

Identification of daylily rust (*Puccinia hemerocallidis*) and characterization of resistance of five genotypes

Identificación de la roya del lirio de día (*Puccinia hemerocallidis*) y caracterización de la resistencia de cinco genotipos

Maricarmen Sandoval-Sánchez^{1*}, Cristian Nava-Díaz¹, Jorge Pérez-Cárca², José Sergio Sandoval-Islas¹, ¹Programa de Fitosanidad-Fitopatología, ²Recursos Genéticos y Productividad, Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Km 36.5 Carretera México-Texcoco, Montecillo, Texcoco, Estado de México, CP 56230, México. *Autor para correspondencia: sandoval.maricarmen@colpos.mx

Recibido: 20 de Octubre, 2019.

Aceptado: 23 de Noviembre, 2019.

Sandoval-Sánchez M, Nava-Díaz C, Pérez-Cárca J and Sandoval-Islas JS. 2020. Identification of daylily rust (*Puccinia hemerocallidis*) and characterization of resistance of five genotypes. Mexican Journal of Phytopathology 38(1): 25-39.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1910-3

Primera publicación DOI: 02 de Diciembre, 2019.

First DOI publication: December 02, 2019.

Resumen. El lirio de día (*Hemerocallis* spp.) es atacado por el hongo *Puccinia hemerocallidis*. En México no existen reportes de esta enfermedad o de material vegetal resistente al patógeno. Desde 2008, se han observado síntomas de roya sobre hojas de *H. lilioasphodelus* en el jardín de una casa particular en el municipio de Chicoloapan de Juárez, Estado de México y en un vivero de Fortín de las Flores, Veracruz. Los objetivos de esta investigación fueron identificar morfológica y molecularmente los aislamientos de ambas localidades y caracterizar la resistencia a esta enfermedad macroscópicamente en

Abstract. Daylily (*Hemerocallis* spp.) is attacked by the fungus *Puccinia hemerocallidis*. In Mexico there are no reports of this disease nor of plant material resistant to the pathogen. Since 2008, symptoms of rust on leaves of *H. lilioasphodelus* have been observed in the garden of a private house in the municipality of Chicoloapan de Juárez, State of Mexico, and in a nursery in Fortín de las Flores, Veracruz. The objectives of this investigation were to identify morphologically and molecularly the isolates of both locations and characterize the resistance to this disease macroscopically in five genotypes of *Hemerocallis* spp. under greenhouse conditions. According to the morphological characteristics of uredospores, teliospores and molecular studies, the fungus was identified as *P. hemerocallidis*. The genotypes evaluated were grouped into three resistance categories: *H. lilioasphodelus* behaved susceptible; ‘Radiant Greetings’ and ‘Stella d’Oro’ cultivars of the *H. hybrida* species were classified as moderately resistant; the cultivar ‘Cherry Wine’ and the species *H. fulva* were grouped as resistant;

cinco genotipos de *Hemerocallis* spp., bajo condiciones de invernadero. De acuerdo con las características morfológicas de uredosporas, teliosporas y estudios moleculares, el hongo se identificó como *P. hemerocallidis*. Los genotipos evaluados se agruparon en tres categorías de resistencia: *H. lilioasphodelus* se comportó susceptible; los cultivares ‘Radiant Greetings’ y ‘Stella d’Oro’ de la especie *H. hybrida* se clasificaron como moderadamente resistentes; el cultivar ‘Cherry Wine’ y la especie *H. fulva* se agruparon como resistentes; esta última presenta una probable resistencia parcial *sensu* Parlevliet. La presencia de *P. hemerocallidis* y la resistencia de genotipos de lirio de día se reporta por primera vez en México.

Palabras clave: cultivares, *Hemerocallis lilioasphodelus*, *Hemerocallis fulva*, resistencia de hipersensibilidad, resistencia parcial.

El lirio de día (*Hemerocallis* spp.) es una de las plantas económicamente importante en EE. UU. y China por su uso ornamental y alimenticio, respectivamente. Es perenne y muy popular, debido a su periodo largo de floración, disponible en varios colores, formas y tamaños; capaz de sobrevivir con muy poco cuidado en climas diferentes, y presenta resistencia a la sequía, plagas y enfermedades (Munson, 1989; Grosvenor, 1999). En México, se considera una especie ornamental menor, pero en los últimos años ha adquirido una mayor importancia en jardinería de casas, hoteles, parques, carreteras, etc.

Para esta especie existen problemas fitopatológicos importantes que limitan su producción. En el año 2000 se reportó por primera vez en Norteamérica, en el estado de Georgia, EE. UU., una enfermedad devastadora en el cultivar ‘Pardon Me’, que por sus síntomas y signos, correspondió al grupo de

the latter presents a probable partial resistance *sensu* Parlevliet. The presence of *P. hemerocallidis* and the resistance of daylily genotypes are reported for the first time in Mexico.

Keywords: cultivars, *Hemerocallis lilioasphodelus*, *Hemerocallis fulva*, hypersensitivity resistance, partial resistance.

Daylily (*Hemerocallis* spp.) is one of the economically important plants in the United States and China because of its ornamental and food use, respectively. It is a perennial and very popular plant because of its long flowering period, availability in several colors, forms and sizes, ability to survive with very little care in different climates, and resistance to drought, pests and diseases (Munson, 1989; Grosvenor, 1999). In Mexico, daylily is considered a minor ornamental species but in the last years has become more important in home, hotels, parks and highways gardening, among others.

However, there are important phytopathological issues that limit daylily production. In 2000, a devastating disease was reported for the first time in the state of Georgia, United States, in the ‘Pardon Me’ cultivar, which, according to the symptoms, corresponded to the group of rusts (Williams-Woodward *et al.*, 2001). The fungus was identified as *Puccinia hemerocallidis*, a pathogen originally from Asia that has caused damage in Asia, mainly in China, Japan, Korea, Russia, Taiwan and Thailand (Smith, 2009). In 2001, the fungus was detected in another 20 states of the United States (Hernández *et al.*, 2002), and later also in Brazil (Carvalho *et al.*, 2001), Colombia (Pardo-Cardona, 2006), South Africa (Mostert *et al.*, 2008), Venezuela (Pardo-Cardona *et al.*, 2008), Canada, Panama and Australia (Smith,

las royas (Williams-Woodward *et al.*, 2001). Este hongo fue identificado como *Puccinia hemerocallidis*, patógeno de origen asiático que ha causado daños en Asia, principalmente en China, Japón, Corea, Rusia, Taiwán y Tailandia (Smith, 2009). En el 2001 fue reportado en otros 20 estados de EE. UU. (Hernández *et al.*, 2002) y después se confirmó su presencia en Brasil (Carvalho *et al.*, 2001), Colombia (Pardo-Cardona, 2006), Sudáfrica (Mostert *et al.*, 2008), Venezuela (Pardo-Cardona *et al.*, 2008), Canadá, Panamá y Australia (Smith, 2009) y Portugal (Silva *et al.*, 2016). En México, no existen reportes sobre su presencia pero se ha observado plantas sintomáticas desde 2008 en Aguascalientes, Estado de México, Morelos, Veracruz y Zacatecas. Actualmente, se desconoce cuál es el agente causal de la roya del lirio de día en México y qué material vegetal es resistente al patógeno. Los objetivos de esta investigación fueron: identificar el agente causal de la roya del lirio de día en el Estado de México y Veracruz, con base en características morfológicas y moleculares, y evaluar la resistencia de cinco genotipos de *Hemerocallis* spp. al agente causal de la roya bajo condiciones de invernadero.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal. Plantas adultas infectadas con roya y plantas con apariencia sana de *Hemerocallis lilioasphodelus* se recolectaron en un jardín particular del municipio de Chicoloapan de Juárez, Estado de México y en un vivero ubicado en el municipio Fortín de las Flores, Veracruz. Los cultivares ‘Radiant Greetings’, ‘Stella d’Oro’ y ‘Cherry Wine’ de la especie *H. hybrida*, así como la especie *H. fulva* se consiguieron en un jardín de la Ciudad de México, todos con apariencia sana.

