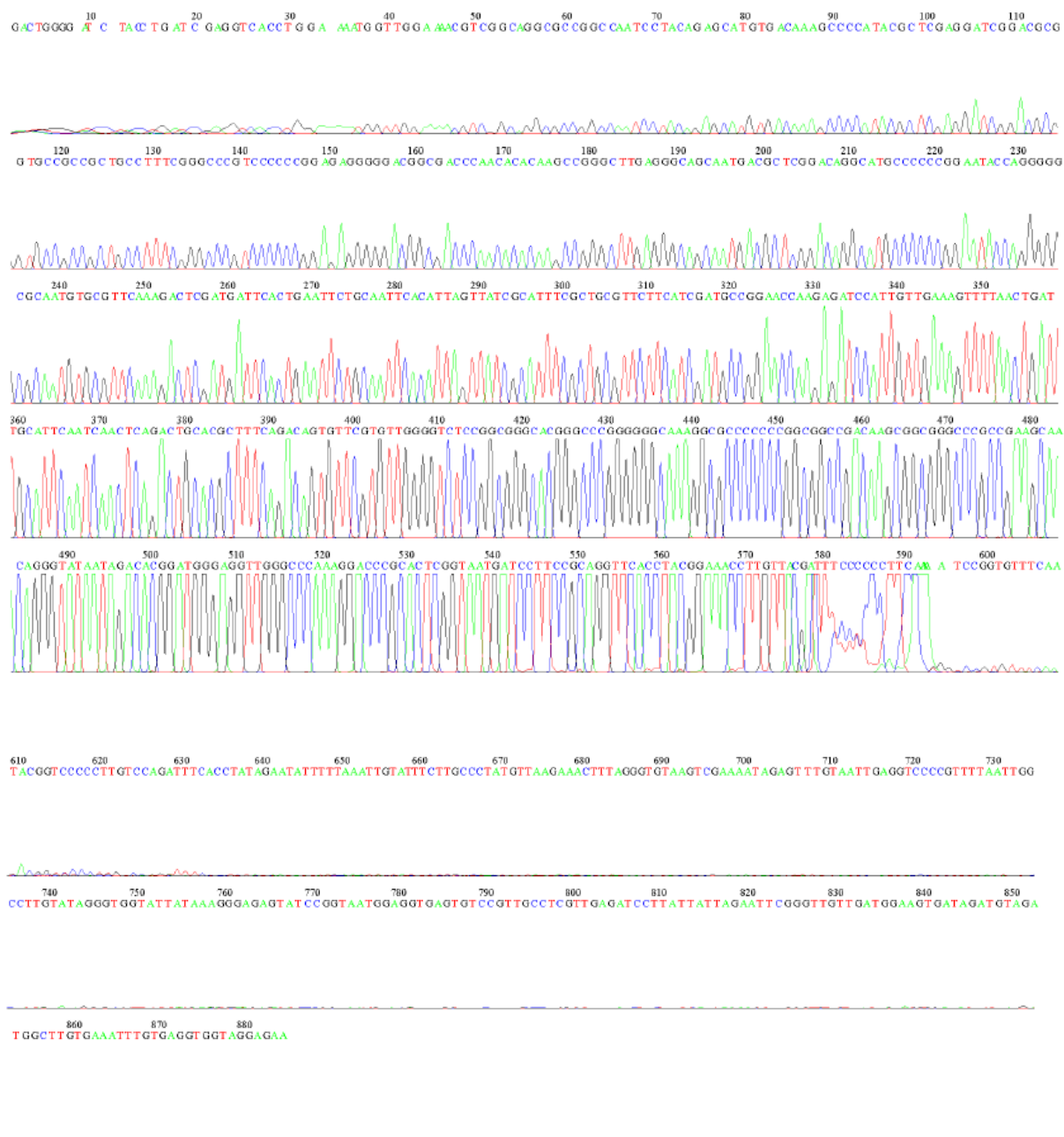


Figura 13 Secuencia génica cruda de *Aspergillus niger* (reverse)

(Forward)



Figura 14 Secuencia génica cruda de *Fusarium oxysporum* (forward)

Fusarium oxysporum (Reverse)

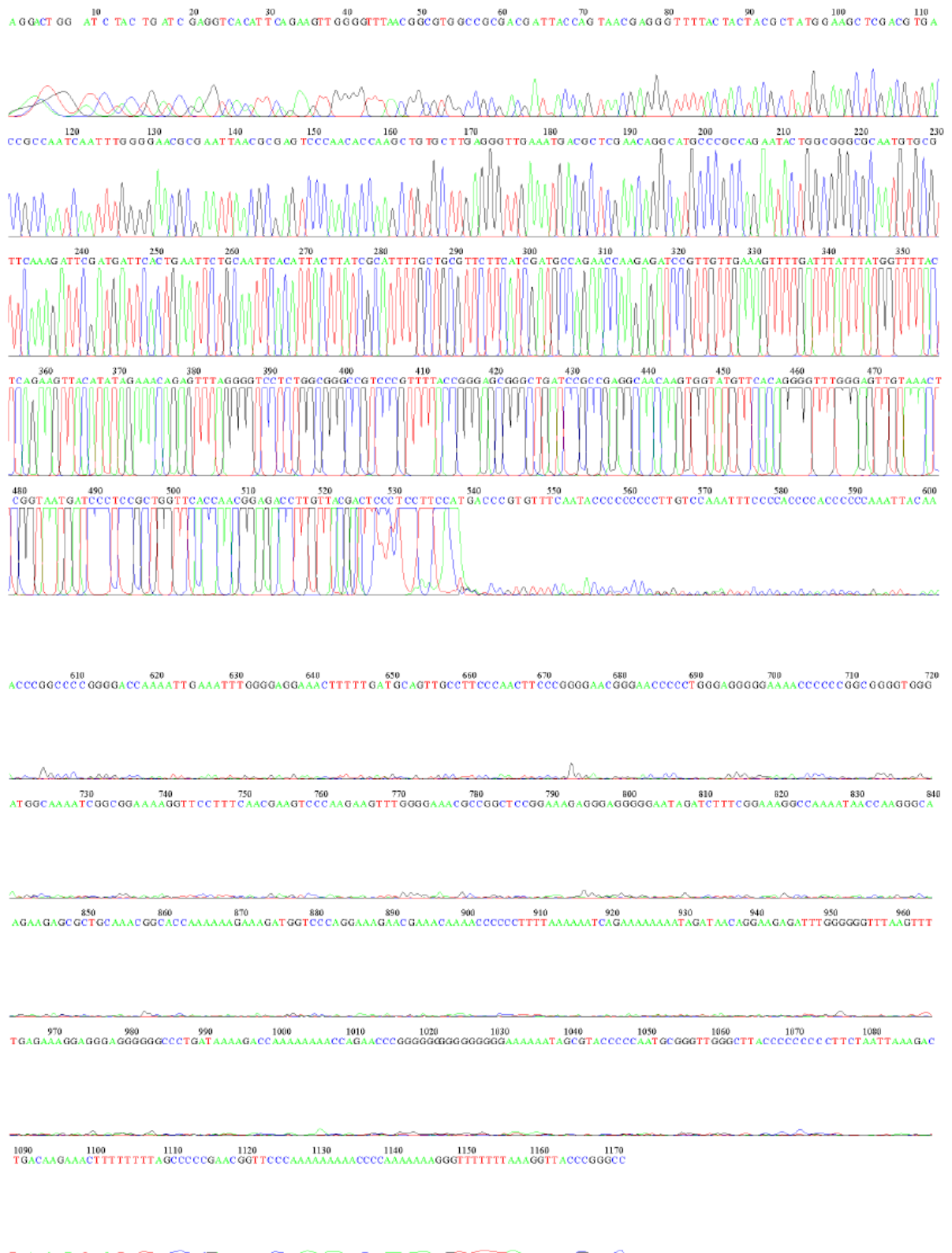


Figura 15 Secuencia génica cruda de *Fusarium oxysporum* (reverse)

