



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

**INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS
AGRÍCOLAS**

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD

PRODUCCIÓN DE SEMILLAS

FENOLOGÍA, PROPAGACIÓN *IN VITRO* Y ENFERMEDADES DEL GLADIOLO EN SAN MARTÍN TEXMELUCAN, PUEBLA.

ENRIQUE GONZÁLEZ PÉREZ

T E S I S
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

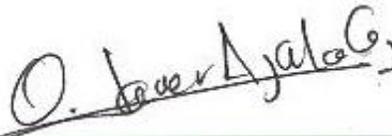
2011

La presente tesis titulada: **FENOLOGÍA, PROPAGACIÓN *IN VITRO* Y ENFERMEDADES DEL GLADIOLO EN SAN MARTÍN TEXMELUCAN, PUEBLA** realizada por el alumno: Enrique González Pérez, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
PRODUCCIÓN DE SEMILLAS

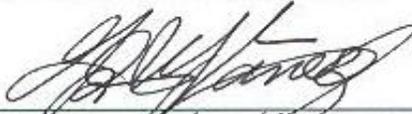
CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



Dr. ÓSCAR JAVIER AYALA GARAY

ASESOR



Dra. MARÍA DE JESÚS YÁÑEZ MORALES

ASESOR



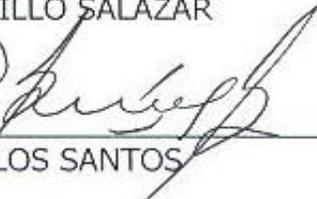
Dra. JUANA JUÁREZ MUÑOZ

ASESOR



Dr. JOSÉ ALFREDO CARRILLO SALAZAR

ASESOR



Dr. GABINO GARCÍA DE LOS SANTOS

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Diciembre de 2011.

AGRADECIMIENTOS

Son mucha las personas especiales a las que desearía agradecer su amistad, apoyo, ánimo y compañía en las diferentes etapas de mi vida. Algunas están aquí conmigo y otras están en mis recuerdos y en el corazón. Sin importar en donde estén o si alguna vez llegan a leer estas palabras quiero darles las gracias por formar parte de mí, por todo lo que me han brindado y por todo su apoyo.

A DIOS: por darme la vida y por todo lo que con su voluntad he logrado, así mismo por permitirme disfrutar de la maravillosa familia a la cual pertenezco. Gracias Dios.

AL CONACYT: por el apoyo económico brindado durante el desarrollo de mi formación como Doctor en Ciencias.

AL COLEGIO DE POSTGRADUADOS: por haberme permitido realizar mis estudios de doctorado y por todas las facilidades prestadas durante el desarrollo de mi investigación.

AL Dr. ÓSCAR JAVIER AYALA GARAY: por el apoyo recibido durante estos cuatro años, y por el aporte científico brindado durante la realización de esta investigación, pero sobre todo por su amistad.

A la Dra. MARÍA DE JESÚS YÁÑEZ MORALES: mis más sinceros agradecimientos por ser la persona que más me influencio durante mi formación profesional. Le agradezco por su amistad y por ser parte de mi familia. Sin olvidar su compromiso con la generación de conocimiento de calidad.

A la Dra. JUANA JUÁREZ MUÑOZ: por compartir sus conocimientos y por el apoyo brindado durante el desarrollo de esta investigación.

Al Dr. JOSÉ ALFREDO CARRILLO SALAZAR: por la asesoría brindada durante las diferentes etapas experimentales. Además del apoyo científico proporcionado durante la escritura de esta tesis.

Dr. GABINO GARCÍA DE LOS SANTOS: por brindarme su amistad y por el apoyo recibido durante mis estudios de doctorado.

A todos mis amigos y compañeros: no deseo excluir a ninguno por lo que no pondré nombres, les doy mil gracias por todos los momentos que pasamos juntos y porque han estado conmigo siempre.

Agradezco sinceramente a todas las personas que de alguna manera colaboraron en la realización de esta investigación.

Sinceramente.....Enrique

DEDICATORIA

A mis Padres: María de los Ángeles Pérez portillo y Aarón Esteban González Morales. Por ser las personas más importantes en mi vida, por su apoyo incondicional y sobre todo por el amor que me profesan.

A mis Hermanos: mucho de lo que he logrado se lo debo al apoyo recibido de parte de mi hermano Mario, que aunque es el menor me ha brindado su apoyo y confianza, y ha compartido momentos de tristeza y felicidad, y a Omar y Brisia, quienes han compartido una infinidad de aventuras por lo que les agradezco su apoyo y amor.

A mis adorables pequeños: por ser la razón principal que me inspira a superarme cada día. Momentos difíciles y buenos nos esperan, por lo que tratare de brindarles lo mejor de mí.

A mi abuela: por ser un ejemplo de superación, y por demostrarme su amor cada día de mi vida.

A mi cosa bonita: no sé cómo agradecer el apoyo que brindaste en esta difícil pero satisfactoria etapa de mi vida. Eres lo que cualquier hombre esperaría, no sé si te merezca, lo que sí puedo decirte es que mi corazón es tuyo y siempre lo será. El éxito obtenido es mutuo y quiero que lo disfrutemos.

A mi madrina: te dedico esta tesis por ser la mejor amiga que dios pudo haber puesto en mi camino. Por ser un ejemplo a seguir. Gracias María.