Cada planta se sembró en una maceta con suelo pasteurizado. En una mesa se colocaron las plantas libres de roya y en otra las infectadas. Las plantas

(2009) and Portugal (Silva *et al.*, 2016). Although there are no reports on the pathogen in Mexico, plants showing symptoms have been observed since 2008 in Aguascalientes, the State of Mexico, Morelos, Veracruz and Zacatecas. The causal agent of daylily rust and what plant material is resistant to the pathogen are currently unknown in Mexico. Therefore, the objectives of this research were to identify the causal agent of daylily rust in the State of Mexico and Veracruz, based on morphological and molecular characteristics, and evaluate the resistance of five *Hemerocallis* spp. genotypes to the causal agent of rust under greenhouse conditions.

MATERIALS AND METHODS

Plant material. *Hemerocallis lilioasphodelus* adult plants infected with rust and plants with healthy appearance were collected in a private garden in the municipality of Chicoloapan de Juárez, State of Mexico, and in a greenhouse in the municipality of Fortín de las Flores, Veracruz. ‘Radiant Greetings,’ ‘Stella d’Oro’ and ‘Cherry Wine’ cultivars from the *H. hybrida* and *H. fulva* species were obtained from a garden in Mexico City, all of them with healthy appearance.

Each plant was sown in a pot containing pasteurized soil. The rust-free plants were placed on a table, and the infected plants on another table. The plants with healthy appearance were pruned to obtain new tissue, inoculate them and increase inoculum; then a resistance evaluation was performed. Irrigation was applied to each pot every other day using 200 mL of water. Each pot was fertilized with 2 g of Nitrofoska® Azul (12-12-17+Mg+S+ micronutrients) every 15 days.

Obtaining inoculum. The initial inoculum was 100 mg of *P. hemerocallidis* uredospores.

con apariencia sana se podaron para obtener tejido nuevo, inocularlas e incrementar el inóculo; posteriormente, se realizó la evaluación de la resistencia. El riego se hizo cada tercer día aplicando 200 mL de agua por maceta. Cada maceta se fertilizó con 2 g de Nitrofoska® Azul (12-12-17+Mg+S+ micro-nutrientes) cada 15 días.

Obtención de inóculo. El inóculo inicial fue 100 mg de uredosporas de *P. hemerocallidis*. Las esporas se recolectaron sacudiendo las hojas con esporulación sobre una lámina de papel aluminio de 20 x 20 cm. Los aislamientos se nombraron de acuerdo con el lugar de la recolección: RCH1, del municipio de Chicoloapan de Juárez, Estado de México; y RFOR2, del municipio de Fortín de las Flores, Veracruz.

Incremento de inóculo. Para evaluar la resistencia se incrementó el inóculo inicial de RCH1 y RFOR2. Se prepararon suspensiones de uredosporas de cada aislamiento a una concentración de $1 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ en aceite mineral Soltrol 170® y las suspensiones se asperjaron uniforme y separadamente sobre plantas del mismo genotipo de las cuales se obtuvieron las esporas. La aspersión se realizó con un atomizador a presión constante inyectada mediante una bomba de vacío en el invernadero de royas del Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT). Una vez asperjadas las plantas, se dejó evaporar el aceite y se colocaron durante 18 h en una cámara de incubación bajo oscuridad completa a 14 °C y 100% de humedad relativa, para lo cual se utilizó un nebulizador Micro-Jet ULV® modelo 7401, por 20 min. Después se trasladaron a un invernadero con temperatura media de 24 °C. Una vez que el hongo esporuló, se recolectaron las esporas y se conservaron en frascos sellados herméticamente a 5 °C.

Spores were collected by shaking the leaves with sporulation on a 20 x 20 cm foil sheet. The isolates were named according to the site where they were collected: RCH1, from the municipality of Chicoloapan de Juárez, State of Mexico, and RFOR2, from the municipality of Fortín de las Flores, Veracruz.

Inoculum increase. To evaluate the resistance, the initial inoculum of RCH1 and RFOR2 was increased. Uredospore suspensions of each isolate were prepared at a concentration of $1 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ in Soltrol 170® mineral oil, and then uniformly and separately sprayed on plants of the same genotype from which the spores were obtained. The plants were sprayed using a constant-pressure sprinkler injected through a vacuum pump in the rust greenhouse of the International Maize and Wheat Improvement Center (CIMMYT, for its acronym in Spanish). After spraying the plants with the suspension, the oil was left to evaporate and the plants were placed in an incubation chamber for 18 h under complete darkness at 14 °C and 100% relative humidity, for which a Micro-Jet ULV® model 7401 was used for 20 min. Then the plants were taken to a greenhouse with average temperature of 24 °C. When the fungus sporulated, spores were collected, placed in hermetically sealed jars and kept at 5 °C.

Morphological identification. The isolates were morphologically identified based on the form and size of the uredospores and teliospores obtained from cuts of uredia and telia from the collected material. The Cummins and Hiratsuka (1996) key for genera and sections was used in the case of genus, and the descriptions of Hiratsuka *et al.* (1992) and Hernández *et al.* (2002) for species.

Identificación morfológica. Los aislamientos se identificaron morfológicamente con base en la forma y dimensiones de uredosporas y teliosporas, obtenidas de cortes de uredias y telias del material recolectado. Se usó la clave de géneros y secciones de Cummins y Hiratsuka (1996) para el género, y las descripciones de Hiratsuka *et al.* (1992) y Hernández *et al.* (2002) para la especie.

Identificación molecular. El ADN de los dos aislamientos se extrajo con la metodología descrita por Ahrens y Seemüller (1992). La calidad del ADN se verificó mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1% (Ultrapure, Gibco, USA) y las bandas se visualizaron en un transiluminador (Gel Doc 2000, BIO RAD®, USA). La concentración de ADN se cuantificó con un espectrofotómetro Lambda BIO 10 (Perkin-Elmer®), diluciones con 20 ng se usaron para la amplificación de los espaciadores transcritos internos ITS1 e ITS2, y el gen 5.8S ribosomal, mediante PCR y la combinación de los iniciadores universales ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC) e ITS5 (5'-GGAAGTAAAGTCGTAACAAGG). El producto amplificado se purificó con el kit Wizard (Promega®, USA) y se secuenció con el ABI PRISM 3700 (Applied Biosystem®, USA). Las secuencias consenso se ensamblaron y editaron con la opción CAP (Contig Assembly Program) del Software BioEdit v7.0.9.1 (Hall, 1999) y se depositaron en el GenBank (NCBI, 2012).