(Forward)



Figura 16 Secuencia génica cruda de *Rhizoctonia solani* (forward)

Rhizoctonia solani (Reverse)

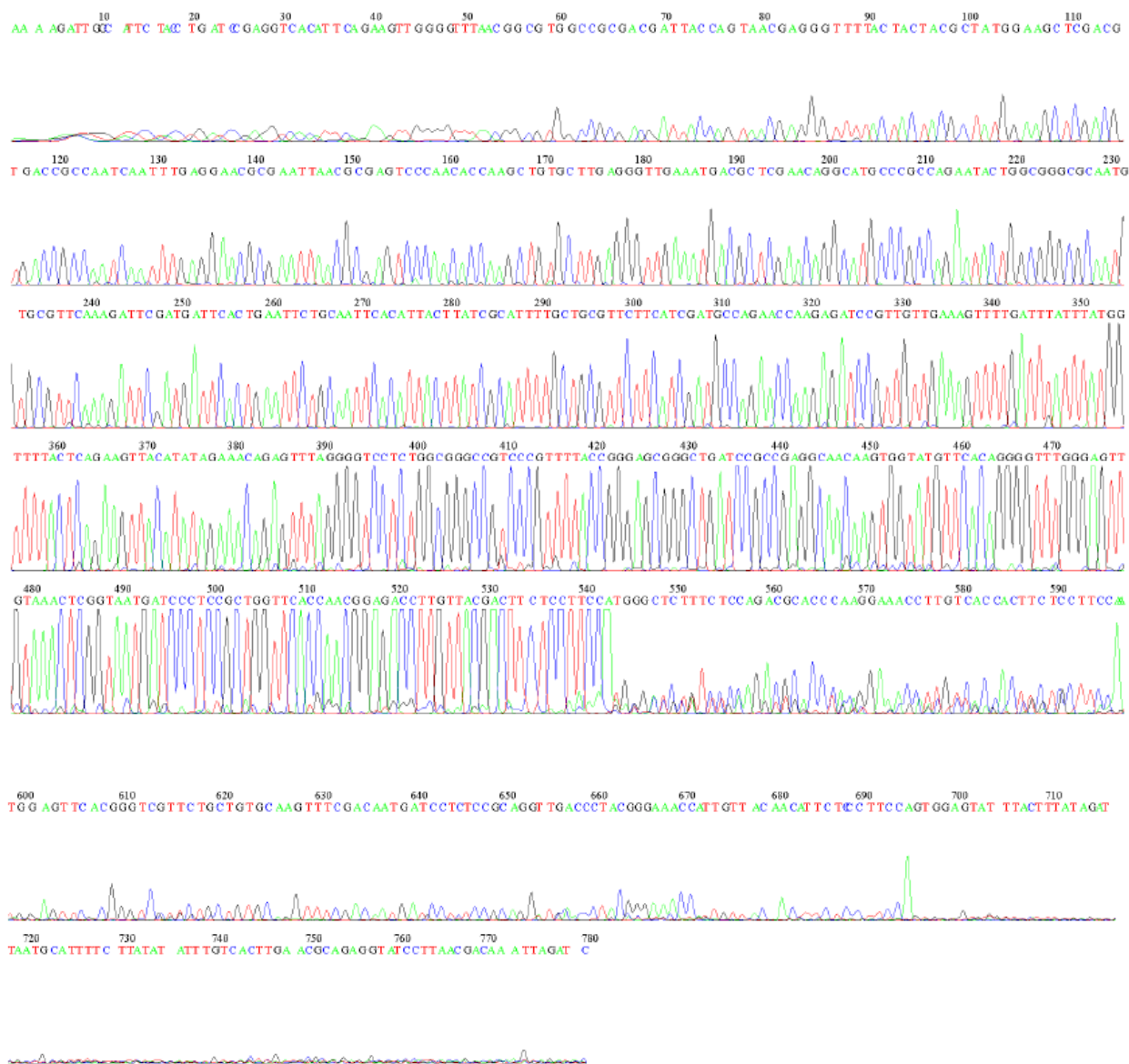


Figura 17 Secuencia génica cruda de *Rhizoctonia solani* (reverse)

Penicillium citrinum (Forward)



Figura 18 Secuencia génica cruda de *Penicillium citrinum* (forward)

Penicillium janthinellum (Reverse)

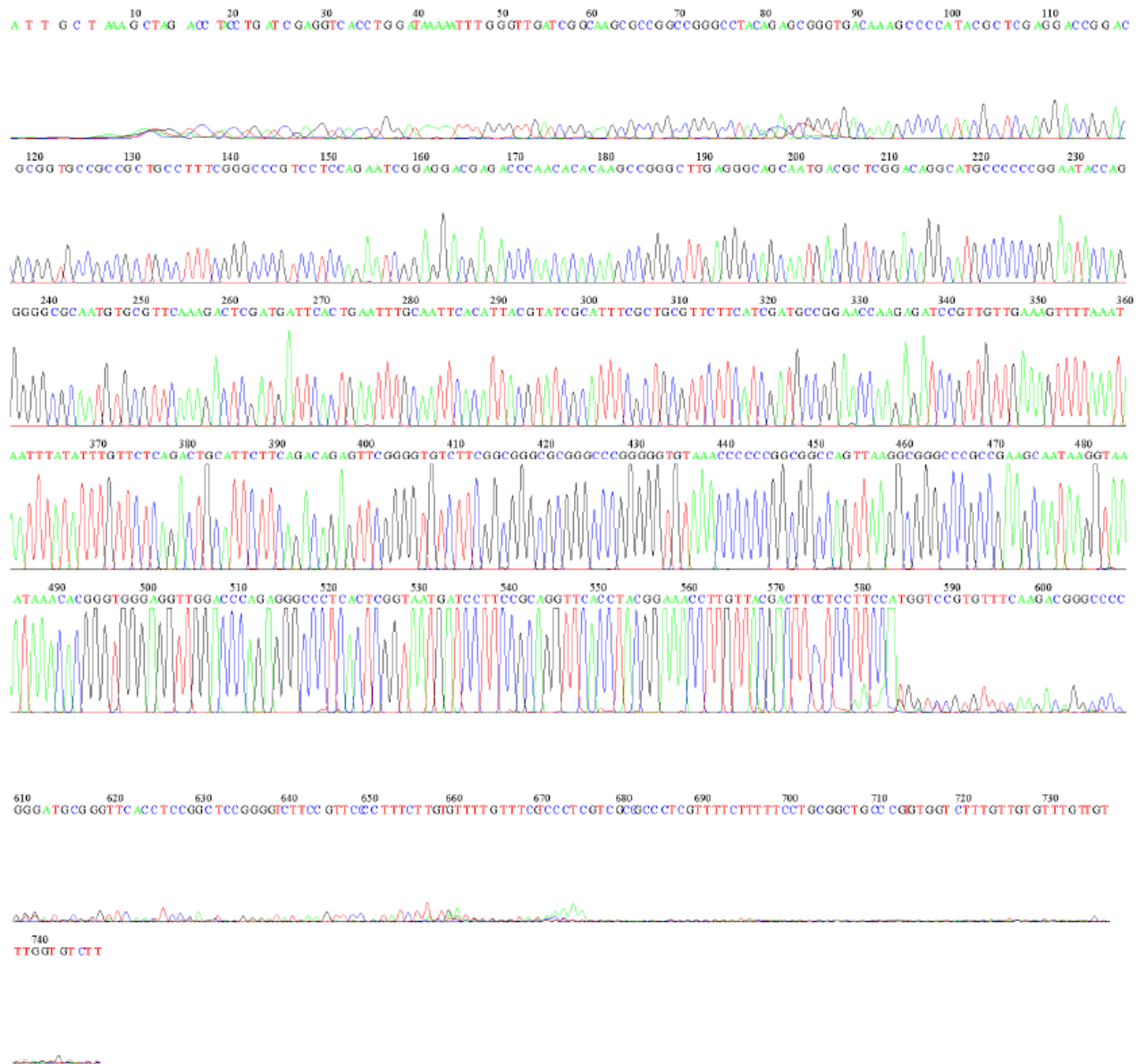


Figura 19 Secuencia génica cruda de *Penicillium citrinum* (reverse)