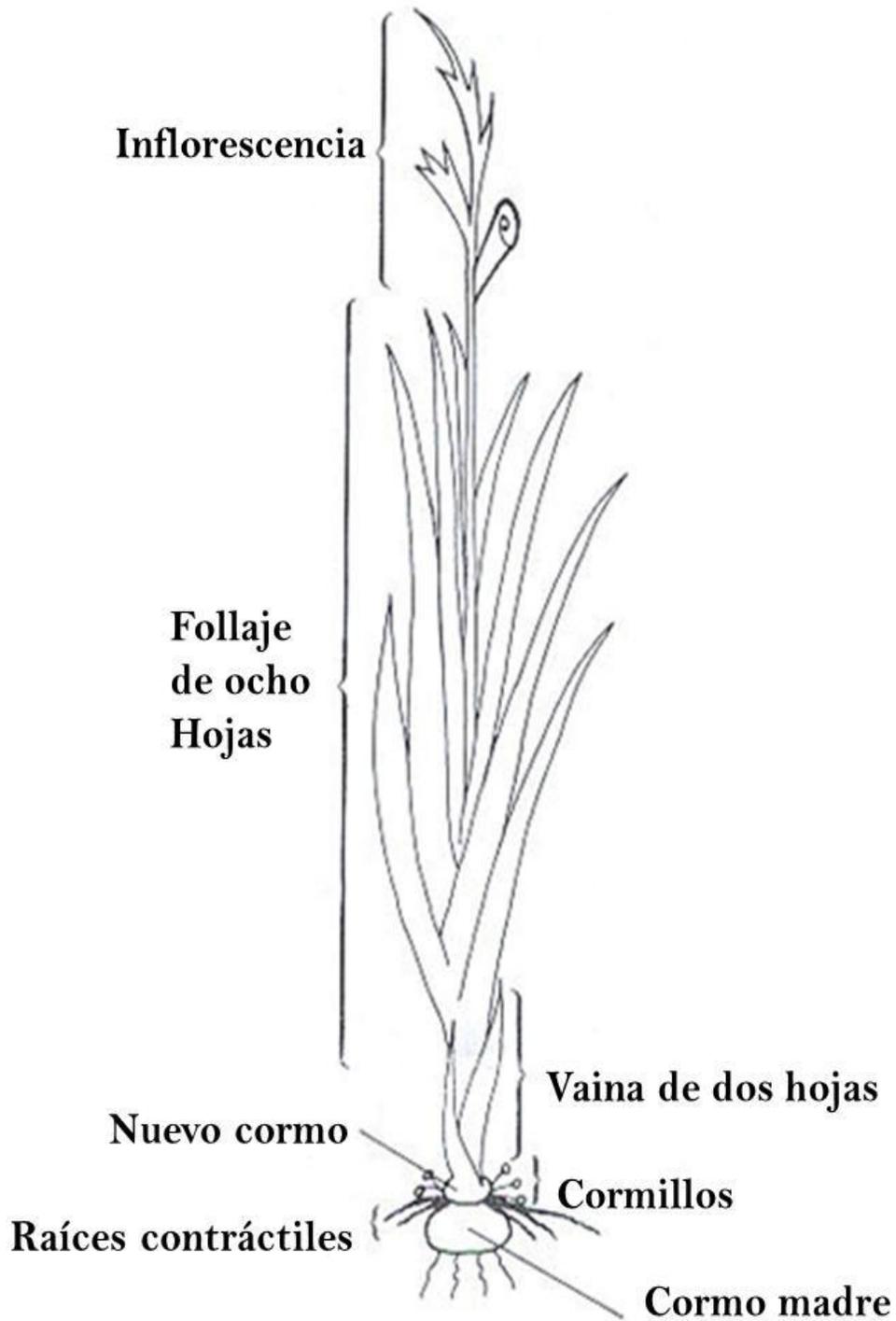
A toda mi familia: por estar siempre a mi lado, por su apoyo y por compartir conmigo la felicidad que hasta estos días me invade.

A mis amigos: dicen que el la vida solo se tiene un amigo de verdad, pero yo pude constatar que la amistad no es exclusiva, por esos les dedico y comparto con mis amigos esto que considero un éxito.

Con respeto y cariño Enrique

Todo lo que somos es el resultado de lo que hemos pensado; está fundado en nuestros pensamientos y está hecho de nuestros pensamientos.

Buda (563 AC-486 AC)
Fundador del budismo.



***Gladiolus grandiflorus* cv. Borrega Roja.**

CONTENIDO

ÍNDICE DE CUADROS	v
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
FENOLOGÍA, PROPAGACIÓN <i>IN VITRO</i> Y ENFERMEDADES DEL GLADIOLO EN SAN MARTÍN TEXMELUCAN, PUEBLA	1
PHENOLOGY, <i>IN VITRO</i> PROPAGATION AND GLADIOLUS DISEASES IN SAN MARTÍN TEXMELUCAN, PUEBLA.....	¡Error! Marcador no definido.
CAPÍTULO I	1
INTRODUCCIÓN GENERAL	3
Objetivo General	5
Objetivos específicos.....	5
Hipótesis	5
CAPITULO II.....	6
REVISION DE LITERATURA	6
2.1. ORIGEN E IMPORTANCIA.....	6
2.1.1. Origen del cultivo.	6
2.1.2. Importancia económica y distribución geográfica.....	6
2.2. TAXONOMÍA Y MORFOLOGÍA.....	7
2.2.1. Cormo.	7
2.2.2. Cormillos.	7
2.2.3. Hojas.....	8
2.2.4. Flores.	8
2.2.5. Floración.....	8
2.2.6. Variedades.	8
2.3. REQUERIMIENTOS EDÁFICOS Y CLIMÁTICOS.....	9
2.3.1. Temperatura.....	9
2.3.2. Iluminación.....	9
2.3.3. Humedad relativa.....	9
2.3.4. Suelo.....	10

2.4. LABORES CULTURALES	10
2.4.1. Propagación del cormo.	10
2.4.2. Producción de flor de corte.	10
2.5 ENFERMEDADES FUNGOSAS	10
2.5.1. <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>gladioli</i>	12
2.5.2 <i>Penicillium</i> sp	13
2.6. FERTILIZACIÓN.	13
2.7. CALIDAD DE SEMILLAS	16
2.7.1 Producción comercial de semillas.....	16
2.7.2 Categorías de semilla (SAGARPA, 2007).....	17
2.7.3. Parámetros de certificación de semilla (SAGARPA, 2007)	18
2.8. CULTIVO IN VITRO	19
2.8.1. Efecto de las hormonas en el desarrollo <i>in vitro</i> del gladiolo.....	21
2.9. LITERATURA CITADA	22
CAPITULO III	28
DESARROLLO, CALIDAD Y DOSIS DE FERTILIZACIÓN EN GLADIOLO EN SAN MARTIN TEXMELUCAN, PUEBLA	28
RESUMEN	28
3.1. INTRODUCCIÓN	29
3.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
3.2.1. Sitio experimental	30
3.2.2. Factores y niveles de estudio	31
3.2.3. Variables climáticas	31
3.2.4. Variables fenológicas y de crecimiento	32
3.2.5. Sanidad del cultivo.....	33
3.2.6. Calidad de flor	33
3.2.7. Análisis estadístico	33
3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34
3.3.1. Ambiente y desarrollo del cultivo.....	34
3.3.2. Índice de área foliar	35
3.3.3. Altura de planta.....	37
3.3.4. Calidad de la espiga floral	39
3.3.5. Sanidad del cultivo.....	40
3.4. CONCLUSIONES.....	41