Caracterización de la resistencia

Inoculación. Se condujeron dos experimentos; el primero en marzo del 2018 y el segundo en mayo del mismo año. Las hojas viejas de todos los genotipos se cortaron tres días antes de la inoculación para inocular sólo las hojas jóvenes, asperjándolas con una suspensión de uredosporas frescas de

Molecular identification. The isolates DNA was extracted using the methodology described by Ahrens and Seemüller (1992). The DNA quality was verified through horizontal electrophoresis in 1% agarose gel (Ultrapure, Gibco, USA) and the bands were visualized using a transilluminator (Gel Doc 2000, BIO RAD®, USA). The DNA concentration was quantified using a Lambda BIO 10 (Perkin-Elmer®) spectrophotometer, and dilutions with 20 ng were used to amplify the internal transcribed spacers (ITS1 and ITS2), and the 5.8S ribosomal gene using PCR and by combining ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC) and ITS5 (5'-GGAAGTAAAGTCGTAACAAGG) universal primers. The amplified product was purified using the Wizard kit (Promega® USA) and sequenced with ABI PRISM 3700 (Applied Biosystem®, USA). The consensus sequences were assembled and edited using the CAP option (Contig Assembly Program) of BioEdit v7.0.9.1 software (Hall, 1999) and deposited in the GenBank (NCBI, 2012).

Characterization of resistance

Inoculation. Two experiments were conducted: the first in March 2018, and the second in May 2018. The old leaves of all the genotypes were cut three days before inoculation in order to inoculate only young leaves by spraying them with a suspension of RCH1 and RFOR2 fresh uredospores at a concentration of 1×10^6 mL⁻¹. The uredospores were suspended in 96% ethanol (1 g L⁻¹). The plants were placed in an incubation chamber under the same conditions described for inoculum increase, and in both experiments the plants were kept in a greenhouse at 24 °C average temperature. The experiment unit consisted of one pot with one plant, and five replications for each genotype and for each fungus isolate.

RCH1 y RFOR2 a una concentración de 1×10^6 mL⁻¹. Las uredosporas se suspendieron en etanol al 96% (1 g L⁻¹). Después, las plantas se colocaron en una cámara de incubación bajo las mismas condiciones descritas en el incremento de inóculo y en ambos experimentos, las plantas se mantuvieron en un invernadero con temperatura media de 24 °C. La unidad experimental consistió de una maceta con una planta y se utilizaron cinco repeticiones para cada genotipo y para cada aislamiento del hongo.

Medición de la resistencia. Las variables que se evaluaron fueron el periodo de latencia (PL) (días desde la inoculación hasta la esporulación) y el tipo de infección (TI), que se refiere a la reacción del tejido del hospedante ante la no invasión o invasión del patógeno. Las plantas se revisaron diariamente entre los tres y 21 días después de la inoculación (ddi) y para registrar el TI se usó la siguiente clasificación establecida por Mueller *et al.* (2003): R=resistente, ausencia de lesiones o muy pocas restringidas a una reacción de hipersensibilidad sin esporulación; MR=moderadamente resistente, muy pocas lesiones y producción de algunas uredosporas; MS=moderadamente susceptible, número de lesiones ligeramente reducido o esporulación retrasada; S=susceptible, número considerable de lesiones y de cantidad de esporulación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Descripción de signos y síntomas de la enfermedad. Las plantas infectadas de *H. lilioasphodelus* colectadas en Chicoloapan, Estado de México, mostraron en el haz y envés de las hojas lesiones avanzadas intervenales de color amarillo, rectangulares y coalescentes sobre las cuales había uredias medianas subepidermales, densas, de forma

Measurement of resistance. The evaluated variables were the latency period (LP) (days from inoculation to sporulation) and infection type (IT), which refers to the reaction of the host tissue to the pathogen invasion and no-invasion. The plants were inspected daily between days three and 21 after inoculation (dai), and to record the IT, the following classification established by Mueller *et al.* (2003) was used: R=resistant, no lesions or very few lesions restricted to a hypersensitivity reaction without sporulation; MR=moderately resistant, very few lesions and production of some uredospores; MS=moderately susceptible, a slightly reduced number of lesions or delayed sporulation; S=susceptible, a considerable number of lesions and amount of sporulation.

RESULTS AND DISCUSSION

Description of the disease signs and symptoms. The leaves of plants infected with *H. lilioasphodelus* that were collected in Chicoloapan, State of Mexico, showed interveinal advanced lesions yellow in color, rectangular and coalescent on the upper surface and underside, on which the development of dense, oval, rectangular or irregular shaped medium-sized subepidermal uredia with abundant bright yellow uredospores, was observed (Figure 1-A and B). The leaves of plants collected in Fortín de las Flores, Veracruz, showed initial lesions on the underside that corresponded to medium-sized, dense and circular subepidermal uredia with bright yellow uredospores that matched the upper surface with yellowish, circular or quadrangular spots (Figure 1-C).

Telia were observed only on leaves of the plants collected in Fortín de las Flores, which were black in color, erumpent and slightly long and dense (Figure 1-D). The main symptom observed when

ovalada, rectangular o irregular y con abundantes uredosporas amarillo brillante (Figura 1-A y B). Las plantas colectadas en Fortín de las Flores, Veracruz, presentaron lesiones iniciales en el envés de las hojas, correspondientes a uredias medianas, subepidermales, densas y circulares, con uredosporas de color amarillo brillante que se correspondían en el haz con manchas amarillentas de forma circular o cuadrangular (Figura 1-C).

Sólo se observaron telias sobre el envés de hojas de las plantas colectadas en Fortín de las Flores, estas de color negro, ligeramente alargadas, errumpentes y poco densas (Figura 1-D). Se observó que cuando las pústulas de uredias y telias invadieron

uredia and telia pustules invaded the leaf area was a general yellowing of leaves that eventually became necrosed, a fact that caused photosynthesis to slow down, thus reducing the plant growth, as well as the size and number of flowers (Figure 1-E).

Morphological identification of the fungus

Identification at the genus level. Bicellular, pedicelled and horizontally septated teliospores inside non-jelly telia were observed; no peridium in palisade was observed in uredia and telia. According to Cummins and Hiratsuka (1996), these characteristics correspond to the *Puccinia* genus.