Cotejo de las secuencias génicas

Las regiones intergénicas internas (ITS) de los genes ribosomales amplificados por PCR, del aislamiento identificado morfológicamente como *R. solani*, tuvo una talla de 700 pb que concuerda con la talla esperada para la especie. Las

secuencias obtenidas tuvieron un 99 % de similitud con la región ITS, cuya alineación coincidió con *R. solani* JX050241.1

El aislamiento identificado morfológicamente como *A. niger*, tuvo una talla de 970 pb que concuerda con la talla esperada para la especie. La secuencia obtenida tuvo un 98 % de similitud con la región ITS, cuya alineación coincidió con *A. niger* DQ207726.1

El aislamiento identificado morfológicamente como *F. oxysporum* tuvo una talla de 1040 pb que concuerda con la talla esperada para la especie. La secuencia obtenida tuvo un 99 % de similitud con la región ITS, cuya alineación coincidió con *F. oxysporum* CM000589.1

El aislamiento identificado morfológicamente como *P. janthinellum* tuvo una talla de 930 pb que concuerdan con la talla esperada para la especie. Sin embargo la secuencia obtenida tuvo un 99 % de similitud con la región ITS, cuya alineación coincidió con *P. citrinum* LKUP01000239.1.

La comparación de las secuencias fue realizada con la base de datos en línea Blast de NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

Análisis de Patogenicidad

Esta prueba confirmó la capacidad de la cepa blanco para generar la sintomatología típica de una micosis propia de cada género fúngico en septos de bulbos de *Lilium* híbridos L/A. Después de la infección inducida a 96 h se observaron las primeras señales de contaminación sobre el tejido meristemática del septo en forma de manchas amarillentas-pardas (Figura 20). Después de las 144 h el área dañada presentaba tejido degradado, sustrayendo de estas zonas una alícuota para sembrar en medio sólido, confirmando la presencia de *Fusarium oxysporum* de acuerdo a los postulados de Koch.

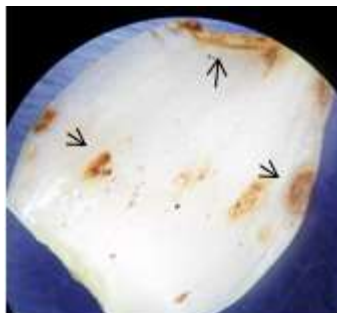


Figura 20 Septo de Liliun L/A después de 96 h bajo infección inducida por cultivo axénico de Fusarium oxysporum .Las flechas señalan las afectaciones al tejido.

Obtención del Extracto Vegetal

Del extracto obtenido se prosiguió a determinar la concentración de los compuestos presentes en el mismo, realizándolo bajo la técnica de densidad óptica basada en el principio de turbidimetría por espectrofotómetro (Jenway 6320D). Para determinar la cantidad de grupos se tomaron las siguientes longitudes de onda para obtener la absorbancia y relacionarla a una concentración de acuerdo a las curvas de calibración.

Cuadro 16 Longitudes de onda a las cuales se realizaron las lecturas en espectrofotómetro para determinar la concentración de compuestos

COMPUESTOS	λ (nm)
Carbohidratos	380
Ácidos grasos	232-250-270 240-285
Flavonoides	300-550 315
Alcaloides	300-335-330

Las absorbancias obtenidas por espectrofotometría se muestran en el cuadro 17 en la cual podemos observar que las lecturas más altas se obtuvieron al aplicar la técnica 2. Esto se debe eventualmente a la inmersión de los compuestos en el medio (agua destilada) e incluso la generación de sólidos disueltos, suspendidos y sedimentables por la interacción muestra-disolvente, provocando mayor turbidez en el medio por compuestos trazas o degradados.

En el caso de la técnica 3 la previa deshidratación consiguió favorecer la degradación de ácidos grasos y la volatilización de algunos compuestos fenoles así como promover la síntesis de intermediarios y/o la degradación de ceras de la cubierta que pudieran actuar como intermediarios ácidos.

Cuadro 17 Absorbancias obtenidas de los extractos vegetales por las diferentes técnicas de obtención

Técnica	DO C H O	DO A G	DO F L A	DO A L C
1	0.812 A	0.328 A	0.359 A	0.390 A
2	0.935 A	0.742 A	0.570 A	0.427 A
3	0.871 A	0.522 A	0.302 A	0.486 A



Cromatografía en capa fina (CCF)

El extracto vegetal crudo obtenido de la etapa anterior; fue analizado por CCF para un fraccionamiento previo que facilitara el análisis por cromatografía de gases previendo posibles interferencias durante el procesamiento de muestras y la capacidad de volatilización (derivatización) de la misma en la columna.

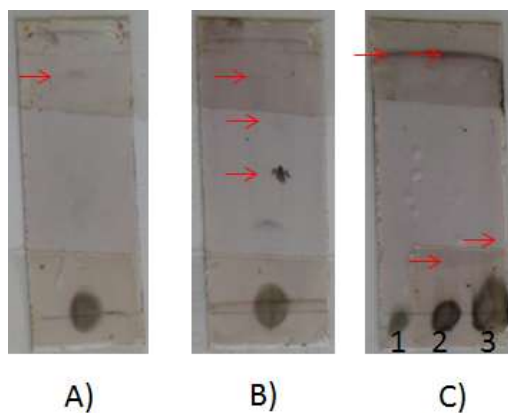


Figura 21 Cromatografía en capa de fina de a) Hexano 100%, b) Hexano 100 % Acetato 100 % (8:2), c.1) Acetato de etilo 10 %, c.2) Acetato de etilo 50 % y c.3) Acetato de etilo 100 %

De los resultados obtenidos podemos observar que el hexano (Figura 21.a) desplazaba un grupo bien definido de compuestos identificándolos en una sola marca sobre la placa de silica-gel en el extremo superior denotando una polaridad con efecto hidrofóbico. En cuanto a la mezcla de eluyente de hexano y acetato de etilo (Figura 21.b) se revelaron 4 marcas; coincidiendo la primer marca en el extremo superior con la mostrada en la figura 21.a y denotando tres marcas sin barridos que mostraban grupos definidos de compuestos de polaridad media que coinciden con las bandas características de flavonoides, flavonas, isoflavonas, alcaloides entre otros.

Por esta razón se analizaron diferentes concentraciones de acetato de etilo (Figura 21.c) probando al 10 %, 50 % y 100 % en el primer caso se observa una sola banda en el extremo superior bien definida y sin barridos mientras que con la solución al 50 % se observan dos bandas la primera coincide con la obtenida anteriormente y la segunda banda muestra un barrido desde la salida del eluyente demostrando una gran familia de compuestos de polaridad y afinidad intermedia. En el tercer caso con una solución al 100 % solo se observa una marca que también presenta barrido pero más extenso que la anterior revelando más compuestos y una mayor afinidad entre ellos.

De esta manera se determina utilizar el hexano, el acetato de etilo y el etanol grado analítico para obtener las fracciones polares medianamente polares y no polares del extracto vegetal crudo.