3.5. LITERATURA CITADA	41
CAPITULO IV	44
PROPAGACION <i>IN VITRO</i> Y ACLIMATACIÓN DE PLÁNTULAS DE GLADIOLO LIBRES DE ENFERMEDADES	44
RESUMEN	44
4.1. INTRODUCCIÓN.....	45
4.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	46
4.2.1. Obtención de explantes	46
4.2.2. Cultivo <i>in vitro</i>	46
4.2.3. Trasplante.....	47
4.2.4. Aclimatación	47
4.2.5. Variables de fluorescencia de la hoja	48
4.2.6. Sanidad de plántulas	48
4.2.7. Análisis estadístico	48
4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	49
4.3.1. Cultivo <i>in vitro</i>	49
4.3.2. Trasplante.....	51
4.3.3. Aclimatación	51
4.3.4. Variables de fluorescencia de la hoja	54
4.3.5. Sanidad.....	55
4.4. CONCLUSIONES.....	55
4.5. LITERATURA CITADA	56
CAPITULO V	59
PUDRICIÓN DEL CORMO DE GLADIOLO EN ALMACÉN CAUSADA POR DOS ESPECIES DE <i>Penicillium</i>	59
RESUMEN	59
5.1. INTRODUCCIÓN.....	60
5.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	61
5.2.1. Muestras.....	61
5.2.2. Aislamientos fungosos.....	61
5.2.3. Pruebas de patogenicidad.....	61
5.2.7. Características culturales.	63
5.2.8. Caracteres fisiológicos.....	64
5.2.10. Análisis estadísticos.....	65

5.3. RESULTADOS Y DISCUSION.....	66
5.3.1. Aislamientos	66
5.3.2. Identificación	66
5.3.3. Pruebas de patogenicidad.....	77
5.3.4. Caracterización molecular	79
5.4. CONCLUSIONES.....	81
5.5. LITERATURA CITADA	81
CAPÍTULO VI.	84
DISCUSIÓN GENERAL Y PERSPECTIVAS.....	84
6.1. LITERATURA CITADA	87
CAPÍTULO VII.....	89
CONCLUSIONES GENERALES	89

ÍNDICE DE CUADROS

CAPITULO II. REVISION DE LITERATURA

<u>No. Cuadro</u>		<u>Página</u>
1	Hongos reportados a nivel mundial en el cultivo de gladiolo.....	11

CAPITULO III. DESARROLLO, CALIDAD Y DOSIS DE FERTILIZACIÓN EN GLADIOLO EN SAN MARTIN TEXMELUCAN, PUEBLA.

1	Dosis de fertilización (DF) en kg ha ⁻¹ de los diferentes nutrimentos utilizados.....	31
2	Días después de la siembra (DDS) y grados día de desarrollo (GDD) acumulados por etapa fenológica de dos variedades de gladiolo en Tlacotepec de José Manzo, El Verde, Puebla.....	35
3	Variables de rendimiento y calidad de flor en dos variedades de gladiolo Borrega roja y Espuma, en respuesta a diferentes dosis de fertilización en Tlacotepec de José Manzo, El Verde, Puebla. Primavera 2009.....	39
4	Efecto de cuatro dosis de fertilización (DF _{1..4}) sobre el porcentaje de mortalidad de plantas en gladiolo creciendo en campo, en Tlacotepec de José Manzo, El Verde, Puebla. Primavera 2009.....	41

CAPITULO IV. PROPAGACION *IN VITRO* Y ACLIMATACIÓN DE PLÁNTULAS DE GLADIOLO LIBRES DE ENFERMEDADES.

1	Efecto de auxinas y citocininas en la regeneración de plántulas de gladiolo.....	49
2	Temperatura media, máxima y mínima promedio diaria de cuatro ambientes de aclimatación de plántulas generadas <i>in vitro</i>	51
3	Variables de calidad de plantas de gladiolo de dos meses de edad producidas <i>in vitro</i> , en cuatro condiciones ambientes de aclimatación.....	52
4	Variables de fluorescencia de la hoja de plantas de gladiolo, bajo cuatro ambientes de aclimatación.....	55

**CAPITULO V. PUDRICIÓN DEL CORMO DE GLADIOLO EN ALMACÉN
CAUSADA POR DOS ESPECIES DE *Penicillium*.**

1	Comparación de estructuras morfológicas en μm de dos aislamientos de <i>Penicillium</i> de cormos de gladiolo en almacén de la variedad Borrega Roja en Tlacotepec de José Manzo, El Verde, Pué., con la especie de <i>P. brevicompactum</i> alineada en el banco de genes del NCBI* con 99.8% de similaridad.....	67
2	Comparación de características culturales y fisiológicas de dos aislamientos de <i>Penicillium</i> de cormos de gladiolo en almacén de la variedad Borrega Roja de Tlacotepec de José Manzo, El Verde, Pué., con la especie de <i>P. brevicompactum</i> alineada en el banco de genes del NCBI ^Δ con 99.8% de similaridad.....	69
3	Comparación de estructuras morfológicas en μm de tres aislamientos de <i>Penicillium</i> de cormos de gladiolo en almacén de la variedad Borrega Roja de Tlacotepec de José Manzo, El Verde, Pué., con la especie de <i>P. chrysogenum</i> alineada en el banco de genes del NCBI* con 94.3% de similaridad.....	72
4	Comparación de características culturales y fisiológicas de tres aislamientos de <i>Penicillium</i> de cormos de gladiolo en almacén de la variedad Borrega Roja de Tlacotepec de José Manzo, El Verde, Pué., con la especie de <i>P. chrysogenum</i> alineada en el banco de genes del NCBI* con 94.3% de similaridad.....	74
5	Clasificación de aislamientos de <i>Penicillium</i> spp., aislados de cormos en almacén, por la infección causada en cormos de la variedad Borrega Roja, en Tlacotepec de José Manzo, El Verde, Pué., en 2009.....	77

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPITULO II. REVISION DE LITERATURA

<u>No. Figura</u>		<u>Página</u>
1	Estructuras de un cormo (Vidalie, 2001).....	7
2	Hojas y botones florales del gladiolo.....	8

CAPITULO III. DESARROLLO, CALIDAD Y DOSIS DE FERTILIZACIÓN EN GLADIOLO EN SAN MARTIN TEXMELUCAN, PUEBLA.

1	Índice de área foliar durante el desarrollo de dos variedades de gladiolo A) Borrega roja y B) Espuma, en función de cuatro dosis de fertilización en Tlacotepec de José Manzo, El Verde, Puebla. Primavera 2009. Valores con la misma letra en cada muestreo son estadísticamente iguales (Tukey, 0.05). DF1...4 = dosis de fertilización 1, 2, 3, 4.....	36
2	Altura de planta (cm) de dos variedades de gladiolo cultivadas en Tlacotepec de J. M., El Verde, Pué. Primavera, 2009. Barras verticales indican el error estándar (n = 16). Modelo polinomial para 'Borrega roja': $y = 2E-07x^3 - 0.0002x^2 + 0.1367x - 1.6747$ (n = 10, P < 0.001, R ² = 0.99) B). Para 'Espuma' $y = 8E-08x^3 - 1E-04x^2 + 0.0764x - 0.4645$ (n = 10, P < 0.001, R ² = 0.98). "x" es grados días de desarrollo; "y" es la altura de planta en cm.....	38

CAPITULO IV. PROPAGACION *IN VITRO* Y ACLIMATACIÓN DE PLÁNTULAS DE GLADIOLO LIBRES DE ENFERMEDADES.