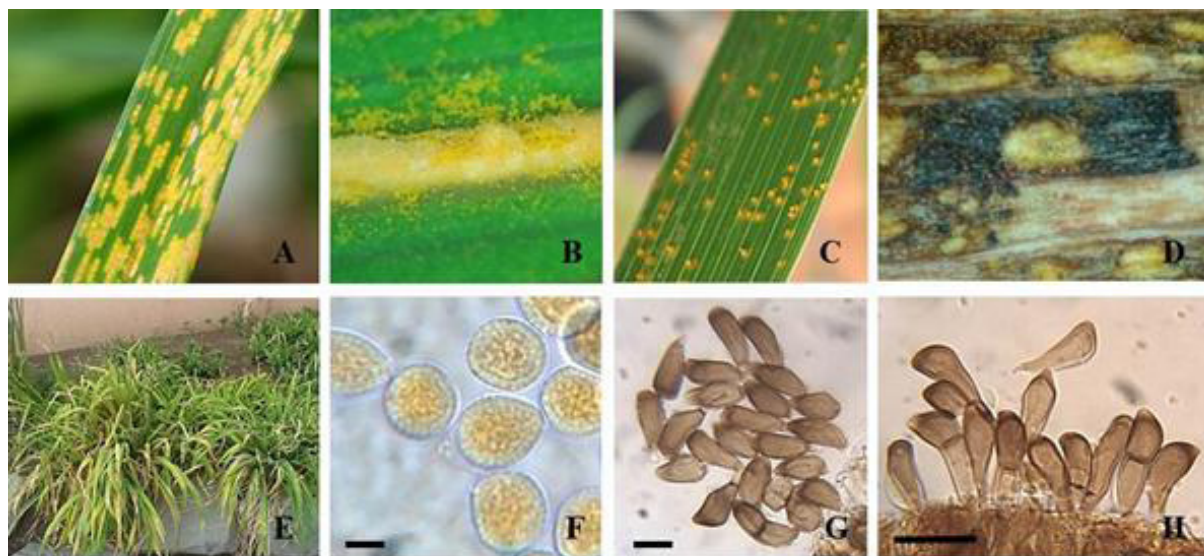


Figura 1. Síntomas y signos de *Puccinia hemerocallidis* en plantas de *Hemerocallis lilioasphodelus* L. recolectadas en Chicoloapan de Juárez, Estado de México y Fortín de las Flores, Veracruz. A) Lesiones avanzadas intervenales amarillentas, rectangulares y coalescentes sobre el haz y B) Uredia errumpente con uredosporas amarillo brillante sobre el haz de plantas colectadas en Chicoloapan de Juárez. C) Lesiones iniciales con uredosporas sobre el envés y D) Telias negras, alargadas y poco densas sobre una hoja necrótica de plantas colectadas en Fortín de las Flores. E) Plantas severamente infestadas, mostrando amarillamiento. F) Uredosporas. G) Teliosporas no septadas. H) Teliosporas septadas. Barras: F=10 µm, G=20 µm, H=40 µm.

Figure 1. *Puccinia hemerocallidis* symptoms and signs in *Hemerocallis lilioasphodelus* L. plants collected in Chicoloapan de Juárez, State of Mexico, and Fortín de las Flores, Veracruz. A) Interveinal advanced lesions yellow in color, rectangular and coalescent on the upper surface; and B) Erumpent uredia with bright yellow uredospores on the upper surface of plants collected in Chicoloapan de Juárez. C) Initial lesions with uredospores on the underside; and D) Black, long and slightly dense telia on a necrotic leaf of plants collected in Fortín de las Flores. E) Plants severely infected that show yellowing. F) Uredospores. G) Non septated teliospores. H) Septated teliospores. Bars: F=10 µm, G=20 µm, H=40 µm.

la superficie de la hoja, el síntoma principal se manifestó como un amarillamiento general de la hoja que eventualmente se necrosó, lo que repercutió en la disminución de fotosíntesis y por tanto, se redujo el crecimiento de la planta, así como el tamaño y número de flores (Figura 1-E).

Identificación morfológica del hongo

Identificación a nivel de género. Se observaron teliosporas bicelulares, pediceladas y horizontalmente septadas, dentro de telias no gelatinosas; las uredias y telias no se observaron con peridio en palisada. De acuerdo a Cummins y Hiratsuka (1996), estas características corresponden al género *Puccinia*.

Identificación a nivel de especie. Las uredosporas de ambos aislamientos se observaron de color amarillo, de forma globosa a elipsoide, con la pared hialina y equinulada, y algunas unidas a un pedicelo corto que emergía del fondo de la uredia. No se observaron poros germinales. Las medidas de las uredosporas del aislamiento RCH1 estuvieron dentro del rango: 18.3-22.3 x 15.13-19.3 μm (media = 20.06 $\mu\text{m} \pm 1.64$ por 17.157 $\mu\text{m} \pm 1.41$, n = 100). Las uredosporas del aislamiento RFOR2 midieron: 18-22.7 x 16.4-19.3 μm (media = 20.17 $\mu\text{m} \pm 1.81$ por 17.749 $\mu\text{m} \pm 1.28$, n = 100) (Figura 1-F).

Sólo se encontraron teliosporas del aislamiento RFOR2, de forma elipsoidal y clavadas, con papila en el ápice de forma redondeada o angular y excéntrica. En su mayoría se observaron teliosporas no septadas, que midieron 30.1-40.8 x 13.3-17.5 μm (media = 35.887 $\mu\text{m} \pm 4.70$ por 15.518 $\mu\text{m} \pm 1.67$, n = 100) (Figura 1-G). Las teliosporas septadas midieron 42.1-51.2 x 14.5-21.2 μm (media = 46.526 $\mu\text{m} \pm 3.86$ por 17.544 $\mu\text{m} \pm 2.7$, n = 100) (Figura 1-H). La pared de las teliosporas se observó lisa y café oscuro conforme se acercaba al ápice; a los lados

Identification at the species level. Uredospores of both isolates were yellow in color, globose to ellipsoid, with hyaline and equinulated walls, and some were attached to a short pedicel that emerged from the bottom of the uredia. No germinal pores were observed. Measurements of uredospores of the RCH1 isolate were within range: 18.3-22.3 x 15.13-19.3 μm (mean = 20.06 $\mu\text{m} \pm 1.64$ by 17.157 $\mu\text{m} \pm 1.41$, n = 100). Measurements of uredospores of the RFOR2 isolate were: 18-22.7 x 16.4-19.3 μm (mean = 20.17 $\mu\text{m} \pm 1.81$ by 17.749 $\mu\text{m} \pm 1.28$, n = 100) (Figure 1-F).

Teliospores were found only in the RFOR2 isolate, which were ellipsoid and nailed, and had a rounded, angular and eccentric papillae at the apex. Most of the teliospores observed had no septa and measured 30.1-40.8 x 13.3-17.5 μm (mean = 35.887 $\mu\text{m} \pm 4.70$ by 15.518 $\mu\text{m} \pm 1.67$, n = 100) (Figure 1-G). Septated teliospores measured 42.1-51.2 x 14.5-21.2 μm (mean = 46.526 $\mu\text{m} \pm 3.86$ by 17.544 $\mu\text{m} \pm 2.7$, n = 100) (Figure 1-H). The teliospores wall was smooth and turned dark brown as it approached the apex; its sides measured 1 to 1.8 μm (mean = 1.365 μm) and 3.1-5.3 μm at the apex (mean = 4.7 $\mu\text{m} \pm 0.77$, n = 20).