Caracterización del Extracto Vegetal

En la figura 22 se muestra el cromatograma resultado del análisis del extracto vegetal medianamente polar. En este estudio se encontró la presencia de ácido hexadecanoico metil éster (ácido palmítico) y ácido octadecadienoico 9,16 metil éster (ácido linoleico) conocido como omega 6, compuestos ampliamente conocidos por su capacidad de capturar radicales libres causantes del estrés

oxidativo y actividades antiinflamatorias, antialérgicas, antitrombóticas, antimicrobianas y antineoplásicas (Kuskoski, 2005).

La presencia de los compuestos fenólicos como el 2,4 difenol 1,1 dimetil etil y 1,3 dioxolano 2 heptanonitrilo α -metil δ -oxo- 2 fenil (precursor del timol e intermediario del carvacrol y eugenol) sugieren la actividad bactericida de los extractos vegetales, la cual es favorecida por la naturaleza ácida de su grupo hidroxilo el cual forma un puente hidrogeno con un sitio activo enzimático. Indicando así que los extractos vegetales y aceites esenciales con fenol como componente principal expresan el más alto espectro de actividad en contra de los microorganismos (Yagi, 2002; Kalemba and Kunicka, 2003; Peng-Quiao, 2008).

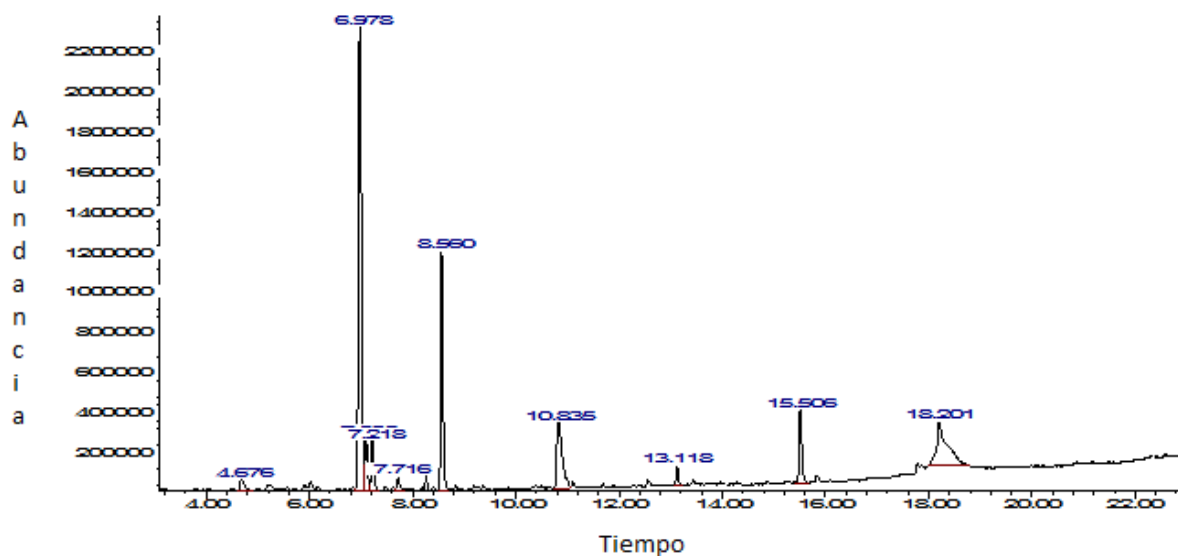


Figura 22 Cromatograma resultado del extracto vegetal no polar (solvente hexano)

Cuadro 18 Compuestos obtenidos del extracto vegetal de *Lilium L/A "Indian summer"* por tiempos de retención

Tiempo de retención	Compuesto	Tiempo de retención	Compuesto
4.676	Valeric acid, 4-tridecyl ester	8.56	1,3-Dioxolane-2-heptanenitrile, α -methyl- δ -oxo-2-phenyl-
6.978	Benzaldehyde, 3,4-dimethyl-	10.835	Phenol, 2,4-bis(1,1-dimethylethyl)-
7.098	Bicyclo[3.1.1]hept-3-en-2-one, 4,6,6-trimethyl-	13.118	Methyl 12-methyl-tridecanoate
7.218	Bicyclo[3.1.1]hept-3-en-2-one, 4,6,6-trimethyl-	15.506	Hexadecanoic acid, methyl ester
7.716	2-Cyclohexen-1-one, 3-methyl-6-(1-methylethenyl)-, (S)-	18.201	16-Octadecenoic acid, methyl ester

La acción antimicrobiana de los componentes de los extractos vegetales se debe al carácter lipofílico de su esqueleto de hidrocarburos y principalmente al carácter hidrofílico de sus grupos funcionales. La actividad de los componentes de los extractos acuosos en orden decreciente va desde los fenoles > aldehídos > cetonas > alcoholes > éteres > hidrocarburos (Kalemba y Kunicka, 2003).

En el caso de las hojas, los tallos y las flores de la especie asiática del genero *Lilium*, se caracterizan por un efecto altamente antioxidante debido a su contenido de ácidos fenólicos y flavonoides. Estos tejidos tienen actividades altamente antisépticas y antimicrobianas debido a su contenido de carvacrol, timol, gama terpenos y paracimeno (Wogiatzi, 2009).

Bioensayos de inhibición

En el cuadro 19 se presenta un resumen del análisis de varianza realizado a los datos obtenidos de las diferentes horas de propagación de los hongos en los diversos medios adicionados con el extracto vegetal correspondiente.

Cuadro 19 Análisis de varianza simultaneo de *A. niger*, *F. oxysporum*, *P. janthinellum* y *R. solani* a diferentes tiempos de crecimiento

VARIABLE	CM	Fc	Pr>F	CV
PDA				
48	0.0280	5.08	0.0363	10.5764
96	0.1862	8.84	0.0097	8.2192
144	0.7188	13.09	0.0035	10.2062
192	0.4882	43.3	0.0001	6.3046
240	1.2715	32.39	0.0003	8.2149
288	9.4996	9.11	0.009	19.4034
EVC				
48	1.1350	6.39	0.0215	20.5370
96	2.1263	4.73	0.0425	15.4313
144	2.5787	16.59	0.0019	11.8119
192	4.6360	28.39	0.0004	13.2494
240	3.9970	63.23	0.00008	10.4477
288	4.3147	84.29	0.00010	10.0049
EVP				
48	0.1792	46.62	0.0001	10.7477
96	2.1818	2.6	0.1382	16.0190+
144	3.0542	2.52	0.146	13.4567+
192	3.6663	7.31	0.0156	11.6029
240	6.9927	9.05	0.0092	13.4201
288	6.3784	15.58	0.0022	11.7474
EMP				
48	0.2183	4.28	0.0527	37.6936+
96	0.3286	1.55	0.3037	13.62061+
144	0.8517	5.24	0.034Cm	12.9463
192	0.6853	38.41	0.0002	6.9591
240	1.5469	29.56	0.0004	7.6982
288	2.2378	24.92	0.0006	7.7981
ENP				
48	0.2270	12.15	0.0043	15.2461
96	0.9744	6.33	0.0219	14.1861
144	0.7444	15.3	0.0023	9.0817
192	0.4015	63.61	0.00008	5.2392
240	2.4900	21.88	0.0009	10.3474
288	1.5282	63.45	0.000086	7.0598

CM: cuadrado medio; Fc: F calculada; CV: Coeficiente de Variación; +: No Significativo; $Pr \leq 0.05$ =; $Pr \geq 0.01$; PDA: Agar Papa Dextrosa; EVC: Extracto Vegetal Crudo; EVP: Extracto Vegetal Polar; EMP: Extracto Medianamente Polar; ENP: Extracto No Polar.