1	Porcentaje de mortandad acumulada de plántulas de gladiolo producidas <i>in vitro</i> y cultivadas en cuatro ambientes, en el invierno, 2010 en Montecillo, México.....	53
---	---	----

**CAPITULO V. PUDRICIÓN DEL CORMO DE GLADIOLO EN ALMACÉN
CAUSADA POR DOS ESPECIES DE *Penicillium*.**

1	<p><i>Penicillium brevicompactum</i>. A) Colonias en CYA, B) Colonias en MEA, C) Conidios, D, E) Fiálide en forma de botella más un conidio apical, F) Métulas G) Tallo liso del conidióforo. Las ampliificaciones D-G fueron a 100X y la C fue a 40X. Barra en micrómetros (G).....</p>	71
2	<p><i>Penicillium</i> sp. A) Colonias en CYA, B) Colonias en MEA, C) Conidios; D, E) Fiálide en forma de botella más un conidio apical, F) Métulas, G) Ramas de conidióforo, H) Tallo del conidióforo con ornamentaciones. Las ampliificaciones D-G fueron a 100X y la C fue a 40X. Barra en micrómetros (G). Barra en micrómetros (C).....</p>	76
3	<p>Síntomas de infección causados por cinco aislamientos de <i>Penicillium</i> a los 30 días de inoculación en cormos de la variedad Borrega Roja en comparación al testigo no infectado y que además produjo un nuevo cormo sano (A). Aislamientos 14 y 15 de <i>P. brevicompactum</i> (B-C) con moderada y alta agresividad por su porcentaje de área de infección; y 10, 11, 17 de <i>P. sp.</i> (D-F) con baja a moderada agresividad. Ninguno de los cormos infectados produjo un nuevo cormo (B-F).....</p>	78
4	<p>Árbol filogenético que muestra el alineamiento de cinco secuencias por ampliificación del gen Bt1 de aislamientos de cormos de almacén con pudrición seca (en azul), y la secuencia por ITS (DQ279802) de un estudio previo (González-Pérez <i>et al.</i>, 2009). El árbol se construyó de acuerdo al método de Neighbor-Joining, Kimura 2-parameter, con 5000 réplicas, bootstrap, de confidencia del programa MEGA versión 5 software. Las raíces del árbol fueron secuencias del banco de genes: <i>Celoporthe</i> sp (HQ730818) para el gen Bt2 y <i>A. tenuissima</i> (AF347032) para las regiones internas ITS. Las otras secuencias en bold normal fueron del NCBI. La barra (0.2) indica la distancia genética de acuerdo al método de Neighbor-Joining.....</p>	80

FENOLOGÍA, PROPAGACIÓN *IN VITRO* Y ENFERMEDADES DEL GLADIOLO EN SAN MARTÍN TEXMELUCAN, PUEBLA

Enrique González Pérez, Dr.

Colegio de Postgraduados, 2011

En San Martín Texmelucan, Pue., el gladiolo (*Gladiolus grandiflorus* Hort.) es uno de los cultivos de mayor importancia. En los últimos años ha presentado problemas en su producción, principalmente causados por hongos fitopatógenos y por un desbalance nutrimental. Esta investigación se dividió en tres partes. En la primera el objetivo fue conocer el efecto de la fertilización en la fenología, crecimiento, calidad de flor, rendimiento y sanidad del cultivo de dos variedades de gladiolo; en la segunda se estudió la reproducción *in vitro* de plantas de gladiolo libres de hongos fitopatógenos, y determinar el mejor ambiente de aclimatación, y en la tercera se identificaron morfológica y molecularmente las especies de *Penicillium* causantes de la pudrición del cormo en almacén. En la primera parte se encontró que las dosis de fertilización usadas no afectan la fenología, el rendimiento, y tampoco la calidad de la flor del gladiolo; y que las dosis bajas de nitrógeno (40 kg ha⁻¹) combinadas con aportaciones de boro y azufre reducen la mortandad de plantas (4.8 %) sin afectar el desarrollo del cultivo. En el segundo estudio se obtuvieron plantas sanas de gladiolo a partir de meristemos apicales cultivados en el medio de Murashige y Skoog adicionado con 0.2 mg L⁻¹ de la auxina ácido naftalenacético y el mejor ambiente de aclimatación de las plántulas (95 % de supervivencia) fue en malla sombra 75 % que generó las condiciones de 16.8 °C y HR de 52.4 %. En la tercera parte se identificaron dos especies que mostraron ser responsables de la pudrición seca del cormo en almacén, *P. brevicompactum* que se reporta por primera vez en México y en el mundo en cormos de gladiolo, y *P. sp.* Con base en lo anterior se concluye que es posible la producción de gladiolo de alta calidad con las metodologías propuestas en esta investigación.

Palabras clave: gladiolo, fenología, *in vitro*, patógenos.

**PHENOLOGY, *IN VITRO* PROPAGATION AND GLADIOLUS DISEASES IN SAN
MARTÍN TEXMELUCAN, PUEBLA**

Enrique González Pérez, Dr.

Colegio de Postgraduados, 2011

In San Martín Texmelucan, Pue., the gladiolus (*Gladiolus grandiflorus* Hort.) is one of the more important crops. Since years ago, this crop has production problems, which are mainly caused by fungal pathogens and nutritional imbalance. This research was divided into three parts. In the first one the objective was to determine the effect of fertilization on the phenology, growth, flower quality, performance and health of the cultivation of two gladiolus varieties; in the second part was studied *in vitro* the reproduction of gladiolus plants free of phytopathogenic fungi and established an environment of acclimatization, and the third and last objective was to identify morphological and molecularly species of *Penicillium* causing corm rot in storage. In the first part was found that the fertilization does not affect the phenology, yield and quality of gladiolus flowers, and therefore low doses of nitrogen (40 Kg ha^{-1}) combined with contributions from boron and sulfur, the plants reduce mortality (4.8 %) without affecting crop development. In the second study healthy gladiolus plants were produced from apical meristems by using Murashige and Skoog medium supplemented with 0.2 mg L^{-1} of auxin naphthalenacetic acid. The best environment acclimatization where 95% of seedling survived was obtained under 75 % shading net, $16.8 \text{ }^{\circ}\text{C}$, and relative humidity of 52.4 %. In the third and last part, two *Penicillium* species showed to be responsible for dry rot of stored corms. The first one, *P. brevicompactum* is reported for first time in México and worldwide; and the second one, *P. sp.* will be defined with kind collaboration of an expert of the IMA (International Mycological Association), and besides also involving some other gene analysis such as Beta tubulin2. Thus, we concluded that it is possible to produce high quality gladiolus with the methodologies above developed in this research.