The morphological characteristics of uredospores and teliospores coincided with the description of *P. hemerocallidis* provided by Hiratsuka *et al.* (1992), Williams-Woodward *et al.* (2001) and Hernández *et al.* (2002). Uredospores of both isolates were slightly smaller than those described by the authors and, the same as in the other American specimens, no septated teliospores were observed. No alternate host was observed in the identified rust, but according to Hiratsuka *et al.* (1992), *P. hemerocallidis* has Type 4 spermatogonia.

Molecular identification. After amplification using ITS5 and ITS4 primers, 618 and 623 bp fragments, approximately, were obtained and then deposited

midió de 1 a 1.8 μm (media = 1.365 μm) y en el ápice 3.1-5.3 μm (media = 4.7 $\mu\text{m} \pm 0.77$, $n = 20$).

Las características morfológicas de uredosporas y teliosporas coincidieron con las descripciones de *P. hemerocallidis* realizadas por Hiratsuka *et al.* (1992), Williams-Woodward *et al.* (2001) y Hernández *et al.* (2002). Las uredosporas de ambos aislamientos resultaron ligeramente más pequeñas que aquellas descritas por los autores y al igual que en los otros especímenes americanos, se observaron teliosporas no septadas. No se contó con la presencia del hospedante alterno de la roya identificada, pero de acuerdo con Hiratsuka *et al.* (1992), *P. hemerocallidis* posee espermagonios tipo 4.

Identificación molecular. Con las ampliificaciones usando los primers ITS5 e ITS4, se obtuvieron fragmentos de 618 y 623 bp aproximadamente, los cuales se depositaron en el genbank (números de acceso FJ897533 y FJ897535). Los resultados del BLASTN confirmaron que los aislamientos RCH1 y RFOR2 correspondieron a *P. hemerocallidis*, ya que la región ITS reveló similitud de nucleótidos de 99% con *P. hemerocallidis* (número de acceso AF479742).

Caracterización de la resistencia. De acuerdo con el periodo de latencia y tipo de infección, los genotipos evaluados se agruparon en tres categorías de resistencia a *P. hemerocallidis* (Cuadro 1). No se observaron diferencias de los tipos de infección entre aislamientos y experimentos. El tipo de infección registrado por genotipo fue uniforme entre aislamientos.

La especie *H. lilioasphodelus* se comportó susceptible al presentar inicialmente pequeñas lesiones abundantes, cloróticas húmedas y brillantes a los tres días después de la esporulación (ddi), las cuales esporularon a los seis ddi en forma de uredias pequeñas y redondas de color amarillo brillante,

in the Genbank (access numbers FJ897533 and FJ897535). The results of BLASTN confirmed that the RCH1 and RFOR2 isolates corresponded to *P. hemerocallidis*, since the ITS region showed 99% nucleotide similarity with *P. hemerocallidis* (access number AF479742).

Characterization of resistance. Based on the latency period and type of infection, the evaluated genotypes were grouped in three categories of resistance to *P. hemerocallidis* (Table 1). No infection differences were observed between isolates and experiments. The type of infection recorded by genotypes was uniform among isolates. The *H. lilioasphodelus* species was susceptible because it initially showed abundant, humid chlorotic and bright small lesions three days after inoculation (dai), which sporulated six dai in the form of small and round bright yellow uredia that grew in extended form and had abundant sporulation on leaf upper surface and backside (10 dai) (Figure 2-A). ‘Radiant Greetings’ and ‘Stella d’Oro’ cultivars showed reddish small necrotic lesions five dai, which indicated a hypersensitivity reaction. However, at 10 and 11 dai, respectively, a yellow initial sporulation was observed on some lesions, so they were classified as moderately resistant (Figure 2-B and C). The *H. fulva* species showed a reduced number of small chlorotic, humid and bright lesions without sporulation at six dai, so it was classified as resistant (Figure 2-D), the same as ‘Cherry Wine’ cultivar, which had no lesions or sporulation (Figure 2-E).

The hypersensitivity reaction (HR) is an active resistance mechanism that operates after the parasite penetrates. In the broad sense, this mechanism is attributed to the presence of major resistance genes that limit the reaction of a specific parasite genotype, but they actually limit a range of interactions ranging from immunity up to a certain

Cuadro 1. Período de latencia y tipo de infección de cinco genotipos de lirio de día (*Hemerocallis* spp.) inoculados con dos aislamientos de *P. hemerocallidis*. Datos registrados 21 días después de la inoculación.

Table 1. Latency period and type of infection of five daylily genotypes (*Hemerocallis* spp.) that were inoculated with two *P. hemerocallidis* isolates. Data recorded 21 days after inoculation.

Genotipo	Aislamiento RCH1 ^x		Aislamiento RFOR2 ^y	
	Período de latencia (días)	Tipo de infección ^z	Período de latencia (días)	Tipo de infección
<i>H. lilioasphodelus</i>	6	S	6	S
‘Radiant Greetings’	10	MR	10	MR
‘Stella d’Oro’	11	MR	11	MR
<i>H. fulva</i>	-	R	-	R
‘Cherry Wine’	-	R	-	R

^xChicoloapan, Estado de México / Chicoloapan, State of Mexico.

^yFortín de las Flores, Veracruz.

^zR= resistente; MR= moderadamente resistente; S= susceptible / R= resistant; MR= moderately resistant; S= susceptible.

que crecieron de forma extendida y con abundante esporulación en el haz y envés (10 ddi) (Figura 2-A). Los cultivares ‘Radiant Greetings’ y ‘Stella d’Oro’ presentaron pequeñas lesiones necróticas de color rojizo a los cinco ddi, indicando reacción de hipersensibilidad; sin embargo, a los 10 y 11 ddi, respectivamente, se observó una incipiente esporulación de color amarillo en algunas lesiones, por lo que se clasificaron como moderadamente resistentes (Figura 2-B y C). La especie *H. fulva* presentó un número reducido de pequeñas lesiones cloróticas, húmedas y brillantes sin esporulación a los seis ddi, por lo que se clasificó como resistente (Figura 2-D), al igual que el cultivar ‘Cherry Wine’, el cual no presentó lesiones ni esporulación (Figura 2-E).

La reacción de hipersensibilidad (RH) es un mecanismo de resistencia activa y opera después de la penetración del parásito. En sentido amplio, este mecanismo se atribuye a la presencia de genes mayores para resistencia que condicionan la reacción a un genotipo específico del parásito, pero en realidad, condicionan un rango de interacciones desde inmunidad hasta cierto grado de susceptibilidad (Jones y Clifford, 1983).

level of susceptibility (Jones and Clifford, 1983).

The genes that confer HR cause the host cell to collapse after the haustorium is formed. The cell collapses a few hours after penetration in order to interfere with the fungus nutriment supply, causing a rapid death of the infection hyphae. At first glance, this phenomenon can be observed in the form of yellowish and necrotic spots. In other cases, the collapse is slower and allows the formation of uredospores (Parlevliet and van Ommere, 1975; Niks *et al.*, 2011). This explains the type of infection observed in ‘Radiant Greetings’ and ‘Stella d’Oro’ cultivars, because in both cases, hypersensitivity lesions were first observed, but later uredia were detected in some lesions. The studies conducted by Mueller *et al.* (2003), Li *et al.* (2007) and Buck (2013) indicate that ‘Stella d’Oro’ cultivar was moderately resistant, resistant and highly resistant, respectively, where the type of infection was limited to necrotic lesions. The reactions observed in the experiments conducted in this study for the cultivar are similar to those reported by the authors, so it seems that there is no variation in the pathogen virulence.