Donde se observa que a las 48 h hubo efecto significativo para los tratamientos PDA (agar papa dextrosa), EVC (extracto vegetal crudo), EVP (extracto vegetal polar) y ENP (extracto no polar). Mientras que a las 96 h se presentó efecto significativo en PDA, EVC y ENP; así mismo a las 144 h hubo efecto significativo en PDA, EVC, EMP y ENP. Sin embargo a las 192 h, 240 h y 288 h todos los tratamientos presentaron efectos significativos.

En la prueba de medias realizadas a los datos obtenidos (cuadro 20) se puede observar que a las 48 h en medio adicionado con EMP no existen diferencias significativas de crecimiento entre los tratamientos. En la variable ENP se observa que el T (*Fusarium*) es estadísticamente diferente y superior a T (*Aspergillus*), T (*Penicillium*) y T (*Rhizoctonia*) con 45 %, 55 % y 46 % respectivamente. En cuanto a la variable EVP observamos que el T (*Aspergillus*) es estadísticamente diferente y superior a T (*Fusarium*), T (*Penicillium*) y T (*Rhizoctonia*) con 65 %, 54 % y 59 %, respectivamente.

Bajo condiciones óptimas en un crecimiento típico como lo muestra la variable PDA, el T (*Aspergillus*) es estadísticamente superior al T (*Fusarium*), T (*Penicillium*) y T (*Rhizoctonia*) en un 24 %, mientras que entre los últimos tres tratamientos no presentan diferencias significativas.

Cuadro 20 Comparación de medias del efecto de los diversos Medios + Extracto utilizados a las 48 h de crecimiento micelial.

TRATAMIENTO	PDA	EVC	EVP	EMP	ENP
48H					
ASPERGILLUS	1.9583 A	5.2500 AB	7.0850 A	1.1667 A	2.7083 B
FUSARIUM	1.5417 B	7.2083 A	2.5000 B	1.1250 A	4.9167 A
PENICILLIUM	1.5000 B	2.5417 B	3.2517 B	1.9583 A	2.2083 B
RHIZOCTONIA	1.3350 B	5.7500 A	2.9183 B	0.7083 A	2.6667 B

PDA: Agar Papa Dextrosa; EVC: Extracto Vegetal Crudo; EVP: Extracto Vegetal Polar; EMP: Extracto Medianamente Polar; ENP: Extracto No Polar.

En la prueba de medias realizada a los datos obtenidos a las 96 h mostradas en el cuadro 21, se muestra que en los medios adicionados con EVP y EMP no se

presentaron diferencias significativas, existiendo una relación estadística. En el caso del medio adicionado con ENP el T (*Fusarium*) es estadísticamente superior al T (*Aspergillus*) y T (*Rhizoctonia*) en un 25 % y 26 %, respectivamente, siendo el T (*Penicillium*) el que presento la diferencia estadística inferior. En cuanto al EVC el T (*Fusarium*) es estadísticamente superior al T (*Aspergillus*) y T (*Rhizoctonia*) en un 31 % y 33 %, respectivamente siendo el T (*Penicillium*) el que presento diferencia estadística inferior de 44 %.

En la variable PDA bajo condiciones óptimas y desarrollando crecimiento típico micelial, los T (*Fusarium*), T (*Penicillium*) y T (*Rhizoctonia*) son estadísticamente superiores al T (*Aspergillus*) en 29 %.

Cuadro 21 Comparación de medias del efecto de los diversos Medios + Extracto utilizados a las 96 h de crecimiento micelial.

TRATAMIENTO	PDA	EVC	EVP	EMP	ENP
96H					
ASPERGILLUS	4.0833 B	8.625 AB	11.042 A	4.7500 A	6.9167 AB
FUSARIUM	5.7500 A	12.547 A	8.668 A	4.1667 A	9.1667 A
PENICILLIUM	5.4583 A	7.000 B	7.210 A	4.1250 A	5.0000 B
RHIZOCTONIA	5.7083 A	9.627 AB	9.963 A	3.7917 A	6.7500 AB

PDA: Agar Papa Dextrosa; EVC: Extracto Vegetal Crudo; EVP: Extracto Vegetal Polar; EMP: Extracto Medianamente Polar; ENP: Extracto No Polar.

En la prueba de medias realizada a los datos obtenidos a las 144 h mostradas en el cuadro 22, se observa que el extracto EVP no presento diferencias estadísticas entre tratamientos. En el caso del extracto EMP el T (*Penicillium*) es estadísticamente superior al T (*Fusarium*) y T (*Rhizoctonia*) con 30 % y 34 % respectivamente. En cuanto al medio adicionado con ENP los T (*Aspergillus*), T (*Fusarium*) y T(*Rhizoctonia*) presentaron diferencia significativa estadística superior al T (*Penicillium*) en 39 % ($\alpha \leq 0.05$).

En el ensayo utilizando EVC presento efecto de tratamiento siendo el T (*Fusarium*) y el T (*Rhizoctonia*) los estadísticamente superiores a los T

(*Aspergillus*) y T (*Penicillium*) en 42 % y 43 % respectivamente. En la variable PDA, desarrollando el crecimiento típico de las cepas los T (*Fusarium*), T (*Penicillium*) y T (*Rhizoctonia*) son estadísticamente superiores a T (*Aspergillus*) en 40 %.

Cuadro 22 Comparación de medias del efecto de los diversos Medios + Extracto utilizados a las 144 h de crecimiento micelial.

TRATAMIENTO	PDA	EVC	EVP	EMP	ENP
144H					
ASPERGILLUS	5.1250 B	9.625 B	11.375 A	7.2917 AB	10.1250 A
FUSARIUM	8.6267 A	18.877 A	14.793 A	6.2640 B	11.9583 A
PENICILLIUM	10.3917 A	9.292 B	11.093 A	9.0000 A	6.0417 B
RHIZOCTONIA	9.0833 A	16.587 A	14.687 A	5.9583 B	9.8750 A

PDA: Agar Papa Dextrosa; EVC: Extracto Vegetal Crudo; EVP: Extracto Vegetal Polar; EMP: Extracto Medianamente Polar; ENP: Extracto No Polar.

En la comparación de medias realizadas a los datos obtenidos a las 192 h de crecimiento micelial mostradas en el cuadro 23, el medio de cultivo adicionado con EVC presentaron diferencia estadística los T (*Fusarium*) y T (*Rhizoctonia*) siendo estadísticamente superior al T (*Aspergillus*) y al T (*Penicillium*) en 61 % y 63%, respectivamente. En cuanto al medio adicionado con EVP el T (*Fusarium*), T (*Rhizoctonia*) y T (*Penicillium*) son estadísticamente superiores a T (*Aspergillus*) en 38 %. En el medio adicionado con EMP el T (*Aspergillus*) y T (*Penicillium*) son estadísticamente superiores a los T (*Fusarium*) y T (*Rhizoctonia*) en 39 % y 43 %. Utilizando el medio adicionado con ENP el T (*Fusarium*) es estadísticamente superior al T (*Aspergillus*) y al T (*Rhizoctonia*) en 16 %, mientras que el T (*Penicillium*) presenta diferencia estadística inferior a los tratamientos anteriores en 44 %. En el ensayo testigo presentando crecimiento típico micelial en medio PDA los T (*Fusarium*), T (*Penicillium*) y T (*Rhizoctonia*) no presentaron diferencias estadísticas entre ellos y siendo superior al T (*Aspergillus*) en 49 %.

Cuadro 23 Comparación de medias del efecto de los diversos Medios + Extracto utilizados a las 192 h de crecimiento micelial.