Key words: gladiolus, phenology, *in vitro*, pathogens.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN GENERAL

Las ornamentales están entre las especies agrícolas con el mayor valor de la producción por hectárea y producen una derrama económica importante, debido a la inversión en infraestructura, insumos y mano de obra necesarios para su cultivo (Flores-Almaraz y Lagunés-Tejeda, 1998). En particular, el gladiolo (*Gladiolus grandiflorus* Hort.) es mundialmente apreciado como flor de corte, debido a sus colores y estética de la espiga floral. Su propagación es vegetativa mediante una estructura llamada cormo, producido y exportado principalmente por Holanda.

Holanda y otros países de Europa, así como Brasil y México en América son productores de flor de gladiolo para exportación (Chandel y Deepika, 2010). En México, el gladiolo ocupa el tercer lugar en importancia, con 2.2 mil hectáreas sembradas, después de la rosa (*Rosa* spp.) y el crisantemo (*Chrysanthemum* spp.). Los principales estados productores son: Puebla (San Martín Texmelucan y Atlixco, donde se siembra 54 % de la producción nacional), estado de México (Chalma, Malinalco, Valle de Bravo y Villa Guerrero), Michoacán, Morelos y Veracruz (SIAP, 2010).

En la región de San Martín Texmelucan, Puebla, entre los cultivos de importancia económica está el gladiolo, que es una ornamental de flor de corte, misma que se exporta mínima cantidad y se consume en el mercado nacional (Palacios, 1992). En esta región el gladiolo se cultiva de marzo-octubre por los requerimientos climáticos del cultivo. Las variedades de más importancia económica regional son: Amarilla, Borrega Blanca, Borrega Roja, Espuma, Grand Prix, Lupe y Maravilla. Dentro de las limitantes de producción se encuentran las plagas, enfermedades y malezas. En los últimos diez años se han registrado bajas en la producción debido a la enfermedad conocida como pudrición del cormo, la cual limita la cantidad de la flor de corte, de cormo, y reduce su producción en 70 % (González-Pérez *et al.*, 2009).

En la actualidad, en esta zona, los productores de este cultivo cuentan con poca información científico-técnica sobre su el desarrollo y manejo, por lo cual existe la

necesidad de conocer su fenología, fisiología y la manera de evitar pérdidas en producción y calidad, tanto en flor cortada como en cormo (semilla vegetativa). El conocimiento de la fenología permite aplicar prácticas preventivas y oportunas, de tal forma que se pueda hacer eficiente el proceso de producción y asegurar la alta calidad del producto. En el gladiolo, esto podría disminuir las pérdidas por estrés abiótico que afectan el crecimiento y desarrollo del cultivo, y bióticos que reducen la calidad sanitaria del cormo. Además, se requieren establecer métodos de multiplicación masiva de cormos certificados que garanticen su calidad sanitaria y una opción es la reproducción vegetativa *in vitro* (Emek y Erdağ, 2007). Por lo que, se requiere establecer el procedimiento y ambiente más apropiado (humedad relativa, humedad del suelo, nivel de irradiancia, y la temperatura de planta y aire) para aclimatar las plantas al invernadero y/o campo y propiciar su desarrollo (Steinitz *et al.*, 1991; Roy *et al.*, 2006).

Además de los problemas del cormo en campo, en almacén los cormos pueden ser podridos por especies de *Penicillium*. Este patógeno ha sido el responsable principal de pudrición del cormo en todos los países donde se almacenan cormos (Farr *et al.*, 1989). Tales especies de *Penicillium* se encuentran en el suelo y contaminan los cormos que son transportados y almacenados en inapropiadas condiciones de temperatura y humedad, lo que propicia y difunde la pudrición del cormo en almacén. En campo, el cormo madre infecta la base del nuevo cormo y de ahí el síntoma de pudrición avanza al corazón del cormo causando su destrucción, y por consiguiente, la marchitez y muerte de la planta que se reporta de un 15 % por *Penicillium* (Jackson, 1961). En la región de San Martín Texmelucan, Pué., pérdidas por pudrición del cormo en almacén se han estimado de 30 a 50 % (comunicación personal del Presidente de Asociación de Agricultores de Gladiolo). En base a lo anterior, se llevó a cabo esta investigación para: a) evaluar el efecto de la fertilización en la fenología, crecimiento, calidad de flor, rendimiento y sanidad de cultivo de dos variedades de gladiolo cultivadas a campo abierto en San Martín Texmelucan, Puebla. b) Reproducir vegetativamente *in vitro* plantas de gladiolo libres de hongos fitopatógenos y determinar un ambiente de aclimatación en invernadero. c) Además de identificar las especies de *Penicillium* causantes de la pudrición del cormo.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar los factores del crecimiento y desarrollo de dos variedades de gladiolo en campo e *in vitro* y su relación con la presencia de patógenos del cormo.

Objetivos específicos

- Evaluar el efecto de la fertilización en la fenología, crecimiento, calidad de flor, rendimiento y sanidad de cultivo de dos variedades de gladiolo cultivadas a campo abierto en San Martín Texmelucan, Puebla.
- Reproducir vegetativamente *in vitro* plantas de gladiolo libres de hongos fitopatógenos y determinar un ambiente de aclimatación en invernadero.
- Identificar las especies de *Penicillium* causantes de la pudrición del cormo en almacén.

Hipótesis

- La dosis óptima de fertilización disminuye la incidencia de enfermedades del gladiolo sin afectar su desarrollo fenológico, la calidad de flor y el rendimiento del cultivo.
- Por el cultivo *in vitro* se obtienen plantas libres de fitopatógenos y cormo de alta calidad.
- Las especies de *Penicillium* causantes de la pudrición del cormo en México son varias.

CAPITULO II

REVISION DE LITERATURA

2.1. ORIGEN E IMPORTANCIA.

2.1.1. Origen del cultivo.

El gladiolo (*Gladiolus grandiflorus* Hort.), es una de las flores más importantes en el mundo. Es originario de la cuenca mediterránea y de Sudáfrica. Comprende 160 especies nativas de África, Arabia, Europa, Madagascar y Oeste de Asia, donde el gladiolo crece espontáneamente; aunque la mayor parte son de origen africano (De Hertog y Le Nard, 1993). *Gladiolus* es el diminutivo de *gladius*, que significa "espada". Este nombre se refiere a la forma de la hoja que es lanceolada (termina en punta), y que la flor (en la época de los romanos) era entregada a los gladiadores que triunfaban en la batalla, por eso, la flor es el símbolo de la victoria. Los cultivares hortícolas del gladiolo se han obtenido desde comienzos del siglo XIX por cruzamientos entre diversas especies y presentan gran diversidad de tamaños, colores, forma de las flores, y época de floración (Larson, 1992; Vidalie, 2001).