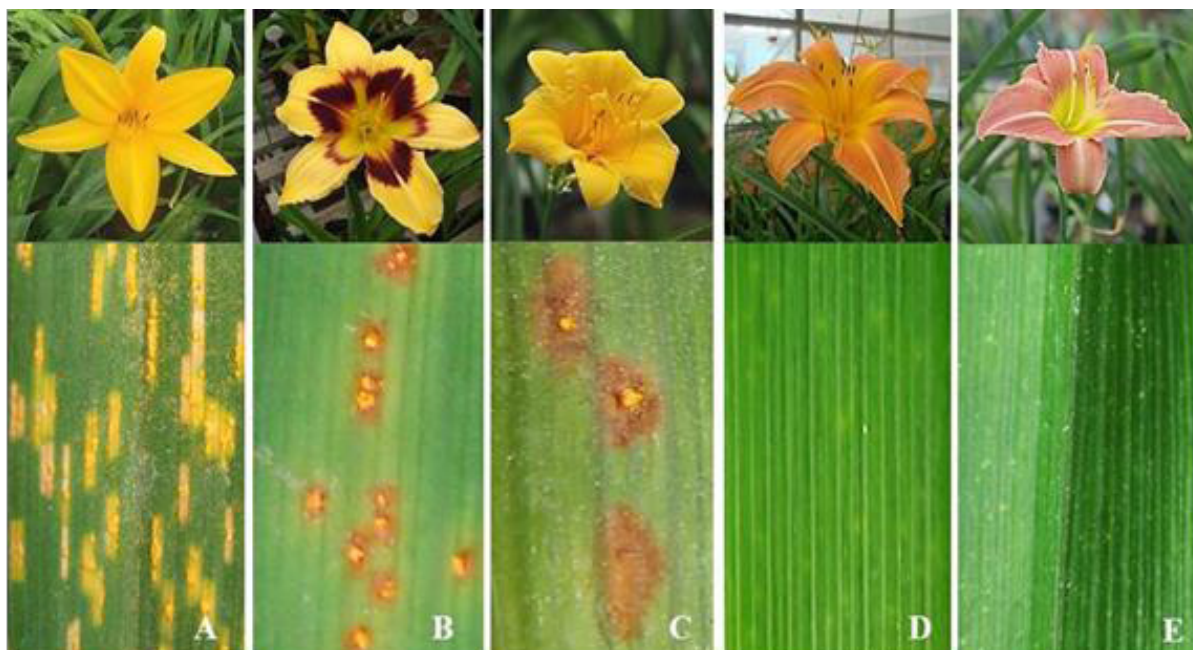


Figura 2. Tipos de infección por *P. hemerocallidis* sobre cinco genotipos de *Hemerocallis* spp., a los 21 días después de la inoculación. A) Uredias y uredosporas sobre el genotipo susceptible *H. lilioasphodelus*, (10 ddi). B) Lesiones necróticas (reacción de hipersensibilidad) e incipiente esporulación sobre el cultivar moderadamente resistente ‘Radiant Greetings’, (10 ddi). C) Reacción de hipersensibilidad e incipiente esporulación sobre el cultivar moderadamente resistente ‘Stella d’Oro’, (11 ddi). D) Lesiones cloróticas diminutas sin esporulación sobre el genotipo resistente *H. fulva*, (6 ddi) E) Ausencia de lesiones sobre el cultivar resistente ‘Cherry Wine’.

Figure 2. Types of infection caused by *P. hemerocallidis* in five *Hemerocallis* spp. genotypes 21 days after inoculation. A) Uredia and uredospores on the *H. lilioasphodelus* susceptible genotype (10 dai). B) Necrotic lesions (hypersensitivity reaction) and initial sporulation in the moderately resistant ‘Radiant Greetings’ cultivar (10 dai). C) Hypersensitivity reaction and initial sporulation in the moderately resistant ‘Stella d’Oro’ cultivar (11 dai). D) Tiny chlorotic lesions without sporulation in the *H. fulva* resistant genotype (6 dai); E) No lesions on the ‘Cherry Wine’ resistant cultivar.

Los genes que confieren RH causan un colapso de la célula del hospedante después de que el haustorio se ha formado. La célula se colapsa a pocas horas de la penetración para interferir con el suministro del nutrimento del hongo, lo cual lleva a una muerte rápida de la hifa de infección. Este fenómeno se puede observar a simple vista como manchas amarillentas y puntos necróticos. En otros casos el colapso es más lento y puede permitir la formación de uredosporas (Parlevliet y van Ommere, 1975; Niks *et al.*, 2011). Esto explica el tipo de infección observado en los cultivares ‘Radiant Greetings’ y ‘Stella d’Oro’; en ambos se formaron

The *H. fulva* genotype showed slow sporulation on some of the chlorotic lesions outside of the interval of the resistance evaluation, approximately 28 days after inoculation. Parlevliet and van Ommere (1975) indicated that genotypes with partial resistance have a susceptible type of infection (complete compatibility between the pathogen and its host, which indicates the absence of hypersensitivity), and that the latency period is far longer, while the infection is less frequent compared to a susceptible host. From the established experiments, major differences can be observed in the latency period and infection

primero lesiones de hipersensibilidad, pero después se apreciaron uredias en algunas lesiones. Los estudios de Mueller *et al.* (2003), Li *et al.* (2007) y Buck (2013) señalan que el cultivar ‘Stella d’Oro’ se comportó moderadamente resistente, resistente o altamente resistente, respectivamente, en donde el tipo de infección se limitó a lesiones necróticas. Las reacciones observadas en los experimentos del presente estudio en dicho cultivar son similares a las reportadas por estos autores, por lo que al parecer no existe variación en la virulencia del patógeno.