TRATAMIENTO	PDA	EVC	EVP	EMP	ENP
192H					
ASPERGILLUS	6.0850 B	9.043 B	11.333 B	14.8750 A	12.4583 B
FUSARIUM	11.9500 A	23.667 A	18.283 A	9.0417 B	15.8333 A
PENICILLIUM	13.6267 A	8.667 B	16.210 AB	15.1667 A	6.9167 C
RHIZOCTONIA	12.6667 A	23.627 A	20.183 A	8.5000 B	13.1667 B

PDA: Agar Papa Dextrosa; EVC: Extracto Vegetal Crudo; EVP: Extracto Vegetal Polar; EMP: Extracto Medianamente Polar; ENP: Extracto No Polar.

En la comparación de medias realizadas a los datos obtenidos a las 240 h de crecimiento fúngico mostradas en el cuadro 24. El medio adicionado con EVC presentaron efectos por tratamiento en el caso de T (*Fusarium*) y T (*Rhizoctonia*) presentan diferencia estadística superior a T (*Aspergillus*) y T (*Penicillium*) en 67 % y 70 %, respectivamente.

En presencia del extracto EVP los tratamientos T (*Fusarium*), T (*Penicillium*) y T (*Rhizoctonia*) no presentaron diferencia estadística siendo superiores al T (*Aspergillus*) en 42 %. Utilizando el medio adicionado con EMP el T (*Penicillium*) es estadísticamente superior a T (*Aspergillus*) en 20 %, mientras que los T (*Fusarium*) y T (*Rhizoctonia*) son los estadísticamente inferiores en 30 % y 34 %, respectivamente. En cuanto al medio adicionado con ENP los T (*Aspergillus*), T (*Fusarium*) y T (*Rhizoctonia*) son estadísticamente similares y superiores al T (*Penicillium*) en 56 %. En el ensayo testigo presentando crecimiento típico micelial en PDA los T (*Fusarium*), T (*Penicillium*) y T (*Rhizoctonia*) son estadísticamente similares y superiores al T (*Aspergillus*) en 60 %.

Cuadro 24 Comparación de medias del efecto de los diversos Medios + Extracto utilizados a las 240 h de crecimiento micelial.

TRATAMIENTO	PDA	EVC	EVP	EMP	ENP
240H					
ASPERGILLUS	6.5850 B	9.333 B	11.475 B	17.833 B	16.792 A
FUSARIUM	16.5100 A	28.167 A	20.117 A	12.500 C	19.583 A
PENICILLIUM	15.5600 A	8.500B	24.600 A	22.458 A	7.417 B
RHIZOCTONIA	16.2500 A	30.543 A	22.627 A	11.833 C	17.208 A

PDA: Agar Papa Dextrosa; EVC: Extracto Vegetal Crudo; EVP: Extracto Vegetal Polar; EMP: Extracto Medianamente Polar; ENP Extracto No Polar.

En la comparación de medias realizada los datos obtenidos a las 288 h de crecimiento fúngico mostradas en el cuadro 25, se puede observar que en presencia de EVC los T (*Fusarium*) y T (*Rhizoctonia*) son estadísticamente superiores al T (*Aspergillus*) y al T (*Penicillium*) en 71 % y 75 % respectivamente.

En presencia del extracto EVP el T (*Penicillium*) presento diferencia estadística superior al T (*Fusarium*) y al T (*Rhizoctonia*) en 27 % y 17 %, respectivamente. Mientras que el T (*Aspergillus*) presento la diferencia estadística inferior en 45 %. Utilizando el medio adicionado con EMP el T (*Penicillium*) presento diferencia estadística superior al T (*Aspergillus*) en 21 %. Por otra parte los T (*Fusarium*) y T (*Rhizoctonia*) son estadísticamente similares e inferiores al T (*Aspergillus*) y T (*Rhizoctonia*) en 25 % y 31 %, respectivamente.

En cuanto al medio adicionado con ENP el T (*Fusarium*) es estadísticamente diferente y superior al T (*Aspergillus*) y T (*Rhizoctonia*) en 18 % y 15 %. Mientras que el T (*Penicillium*) presento diferencia estadísticamente inferior con los demás tratamientos en 66 %. En el ensayo testigo presentando crecimiento micelial típico en medio PDA los T (*Fusarium*), T (*Penicillium*) y T (*Rhizoctonia*) son similares estadísticamente y superiores al T (*Aspergillus*) en 69 %.

Cuadro 25 Comparación de medias del efecto de los diversos Medios + Extracto utilizados a las 288 h de crecimiento micelial.

TRATAMIENTO	PDA	EVC	EVP	EMP	ENP
288H					
ASPERGILLUS	6.185 B	9.167 B	11.625 C	20.733 B	19.375 B
FUSARIUM	21.560 A	31.793 A	21.127 B	15.458 C	23.667 A
PENICILLIUM	15.950 A	7.833 B	29.127 A	26.292 A	6.917 C
RHIZOCTONIA	19.843 A	34.253 A	24.117 AB	14.250 C	20.083 B

PDA: Agar Papa Dextrosa; EVC: Extracto Vegetal Crudo; EVP: Extracto Vegetal Polar; EMP: Extracto Medianamente Polar; ENP: Extracto No Polar.

Bakkali *et al.* (2008) menciona que la actividad antifúngica de los aceites y extractos naturales se debe gracias a su contenido de terpenos y terpenoides, derivados fenólicos, componentes aromáticos y compuestos alifáticos que afectan por citotoxicidad a la membrana celular y otros organelos como las mitocondrias. (Kumar, 2007, Barrera-Necha, 2009, Tripti y Chittenden, 2010, Combrinck, 2011).

CONCLUSIONES

Se aislaron 46 microorganismos, de los cuales el 63 % de los mismos fueron recurrentes confirmando la microbiota de suelos de Puebla, Michoacán, Jalisco y Estado de México.

Se identificó molecularmente cepas silvestres de *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium citrinum* y *Rhizoctonia solani*, viables y cultivables con patogenicidad para infestar tejido vegetal.

La mayor concentración de compuestos de familias de grupos funcionales diversos se obtuvo en el extracto vegetal acuoso, teniendo como disolvente agua destilada

Del análisis fraccionado del extracto vegetal acuoso crudo; el ENP (extracto no polar) presentó la mayor inhibición en el crecimiento micelial en *F. oxysporum* del 23 % y 18 % en *R. solani*.

El EMP (extracto medianamente polar) presentó la mayor inhibición del crecimiento micelial del 27.5 % en *P. citrinum*.

Ninguna fracción del extracto vegetal acuoso inhibió o disminuyó el crecimiento micelial de *A. niger*.

Se identificó en el extracto vegetal acuoso, ácido valérico tridecil ester, dimetil benzaldehído, metil tridecanoato y ácido octadecanoico metil ester; compuestos que se les atribuye actividad antibiótica.

BIBLIOGRAFÍA

Agrios, G. (1995). Fitopatología. Trad. M. Guzmán Ortiz. Ed. Limusa 756 p.

Araujo, D., Rodríguez, D., Sanabria, M.E. (2008). Respuesta del hongo *Fusarium oxysporum f sp. cubense* causante del mal de Panamá, en algunos extractos vegetales y funguicidas. Fitopatología venezolana 21(1):2-8. Consultado el 10 de junio del 2014. Disponible en <http://www.sovefit.com.ve/boletines/21-1/documento1.pdf>.

Ardila, M.I., Vargas, A.F., Pérez, J.E., Mejía, L.F. (2009). Ensayo preliminar de la actividad antibacteriana de extractos de *Allium sativum*, *Coriandrum sativum*, *Eugenia caryophyllata*, *Origanum vulgare*, *Rosmarinus officinalis* y *Thymus vulgaris* frente a *Clostridium perfringens*. Biosalud. 8 (1):47-57.