2.1.2. Importancia económica y distribución geográfica.

Es un cultivo muy importante en Francia y Holanda. Los cormos son importados principalmente de Holanda, aunque, en los últimos años Brasil se ha convertido en un destacado productor de cormos. Gracias al desarrollo tecnológico de conservación de cormos, en Holanda es posible el suministro de cormos en cualquier época del año. En México, esta especie ocupa el tercer lugar en importancia, con 2.2 mil ha sembradas, después de la rosa y el crisantemo (SIAP, 2010). Los principales estados productores son: Puebla (San Martín Texmelucan y Atlixco) donde se siembra 26 % de la producción nacional, Estado de México (Chalma, Malinalco, Valle de Bravo y Villa Guerrero), Michoacán, Morelos y Veracruz. De estas regiones, San Martín Texmelucan en el Estado de Puebla, es la principal zona productora de gladiolo en el estado de Puebla, con 55 % de la superficie sembrada en 2009 (SIAP, 2010).

2.2. TAXONOMÍA Y MORFOLOGÍA.

Los gladiolos (*Gladiolus x hybridus*, *G. x hortulanus*, y *G. x grandiflorus*) pertenecen a la familia “Iridaceae”. Son plantas herbáceas que se desarrollan a partir de un tallo subterráneo llamado cormo. El gladiolo se caracteriza por su inflorescencia en espiga y el reemplazo anual del cormo, que durante el desarrollo vegetativo dan un promedio de 8-15 "cormillos" por cormo dependiendo de la variedad (Cohat, 1993).

2.2.1. Cormo.

Tubérculo caulinar de orientación vertical, de estructura sólida, forma redondeada algo achatada, y con el ápice de crecimiento en el centro de la zona superior (Figura 1). Puede durar uno o varios años, renovándose sobre el cormo anterior, cuyos restos permanecen en la base del nuevo. Esta estructura está formada por varios nudos, de cuyas yemas axilares se forman nuevos cormos (Buschman, 1989; Cohat, 1993).

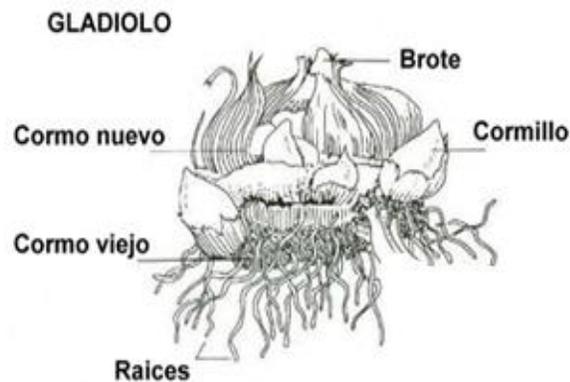


Figura 1. Estructuras de un cormo (Vidalie, 2001).

2.2.2. Cormillos.

Se emplean en la obtención de nuevos cultivares. Son pequeños cormos de 2 - 3 cm de diámetro y crecen en la periferia del cormo renovado y el cormo viejo (Figura 1). Se forman durante el ciclo de desarrollo normal de un cormo (Buschman, 1989; Cohat, 1993).

2.2.3. Hojas.

Las hojas son alargadas, paralelinervas y lanceoladas, y están recubiertas de una cutícula cerosa. Las hojas inferiores están reducidas a vainas y las superiores son de lineales a estrechamente lanceoladas (Figura 2). Todas las hojas salen de la base y varían de una a doce (Vidalie, 2001).



Figura 2. Hojas y botones florales del gladiolo.

2.2.4. Flores.

La inflorescencia es una espiga larga con 12-20 flores. Las flores son bisexuales, sésiles, cada una rodeada de una bráctea y una bractéola. Perianto simétrico bilateral con seis lóbulos algo desiguales (Figura 2). Androceo con tres estambres naciendo en el tubo del perianto y estilo trifido en el ápice (Larson, 1992).

2.2.5. Floración.

El gladiolo comienza a formar la espiga floral entre las cuatro y seis semanas después de la plantación. A temperatura de 28 °C se obtiene una floración muy precoz, pero se corre el riesgo de que aborten algunas flores (Vidalie, 2001).

2.2.6. Variedades.

A finales de la década de los 80's existían más de 3,000 variedades de gladiolos de las cuales se aprovechan aproximadamente 300 en la producción comercial (Leszczyńska y

Borys, 1994). Algunas variedades de gladiolo se pueden dividir en función de su precocidad. Las variedades suelen tener sus ciclos en función de las estaciones del año y de la temperatura media de cultivo (depende de los meses en caso de cultivos al aire libre o de las condiciones de cultivo en invernadero) (Buschman, 1989).

2.3. REQUERIMIENTOS EDÁFICOS Y CLIMÁTICOS.

2.3.1. Temperatura.

La temperatura ideal del suelo es de 10-12°C, las superiores a 30 °C en el suelo son perjudiciales para esta planta. Respecto a la temperatura ambiental, las temperaturas óptimas para su desarrollo son de 10-15 °C por la noche y de 20-25 °C por el día. La formación del tallo floral tiene lugar desde los 12 hasta los 22 °C (Vidalie, 2001). La inducción y la diferenciación floral se producen después de la plantación de los bulbos, cuando aparece la tercera o cuarta hoja, es decir; después de 4 a 8 semanas, esta duración varía en función de la temperatura y no de la luz. La ruptura de la latencia es un fenómeno complejo y se realiza generalmente por frío. Por regla general, la germinación es más rápida a bajas temperaturas (inferior a 10 °C), y se detiene a partir de 20 °C. La temperatura mínima biológica es de 5-6 °C (López, 1989).

2.3.2. Iluminación.

El gladiolo florece cuando los días son mayores de 12 horas (fotoperíodo de día largo), y requiere bastante luminosidad o las plantas no florecen (Vidalie, 2001).

2.3.3. Humedad relativa.

La humedad ambiental debe ser constantemente, comprendida entre 60-70 %. Humedad inferior al 50 % provoca que el crecimiento sea más lento, y favorece el desarrollo de la plaga de la araña roja. Un exceso de humedad produce alargamiento en la planta y se presenta pudrición del cormo (Larson, 1992).