El genotipo *H. fulva* presentó esporulación lenta en algunas de las lesiones cloróticas, fuera del intervalo de evaluación de la resistencia, aproximadamente 28 días después de haber sido inoculado. Parlevliet y van Ommeren (1975) describieron que genotipos con resistencia parcial presentan un tipo de infección susceptible (completa compatibilidad entre el patógeno y su hospedante, lo que indica ausencia de hipersensibilidad) y el periodo de latencia es mucho más prolongado y la frecuencia de infección es menor comparado con un hospedante susceptible. De los experimentos establecidos se pueden apreciar las grandes diferencias en periodo de latencia y en frecuencia de infección (no cuantificada), pero un estudio histológico como los realizados en royas de cereales (Niks, 1983; Moldenhauer *et al.*, 2006) no se hizo para precisar la presencia a nivel microscópico del nivel de reacción y así definir la existencia de una posible resistencia parcial. Basado sólo en los cambios de coloración del tejido del hospedante, los tipos de infección de los cultivares ‘Radiant Greetings’ y ‘Stella d’Oro’ tienen una resistencia de hipersensibilidad; sin embargo, *H. fulva* al mostrar un PL de aproximadamente 28 días y nula reacción de hipersensibilidad macroscópicamente, podría presentar resistencia parcial *sensu* Parlevliet y van Ommeren (1975), lo cual requiere ser estudiado más profundamente.

frequency (not quantified), but no histological studies, as the studies conducted for cereal rusts (Niks, 1983; Moldenhauer *et al.*, 2006), were conducted to specify the level of reaction and thus define the existence of a possible partial resistance. Based only on the coloration changes in the host’s tissue, the types of infection in ‘Radiant Greetings’ and ‘Stella d’Oro’ cultivars have only one type of hypersensitivity resistance. However, *H. fulva*, which showed only one latency period of approximately 28 days and null macroscopically hypersensitivity reaction, could have partial resistance *sensu* Parlevliet (Parlevliet and van Ommeren (1975), but this must be further studied.

The RCH1 and RFOR2 isolates inoculated in the different genotypes caused the same resistance reactions, which indicates that there are no variations in pathogenicity. However, studies conducted by Hernández *et al.* (2002) and Chatasiri *et al.* (2006) indicate that there is proof of variation in the pathogen, because by comparing the ITS region of several isolates coming from different America and Asia geographical areas, they observed genetic differences in the specimens from each continent. However, they point out that a wider sampling is needed in order to determine if there is genetic variability in the fungus.

Inoculation of different *P. hemerocallidis* isolates used in the study conducted by Buck (2013) confirms the presence of pathotypes with a different type of virulence in daylily cultivars in the southern area of the United States. Carvalho *et al.* (2018) report that the absence of the isolate found in Portugal is completely aligned with the sequences from the United States and Costa Rica, but that it differs from the reported sequences from Russia, Japan, Australia and Mexico (sequences reported in the present study).

Rusts are obliged parasites and highly specific to the host specificity; in some rust species the

Los aislamientos RCH1 y RFOR2 inoculados en los diferentes genotipos, indujeron las mismas reacciones de resistencia, lo que indica que no hay variaciones de patogenicidad. Sin embargo, los trabajos de Hernández *et al.* (2002) y Chatasiri *et al.* (2006) indican una evidencia de la variación del patógeno, ya que al comparar la región ITS de varios aislamientos provenientes de diferentes áreas geográficas de América y Asia, observaron diferencias genéticas en los especímenes de cada continente; no obstante, señalan que es necesario un muestreo más amplio para determinar que existe variabilidad genética del hongo.

La inoculación de diferentes aislamientos de *P. hemerocallidis* en el estudio de Buck (2013) confirma la presencia de patotipos que difieren en virulencia en cultivares de lirio de día en el sureste de EE. UU. Además, Carvalho *et al.* (2018) reportan que la secuencia del aislamiento encontrado en Portugal se alinea completamente con las secuencias de EE. UU. y Costa Rica, mientras que es diferente de las secuencias reportadas de Rusia, Japón, Australia y México (secuencias reportadas en el presente estudio).

Las royas son parásitos obligados y altamente específicos al hospedante; en algunas especies de royas, las formas especiales y razas fisiológicas son definidas de acuerdo con la especificidad del hospedante y cultivares (Li *et al.*, 2007). En el caso de *P. hemerocallidis*, no se ha reportado especificidad al hospedante a nivel de razas fisiológicas por lo que, no sería sorprendente la existencia de tal especialización patogénica en este patosistema ya que es similar a aquellos que involucran royas en diferentes cultivos de importancia económica (Leonard y Szabo, 2005; Soto-Estrada *et al.*, 2005; Yáñez *et al.*, 2009), pero es necesario realizar más estudios para demostrar este aspecto.

Se sabe que en las royas macrocíclicas, p.e. roya del tallo (*P. graminis* f. sp. *tritici*) y roya de la hoja del trigo (*P. triticina*) la recombinación ge-

special forms and physiological races are defined according to the host specificity and cultivars (Li *et al.*, 2007). In the case of *P. hemerocallidis*, there are no reports on its host specificity, so it would not be surprising to find such pathogenic specialization in this pathosystem, considering that it is similar to those that involve rusts in different economically important crops (Leonard and Szabo, 2005; Soto-Estrada *et al.*, 2005; Yáñez *et al.*, 2009), but further studies must be conducted to demonstrate this aspect.

It is known that in macrocyclic rusts, including wheat stem rust (*P. graminis* f. sp. *tritici*) and leaf rust (*P. triticina*), the genetic recombination occurs in the alternate host and that this is a mechanism to create new virulence combinations. Since *Patrinia villosa*, an alternate *P. hemerocallidis* host (Ono, 2003), has not been found in Mexico, its possible influence on the development of genetic variation in the fungus is unknown.

In North America, the first report on this rust was submitted by Williams-Woodward *et al.* in 2001, when they detected infected material in the United States. Later, the disease quickly spread across America and it is probably present in all the countries where *Hemerocallis* spp. susceptible cultivars are grown.

CONCLUSIONS

The fungus that attack *Hemerocallis* susceptible genotypes in Mexico correspond to *P. hemerocallidis*. The *H. lilioasphodelus* species is susceptible; 'Radiant Greetings' and 'Stella d'Oro' cultivars from the *H. hybrida* species were classified as moderately resistant because they showed hypersensitivity resistance; the 'Cherry Wine' cultivar and the *H. fulva* species were included in the group of resistant, the latter probably having partial resistance *sensu* Parlevliet.

nética ocurre en el hospedante alterno y este es un mecanismo para generar nuevas combinaciones de virulencia. Se desconoce la existencia de *Ptrinia villosa* en México, hospedante alterno de *P. hemerocallidis* (Ono, 2003) y por lo tanto, se ignora su posible influencia en la generación de variación genética del hongo.

En América del Norte, el primer reporte de esta roya lo realizaron Williams-Woodward *et al.*, en el año 2001, al observar material infectado en EE.UU. Después se dispersó rápidamente en América y seguramente se encuentra en todos los países donde existan cultivares susceptibles de *Hemerocallis* spp.

CONCLUSIONES

El hongo que ataca a los genotipos de *Hemerocallis* susceptibles en México corresponde a *P. hemerocallidis*. La especie *H. lilioasphodelus* es susceptible, los cultivares ‘Radiant Greetings’ y ‘Stella d’Oro’ de la especie *H. hybrida* se clasificaron como moderadamente resistentes al mostrar resistencia de hipersensibilidad; el cultivar ‘Cherry Wine’ y la especie *H. fulva* se agruparon como resistentes, esta última, presenta una probable resistencia parcial *sensu* Parlevliet.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece al Dr. Stephen D. Koch (†) del Programa de Botánica del Colegio de Postgraduados por su ayuda en la identificación de las especies de *Hemerocallis* utilizadas en el presente estudio.