Arias-Cifuentes, E. L., Piñeros, P. A. (2008). Aislamiento e identificación de hongos filamentosos de muestras de suelo de los Paramos de Guasca y Cruz Verde. Departamento de microbiología industrial. Facultad de ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá. Colombia. 72 p.

Auzaque-Rodriguez, O., Balaguera-Lopéz, H.E., Alvarez-Herrera, J.G., Fischer, G. (2009). Effect of reused bulb vernalization on Lily flower quality (*Lilium* sp.) in the Bogota Plateau. Agronomía Colombiana. 27(1):65-71.

Ayala, J., Castillo, M., Valdez, A., Colinas, M.T., Pineda, J., Avitia, E. (2008). Effect of calcium, boron and molybdenum on plant growth and bract pigmentation in poinsettia. Revista Fitotecnia Mexicana. 31(2):165-172

Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils. Review. Food and Chemical Technology. 46(2):446-475.

Bañon, S., Cifuentes, D., Fernández, J.A., González, A. (1993). Gerbera, *Lilium*, tulipán y rosa. Ed. Mundi-Prensa. Madrid 250 p.

Barrera-Necha, L.L., Garduño-Pizaña, C., García-Barrera, L.J. (2009). In vitro antifungal activity of essential oils and their compounds on mycelia growth of *Fusarium oxysporum f. sp. Gladioli* (Massey) Snyder and Hansen". Plant Pathology Journal. 8:17-21.

Barnett, H.L., Hunter, B.B. (1998). Illustrated genera imperfect fungi. 4 ed. The American phythopatological. Society Minnesota, USA. 218 p.

Boyd, D.W., Alverson, D.R. (2000). Repellency effects of garlic extracts on two spotted spider mite, *Tetranychus urticae* Koch. Journal Entomology Science. 35(1):86-90.

Buschman, J.C., Soriano-García, J.M. (2004) Cultivo de *Lilium* de calidad. Horticultura internacional, producción de ornamentales, cultivo y calidad. 44(1)34-37.

Cañedo, V., Ames, T. (2004). Manual para el manejo de hongos entomopatógenos. Centro internacional de la papa. Lima Perú, 62 p.

Cabrera M., G., Álvarez R.,E., Sosa de Castro, N.T. (2005). *Botrytis elliptica* causa de tizón en *Lilium* sp en cultivos de Corriente, Argentina. Universidad Nacional del Nordeste. Comunicación científica y tecnológica. 56 p.

CESAVEM. Comité estatal de sanidad vegetal del estado de México. (2014). Manejo fitosanitario de ornamentales. <http://www.cesavem.org/> (consultado el 17 de junio del 2014)

Chauhan, S.K., Saaltink, G.J. (1969). A *Penicillium* attack on hyacinth bulbs as affected by temperature and humidity. Netherlands Journal of Plant Pathology. 75(1):197-204.

Chávez, A. R., Aquino, A. S. (2012). Control de los hongos del suelo *Rhizoctonia* sp., *Fusarium* sp. y *Sclerotium* sp. con extractos vegetales. Investigación Agraria. 14(1):17-23.

Combrink, S., Regnier, T., Kamatou, G.P.P. (2011). In vitro activity of eighteen essential oils and some major components against common postharvest fungal pathogens of fruit. *Industrial Crops and Products*. 33(2):344-349.

Comerio, R.M. (2000). Nefrotóxicas y especies nefrotóxicas del género *Penicillium*. *Revista iberoamericana de micología*. 17(1):82-89.

Conway, W., Gross, K.C., Boyer, C.D. (1988). Inhibition of *Penicillium Expansum* polygalacturonase activity by increased apple cell wall calcium. *Phytopathology* 78(3):1052-1055.

Correa, B. M. C. (2003) "Caracterización de los estados de desarrollo y determinación de las curvas de absorción de nutrientes en *Lilium sp.* cvs. "Miami", "Navona" y "Fangio" para flor de corte". Tesis para obtener el grado de magister en ciencias vegetales. Pontificia Universidad Católica de Chile. 138 p.

Cowan, M. M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews* 12(4):564-582.

Crous, P.W., Gams, W., Stalpers, J.A., Robert, V., Stegehuis, G. (2004). Mycobank: an online initiative to launch mycology into the 21st century. *Studies in mycology*. 50(1):19-22. <http://www.mycobank.org> (consultado en 18 junio del 2014)

De Hertogh, A., Le Nard., M. (1993) *Physiology of flowering bulbs*. Amsterdam: El Sevier. 24(2):249-261

Dhiman, A., Nanda, A., Ahmada, S., Narasimhan, B. (2011). In vitro antimicrobial activity of methanolic leaf extract of *Psidium guajava* L. *Journal of Pharmacy and Bioallied Science*. 3(2):226-229.

Dreistadt, S.H. (2001). Integrated pest management for floriculture and nurseries. *UCANR* 34(1):2-17.

Ellis, D. (2013). Mycology online: *Penicillium* spp. "School of molecular and biomedical science" the university of Adelaide, Australia. <http://www.mycology.adelaide.edu.au/fungaldescriptions/Hyphomycetes%28hyaline%29/Penicillium/> (consultado el 18 de junio del 2014).

Facchinetti, C., Marinangeli, P. (2008). Avances de la producción nacional de bulbos de *Lilium*. Publicación del departamento de agronomía de la universidad del sur. Chile. Agrouns. 9(1):39-48

Fernandez-Valiela, M.V. (1978). Introducción a la fitopatología. Vol. 3. Hongos colección científica del INTA. 3 ed. Buenos Aires. Argentina. 779 p.

Franco, O., Jiménez, J. H., Tobar, J. R., Pérez, D. J. (2007). Efecto de la aplicación pre-cosecha de calcio y putrescina en el contenido de clorofila foliar durante la floración de *Lilium* ssp. 53ava Reunión anual del I.T.S.H. Morelia, Michoacán. 185 p.

French, E.R., Hebert, T.T. (1980). Métodos de investigación fitopatológica. San José CR, Instituto interamericano de ciencias agrícolas. 289 p.

Garcés de Granada, E., Orozco de Amequita, M., Bautista G. (2001). *Fusarium oxysporum* el hongo que nos falta conocer. Acta biológica Colombiana. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia. 6(1):39-48.

Garduño-Pizaña, C., Barrera-Necha, L., Rios-Gomez, M.Y. (2010). Evaluation of the fungicidal activity of leaves powders and extracts of fifteen Mexican plants against *Fusarium oxysporum* f. sp *gladioli* (Massey) Snyder and Hansen. Plant pathology Journal. 9(1):79-87.

Grabowski, C. (2005). Eficiencia de sustratos sobre la esporulación de sustratos de hongos entomopatogenos *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* y *paecilomyces* sp. Tesis Ing. Agr. San Lorenzo, PY, FCA, UNA 45 p.

Hao, W., Zhong, G., Hu, M., Luo, J., Weng, Q., Rizwang-ul-Haq, M. (2010). Control of citrus postharvest green and blue mold and sour rot by tea saponin combined with imazalil and prochloraz. *Postharvest Biology and Technology*. (1)6:39-43.

Hartmann, H. T., Kester, D. E. (1998). *Propagación de plantas: principios y prácticas*. Ed. CECSA. México. 225 p.

Hernández, A. N., Bautista, S., Velásquez, M. G. (2007). Prospectiva de extractos vegetales para controlar enfermedades post-cosecha horti-frutícolas. *Revista Fitotecnia Mexicana* 30(2):118-125. Consultado el 10 de junio del 2014. Disponible en <http://redalyc.uaemex.mx/redalyc/pdf/610/61030202.pdf>

Hernández-Anguiano, A.M., Juárez-López, G., Fucikovsky-Zak, L., Zavaleta-Mejía, E., González-Hernández, V.A. (2006). Impacto del almacenamiento de la brotación de bulbos de ajo y especies patogénicas de *Penicillium* y *Erwinia* asociadas. *Revista Fitotecnia Mexicana* 29(1):283-290.