2.3.4. Suelo.

El cultivo se desarrolla bien en suelos arenosos con aportaciones de estiércol. Los suelos arcillosos necesitan tener un buen drenaje para evitar encharcamientos y enfermedades. La cal y la materia orgánica ayudan, siempre que está última esté en estado humificado. El pH óptimo está entre 6 y 7. De 6.8 a 7.2 se inhibe el desarrollo de *Fusarium* por la alcalinidad (Engelhard, 1989; Vidalie, 2001).

2.4. LABORES CULTURALES

2.4.1. Propagación del cormo.

Los cormos pueden ser de cualquier calibre (2-5 cm de diámetro), se siembra en dos filas con separación entre líneas de 3-5 cm, y entre cormo de 3-6 cm, se entierran a una profundidad media de 7-10 cm. Con un intervalo de densidad de 300,000 a más de 600,000 cormos ha⁻¹ (Buschman, 1989).

2.4.2. Producción de flor de corte.

Se emplean cormos de 4.5-6.5 cm de diámetro. La producción de flores exige terrenos nuevos o de una larga rotación mínimo siete años con base a que los suelos quedan infestados por patógenos del cormo (González *et al.*, 2009a). Esto se puede reducir a tres años desinfestando el suelo, pero resulta muy costoso. Para obtener flor todo el año al aire libre, se realizan plantaciones escalonadas de marzo a junio en regiones donde no se presentan heladas tempranas. La distancia entre plantas es de 3-8 cm y entre surcos de 45-60 cm. Se recomienda una profundidad de siembra de 7-10 cm, para asegurar una mayor resistencia al viento y evitar que las plantas se acamen en la floración (Larson, 1992). En la región de San Martín Texmelucan, Puebla el ciclo del cultivo dura entre 4 y 6 meses dependiendo la variedad.

2.5 ENFERMEDADES FUNGOSAS

En México, el gladiolo se cultiva con rotaciones periódicas en las diferentes áreas, por el problema de enfermedades fungosas de gran persistencia en el suelo, causadas por

patógenos como *Fusarium* y *Stromatinia*. De manera que, si un cormo se encuentra sano y se cultiva en un suelo infestado las plantas enfermaran. Según Gardezi *et al.* (2001), Leyva (1992) indica que la pudrición del cormo y raíz, y el marchitamiento vascular del gladiolo en México está asociado a *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli*, que es el patógeno más importante de este cultivo cuyo fin es la producción de cormo y flor en general su manejo debe ser cuidadoso para evitar enfermedades de tipo viroso, fungoso y bacteriano (Palacios, 1992). En el Cuadro 1, se enlistan todos los hongos fitopatógenos reportados mundialmente como causantes de enfermedad en el gladiolo.

Cuadro 1. Hongos reportados a nivel mundial en el cultivo de gladiolo.

Hongo patógeno	Tallo y hoja	Cormo
<i>Acremonium strictum</i> Grütz [†]		X
<i>Alternaria</i> sp.*	X	
<i>Botrytis gladiolorum</i> Timmermans*	X	
<i>Curvularia lunata</i> (Wakker) Boedijh [■]	X	
<i>Fusarium oxysporum</i> Schlecht. f. sp. <i>gladioli</i> (Massey) Snayder & Hansen ^{†*}		X
<i>F.</i> sp.*		X
<i>Gliocladium roseum</i> (Link) Bainier [†]		X
<i>Macrophoma elongata</i> (Berk. & Curtis) Berl. & Voglino*	X	
<i>M. gladioli</i> (Cooke) Berl. & Voglino*	X	
<i>Papulaspora</i> sp. [■]		X
<i>Penicillium gladioli</i> McCulloch and Thom*		X
<i>Pythium</i> sp.*		X
<i>Rhizoctonia solani</i> Kuehn [■]		X
<i>Sclerotium rolfsii</i> Sacc*		X
<i>Sclerotinia gladioli</i> (Massey) Drayton*		X
<i>Septoria gladioli</i> Pass*		X
<i>Stromatinia gladioli</i> (Drayton) Whetzel [■]		X
<i>Urocystis gladiolicola</i> Ainsw*	X	

*Farr *et al.*, 1989; [†]González *et al.*, 2008; Hubert and Wheeler, 1950.

Los hongos fitopatógenos de mayor importancia causantes de enfermedades en gladiolo en la región de San Martín Texmelucan, Pue., se describen a continuación.

2.5.1. *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli*

En la región de estudio se ha reportado a *F. oxysporum* f. sp. *gladioli* como el principal causante de la pudrición del cormo en campo (González-Pérez *et al.*, 2009a). Esta especie produce abundantes micro-conidios generalmente unicelulares, ovoides, ovalados, de 5-11 x 2.5-4.2 μm ; y macroconidios de 25-45 x 3.5-4.8 μm , de cuatro a siete septos, cilíndricos en la parte central, y curvados. Produce clamidosporas globosas, de paredes lisas y rugosas, intercalares o terminales, y comúnmente presentes en conidios; y esporodoquios de aproximadamente 2.0 mm de diámetro (Massey, 1926). Generalmente las colonias son de color blanco y algo algodonosa y de color rosa, ocre rosa, púrpura o violeta, y salmón dependiendo del medio de cultivo (Romero, 1993; McCulloch, 1944). Este hongo permanece en el suelo y sobrevive en restos de plantas infectadas en forma de micelio, o en cualquiera de sus formas de esporas, pero con mayor frecuencia se encuentra en forma de clamidosporas en regiones frías. La infección de la planta sana se produce por medio de los tubos germinales de las esporas o el micelio. Estas penetran a la planta directamente por heridas en la zona de alargamiento del tallo basal en el caso de gladiolo. En general, el micelio del hongo se propaga internamente a través de la corteza hasta llegar a los vasos del xiléma, lo que causa que el sistema vascular se obstruya y tome una coloración marrón o negra (Agrios, 2005).

Los síntomas en gladiolo en condiciones de alta humedad y temperatura de 25 °C son marchitez, amarillamiento de las hojas, reducción del número de flores, y en los cormos se observa pudrición en la zona de los anillos concéntricos que lo estructuran; y las lesiones inician en la parte inferior de éste, justo donde inician las raicillas del corazón. Es común que al extraer la planta seca ya no exista el cormo por su total pudrición o se encuentren sólo vestigios de éste (López, 1989).

2.5.2 *Penicillium* sp

Raper and Thom (1949) mencionan que *P. gladioli* causa pudrición en cormos almacenados, y según la revisión de literatura de Romero (1993), las pérdidas económicas son muy altas. Leyva (1992) indica que la enfermedad se conoce como “pudrición del cormo” por ser la única parte vegetal atacada en almacenamiento en condiciones de humedad del 80 % y temperatura de 24 °C. Esta especie produce conidióforos largos, ramificados (una o dos ramas y con paredes rugosas), penicilados, y fiálides terminales (Romero, 1993). Conidios en largas cadenas (fácilmente se desprenden), globosos, subglobosos, hialinos, y en masa de color verde oscuro, lisos, y de 2.8-3.6 x 2.5-3.0 µm (Raper and Thom, 1949). La infección ocurre en la base del cormo nuevo y en la superficie del cormo viejo, causando lesiones de color café oscuro a negro en los tejidos superficiales.