LITERATURA CITADA

Ahrens U and Seemüller E. 1992. Detection of DNA of plant pathogenic mycoplasma-like organisms by polymerase chain reaction that amplifies a sequence of the 16S rRNA gene. *Phytopathology* 82: 828-832. <https://doi.org/10.1094/Phyto-82-828>

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank Dr. Stephen D. Koch (†) of the Colegio de Postgraduados’ Botany Program for their help in identifying the *Hemerocallis* species used in the present study.

~~~~~ End of the English version ~~~~~

- Buck JW. 2013. Identification of pathotypes in the daylily rust pathogen *Puccinia hemerocallidis*. *Journal of Phytopathology* 161: 784-790. <http://dx.doi.org/10.1111/jph.12134>
- Carvalho AA Jr, Coutinho LN and Figueiredo MB. 2001. A primeira constatação da ferrugem do lírio-de-São-José nas Américas. *Arquivos do Instituto Biológico* 68:55.
- Carvalho R, Silva E, Loureiro J, Ramos AP and Talhinhos P. 2018. Characterisation of *Puccinia hemerocallidis* causing the first outbreak of daylily rust in Europe. *Revista de Ciências Agrárias* 41: 110-115. <https://doi.org/10.19084/RCA.17075>
- Chatasiri S, Kitade O and Ono Y. 2006. Phylogenetic relationships among *Puccinia hemerocallidis*, *P. funkiae*, and *P. ptriniae* (Uredinales) inferred from ITS sequence data. *Mycoscience* 47:123-129. <https://doi.org/10.1007/S10267-006-0283-Y>
- Cummins GB and Hiratsuka Y. 1996. *Illustrated Genera of Rust Fungi*. APS Press. St. Paul, Minnesota. 152 p.
- Grosvenor G. 1999. *Daylilies for the Garden*. Timber Press. Portland, Oregon. 176 p.
- Hall TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95-98. <http://brownlab.mbio.ncsu.edu/JWB/papers/1999Hall1.pdf>
- Hernández JR, Palm ME and Castlebury LA. 2002. *Puccinia hemerocallidis*, cause of daylily rust, a newly introduced disease in the Americas. *Plant Disease* 86: 1194-1198. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2002.86.11.1194>
- Hiratsuka N, Sato T, Katsuya K, Kakishima M, Hiratsuka Y, Kaneko S, Ono Y, Sato S, Harada Y, Hiratsuka T and Nakayama K. 1992. *The Rust Flora of Japan*. Tsukuba Shuppankai, Ibaraki, Japan. pp: 710-711.
- Jones DD and Clifford BC. 1983. *Cereal Diseases. Their Pathology and Control*. John Wiley & Sons Ltd. 309 p.
- Leonard KJ and Szabo LJ. 2005. Pathogen profile: Stem rust of small grains and grasses caused by *Puccinia graminis*. *Molecular Plant Pathology*. 6: 99-111. [pubag.nal.usda.gov/pubag/downloadPDF.xhtml?id=38317&content=PDF](http://pubag.nal.usda.gov/pubag/downloadPDF.xhtml?id=38317&content=PDF)
- Li YH, Windham MT, Trigliano RN, Fare DC, Spiers JM and Copes WE. 2007. Microscopic and macroscopic studies of the development of *Puccinia hemerocallidis* in resistant and susceptible daylily cultivars. *Plant Disease* 91: 664-668. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-91-6-0664>
- Moldenhauer J, Moerschbacher BM and Van Der Westhuizen AJ. 2006. Histological investigation of stripe rust (*Puccinia striiformis* f.sp. *tritici*) development in resistant and

- susceptible wheat cultivars. *Plant Pathology* 55: 469-474. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2006.01385.x>
- Mostert L, Bester W, Coertze S and Wood AR. 2008. First report of daylily rust caused by *Puccinia hemerocallidis* in the Western Cape Province of South Africa. *Plant Disease* 92: 1133. <https://doi.org/10.1094/PDIS-92-7-1133A>.
- Mueller DS, Williams-Woodward JL and Buck JW. 2003. Resistance of daylily cultivars to the daylily rust pathogen, *Puccinia hemerocallidis*. *Horticultural Science* 38: 1137-1140. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.38.6.1137>
- Munson Jr RW. 1989. *Hemerocallis*, The daylily. Timber Press, Inc. Portland, Oregon. 144 p.
- National Center for Biotechnology Information (NCBI, 2012) <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>
- Niks RE. 1983. Haustorium formation by *Puccinia hordei* in leaves of hypersensitive, partially resistant, and nonhost plant genotypes. *Phytopathology* 73: 64-66. <https://doi.org/10.1094/Phyto-73-64>
- Niks RE, Parlevliet JE, Lindhout P and Bai Y. 2011. Breeding crops with resistance to diseases and pests. Department of Plant Breeding. Wageningen Agricultural University. The Netherlands. 200 p. <https://doi.org/10.3920/978-90-8686-171-2>
- Ono Y. 2003. Does *Puccinia hemerocallidis* regularly host-alternate between *Hemerocallis* and *Patrinia* plants in Japan? *Journal of General Plant Pathology*. 69: 240-243. <https://doi.org/10.1007/s10327-003-0047-x>
- Pardo-Cardona VM. 2006. Uredinales de plantas cultivadas de interés floral en Colombia. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín* 59: 3335-3353. <http://www.scielo.org.co/scielo>
- Pardo-Cardona VM, Caruso D y Rojas T. 2008. Primer registro para Venezuela de *Puccinia hemerocallidis* Thüm., la roya del lirio de la mañana. *Agronomía Tropical* 58: 193-196. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=2797069>
- Parlevliet JE and van Ommeren A. 1975. Partial resistance of barley to leaf rust, *Puccinia hordei*. II. Relationship between field trials, microplot tests and latent period. *Euphytica* 24: 293-303. <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00028194>
- Silva E, Carvalho R, Nunes N, Ramos AP and Talhinhos P. 2016. First report of *Puccinia hemerocallidis* causing daylily rust in Europe. *Plant Disease* 100: 2163. <https://doi.org/10.1094/PDIS-02-16-0242-PDN>
- Smith IM. 2009. *Puccinia hemerocallidis*. *Bulletin OEPP/EPPO* 39:48-50. [https://gd.eppo.int/doc/601\\_ds\\_PUC-CHM\\_en](https://gd.eppo.int/doc/601_ds_PUC-CHM_en)
- Soto-Estrada A, Förster H, DeMason DA and Adaskaveg JE. 2005. Initial infection and colonization of leaves and stems of cling peach by *Tranzschelia discolor*. *Phytopathology* 95: 942-950. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-95-0942>.
- Williams-Woodward JL, Hennen JF, Parda KW and Fowler JM. 2001. First report of daylily rust in the United States. *Plant Disease* 85: 1121. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS.2001.85.10.1121C>
- Yáñez MMJ, Alanis MI, Soto RJM, Malvick DK, Kurle JE, Floyd CM and Krupa SV. 2009. Soybean rust caused by *Phakopsora pachyrhizi* detected in the state of Campeche on the Yucatan Peninsula, Mexico. *Plant Disease* 93: 847. <http://dx.doi.org/doi:10.1094/PDIS-93-8-0847A>.