Herreros, L. (1983) *Cultivo de Liliun*". Ministerio de agricultura, pesca y alimentación. 48 p.

Hincapie, C.A., López, G.E., Torres, R. (2007). Garlic bulbs extracts comparision and characterization and its effects over mortality and repelency en *Tetranychus urticae* Koch. Grupo de investigación agroindustrial. Facultad de ingeniería agroindustrial. Universidad Pontificia Boliviana.14 p.

Kalembe, D., Kunicka, A. (2003). Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry*. 10(10):813-829.

Kimbaris, A. C., Siatis, N.G., Deferera, D. J., Tarantilis, P. A., Polissiou, M. G. (2006). Comparison of distillation and ultrasound-assisted extraction methods for the isolation of sensitive aroma compounds from garlic. *Ultrasonics. Sonochemistry* 13(1):54-60.

Kuklinski, C. (1993). *Farmacognosia*. Barcelona España, Editorial Omega. 79 p.

Kumar, R., Mishra, A.K., Dubey, N.K., Tripathi, Y.B. (2007). Evaluation of *Chenopodium ambrosioides* oils as a potential source of antifungal, antiaflatoxic and antioxidant activity. *International Journal of Food Microbiology*. 115(1):159-164.

Kuskoski, E. M. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar la capacidad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciencia y tecnología de alimentos*. 25(4):726-732.

Lado, J., Luque, E., Blanco, O., Perez-Faggiani, E. (2011). Evaluación de alternativas para el control post-cosecha de aislamientos de *Penicillium digitatum* resistentes a imazalil. *Agrociencia Uruguay*. 15(1):55-63.

Luque-Ortega, J. R., Martínez, S. (2004). Fungus-elicited metabolites from plants as an enriched source for new leishmanicidal agents: antifungal phenyl-phenalenone phytoalexins from the banana plant (*Musa acuminata*) target mitochondria of *Leishmania donovani* promastigotes. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 48(5):1534-1540.

Martínez, H.Y., Hernández, S., Reyes, C.A., Vázquez, G. (2013). El género *Aspergillus* y sus micotoxinas en maíz en México: problemática y perspectivas. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 31(2):126-146.

Mc Rae, A. E. (1998) *Lilies: A guide for growers and collectors*. Timbers press, Portland, Oregon. 215 p.

Monzón, A. (2001). Producción uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua. *Manejo integrado de plagas*. 63(1): 95-103

Ohyama, T., Ikarashi, T., Baba, A. (1988). Effect of cold storage treatment for forcing bulbs on the C and N metabolism of tulip plants. *Soil Science and Plant Nutrition* 34(2):519-533.

Ortega-Blu, R., Correa-Benguria, M., Olate-Muñoz, E. (2006) Determinación de las curvas de acumulación de nutrientes en tres cultivares de *Lilium* ssp. *Agrociencia* 40(1):77-88.

Overy, D.P., Frisvad, J.C., Steinmeier, U., Thrane, U. (2005). Clarification of the agents causing blue mold storage rot upon various flower and vegetable bulbs: implications for mycotoxin contamination. *Postharvest Biology and Technology*. 35(2):217-221.

Pitt, J.L., Hocking, A.D. (2009). *Fungi and Food Spoilage*. Third Edition. Springer. pp. 169-173.

Peng-Quiao, M. O., Yu-Yuan, H., Xiao-Quing, Z., Guang-Lin, L., Zheng-Wen, L., Bao-Xuan, N. (2008). Establishment of *cycas micholitzii* ISSR-PCR optimal conditions with ortogonal optimization method. *Bolletín of Botanical Research*. 28(3):304-309.

Pérez C., N. (2004). Manejo ecológico de plagas. Centro de estudios de desarrollo agrario y rural. CEDAR 296 p.

Rees, A. R. (1992). *Ornamental bulbs, Corms and tubers* C.A.B. International. West Sussex UK. 63 p.

Reinoso, L., Marinangeli, P., Irigoyen, J., Curvetto, N. (2006) Evaluación de Herbicidas pre y post emergentes en *Lilium*. Departamento de agronomía Universidad Nacional del sur. 124 p.

Ram, R., Manuja, S., Dhyani, D., Mukherjee, D. (2004). Evaluations of fortified fungicide solutions in managing corm rot disease of gladiolus caused by *Fusarium oxysporum*. *Crop Protection*. 23(3): 783-788.

Ramos-García, M., Ortega-Centeno, S., Hernández-Lauzardo, A.N., Alia-Tejacal, I., Bosquez-Molina, E., Bautista-Baños, S. (2009). Response of Gladiolus (*Gladiolus spp.*) plants after exposure corms to chitosan and hot water treatments. *Scientia Horticulturae* 121(2):480-484.

Tanaka, H., Sato, M. (2002). Antibacterial activity of isoflavonoids isolated from *Erythrina variegata* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Letters in Applied Microbiology*. 35(6):494-498.

Traub, A.J., Vicuña, B. (2012). Flores de corte: nuevas oportunidades. ODEPA. Chile. 39 p.

Samson, R.A., Seifert, K.A., Kuijpers, A.F.A., Houbraken, J.A., Frisvad, J.C. (2004). Phylogenetic analysis of *Penicillium* using partial β -tubulin sequence. *Studies in Mycology*. 49(1):175-200.

Sarubbi, H.J. (2002). Control alternativo de *Rhizoctonia solani* Kuhn en petunia (*Petunia x híbrida*). Tesis Maestría San Lorenzo, PY, FCA, UNA. 107 p.

Sharma, N., Tripathi, A. (2008). Integrated management of postharvest *Fusarium* rot of gladiolus corms using hot water, UV-C and *Hyptis suaveolens* L. Poit. Essential oil. *Postharvest Biology and Technology*. 47(1):246-254.

Simmonds, J.A., Cumming, B. (1976) Propagation of *Lilium* hybrids I. dependence of bulblet production on time of scale removal and growth substances. *Scientia Horticulturae* 5(1):77-78.

Tripti, S., Chittenden, C. (2010). Efficacy of essential oil extracts in inhibiting mould growth on panel products. *Building and Environment*. 45(6): 2336-2342.

Viveros, J., Castaño, J. (2006). Evaluación in vitro de extractos vegetales sobre *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. *Agronomía UCALDAS*. Consultado el 10 de junio del 2014. Disponible en http://agronomia.ucaldas.edu.co/downloads/agronomia14-1_5.pdf

Wogiatzi, N.E. (2009). Chemical composition and microbial effects of greek *Origanum* species essential oil. *Biotechnol & Biotechnol*. 21(1):13-22.

Wang, X., Wu, G.Q. (2014). A new steroidal glycoside and potential anticancer antitoxic activity of compounds isolated from the bulbs of *Lilium callosum*. Journal of chemical research. 38(2):577-579.

Wong, P. Y. Y. (2006). Studies on the dual antioxidant and antibacterial properties of parsley (*Petroselinum crispum*) and cilantro (*Coriandrum sativum*) extracts. Food Chemistry. 97(3):505-515.

Yagi, F., Iwaya, T., Haraguchi, T., Goldstein, I. J. (2002). The lectin from leaves of Japanese cycad. *Cycas revolute* Thunb. (Gymnosperm) is a member of the jacalin- related family. European Journal Biochemistry. 269(1):4335-4341.

Zheng, G., Kenney, P.M., Luke, K.T. (1992). Miristicin: a potential cancer chemopreventive agent from parsley leaf oil. J Agriculture Food Chemistry. 40(1):107-110.