La pudrición puede avanzar desde la superficie hasta la parte central del cormo o corazón, y como consecuencia hay destrucción y marchitez del meristemo apical. En campo puede causar el 15 % de la pudrición del cormo de las plantas, el cormo se va secando gradualmente y produce costras de color café claro, y las hojas en contacto con el suelo llegan a desarrollar áreas necróticas de color café y se marchitan (Jackson, 1961).

2.6. FERTILIZACIÓN.

El uso adecuado de dosis de fertilización para la producción de cormo y flor de corte de gladiolo ha sido reportado por diversos autores (Littrell y Waters, 1967; Magie y Cowperthwaite, 1952; Woltz, 1954). La fertilización es una de las prácticas de manejo que más influye en el éxito del cultivo del gladiolo, y es necesario que los fertilizantes se apliquen en dosis correctas para que estas se distribuyan y ajusten los requerimientos del gladiolo en cada etapa de su crecimiento y desarrollo (Gowda *et al.*, 1988; Stewart *et al.*, 2005). El suministro de nutrimentos es indispensable para la obtención de cormos y flores de calidad comercial.

El gladiolo obtiene gran parte de sus necesidades nutrimentales del cormo; cuanto más grande sea éste menores serán sus necesidades de fertilizante. Se aconseja fraccionar la fertilización en las siguientes fases: a) plantación, b) emisión de la segunda hoja, c) emisión de la cuarta hoja, d) al inicio del espigamiento (Larson, 1992). Algunos autores

recomiendan de forma general aplicar al cultivo de gladiolo 1.0 kg de abono amoniacal ($\text{NH}_4 \text{NO}_3$) por cada 15 m^2 en terrenos arcillosos con poca materia orgánica (Vidalie, 2001). En el caso de terrenos francos se recomienda aplicar entre 600 y 700 kg ha^{-1} de superfosfato de calcio simple [$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$] (Larson, 1992).

Es un cultivo que requiere dosis altas de nitrógeno (N), aunque algunas variedades son más demandantes. El N es un nutrimento esencial para el desarrollo y diferenciación del tallo floral el exceso favorece el desarrollo vegetativo en detrimento del tamaño de las inflorescencias. Por otra parte, la carencia de nitrógeno se traduce en un menor número de flores y en inflorescencias de menor tamaño, y en casos extremos, las hojas viejas se tornan amarillentas. El fósforo (P), importante en la elongación del tallo floral y en la acumulación de materia seca de cormo. El P requiere que su aplicación se equilibre con el nitrógeno a razón de 3N:1P (Vidalie, 2001). Los síntomas de deficiencia de P se pueden detectar por una coloración violácea de las hojas. En caso de emplear fertirrigación la dosis de abonado disminuye considerablemente, y el equilibrio de abonado varía según las diferentes etapas fenológicas del cultivo. El potasio (K), incrementa el número de cormillos y aumenta el tamaño del cormo madre y su uso debe estar en una relación de tipo 1N - 3P - 0.5K. Posteriormente se aumenta el nitrógeno (1-0.5-1) y a la salida de la espiga, se incrementa el potasio (1-0-2). Las cantidades totales a aportar son 70 N - 50 P_2O_5 - 80 K_2O kg ha^{-1} (Vidalie, 2001).

La concentración del fertilizante para el caso de utilizar fertirriego no debe superar 0.2 g de N L^{-1} por aplicación, porque puede ocasionar toxicidad en las plantas (Larson, 1992; Vidalie, 2001). El calcio (Ca), determinante en la aparición de la espiga y formación de botones florales. El magnesio (Mg), ayuda a la formación de la espiga floral y genera la energía necesaria para la formación del nuevo cormo. El azufre (S) es requerido durante el desarrollo del cultivo, debe estar en balance con N en la relación (3N-1S), además de ayudar a disminuir la pudrición del cormo (González *et al.* 2009b; Hernández *et al.*, 2008; Tamura, 1959).

En la aplicación de macro-nutrientes, por lo general se recomienda mantener el equilibrio en la fertilización, en la que se aporta como abonado de fondo 500 kg ha^{-1} de superfosfato de calcio simple + 500 kg ha^{-1} de sulfato de potasio, después de realizar las labores de preparación de suelo para siembra. En el abonado de mantenimiento se aportarán

200 kg ha⁻¹ de nitrato de potasio un mes después de la plantación. Se recomienda evitar las aplicaciones excesivas de nitrógeno, para evitar el estímulo del desarrollo de *Fusarium* (Agrios, 2005; Engelhard, 1989). En suelos ácidos no se puede emplear superfosfato de calcio simple y la fuente de fósforo debe ser el fosfato amónico, debido a que en este tipo de suelos la liberación del flúor contenido en el superfosfato de calcio simple se libera rápidamente, causando toxicidad en las plantas de gladiolo (Vidalie, 2001).

En cuanto a los micro-nutrientes, la deficiencia más común es el hierro manifestándose en una coloración verde pálida cercana al blanquecino y se corrige fácilmente con quelatos de hierro. El boro (B) es requerido durante el desarrollo del cultivo, es necesario para la formación de cormillos y hojas, además de que ayuda a disminuir la pudrición del cormo. La deficiencia de B hace que las hojas se partan por los bordes y que disminuya el tamaño de la inflorescencia. El gladiolo es muy sensible al exceso de fluoruros, que es un componente del superfosfato de calcio simple y su toxicidad se manifiesta por un pardeamiento en las puntas de las hojas y de la espiga. La caliza neutraliza los efectos perjudiciales de los fluoruros al alcalinizar los suelos y reducir la liberación del flúor (González *et al.*, 2009b; Vidalie, 2001).

La fertilización no solo tiene como fin proveer de nutrientes a los cultivos cuando el suelo no es capaz de hacerlo, sino que también constituye una herramienta eficaz para prevenir o reducir la incidencia de enfermedades. Melgar *et al.* (2001), realizó ensayos en donde se evaluó el efecto de la fertilización potásica y clorada sobre la incidencia de enfermedades foliares en trigo y confirmó que el cloro (Cl) tiene efecto preventivo sobre las enfermedades foliares del trigo. La fertilización con cloro ha sido relacionada con la reducción de la incidencia de diferentes enfermedades como fusariosis (*Fusarium* sp.). La fórmula de fertilización que aplicó fue 100 N-46 P₂O₅-20 S por hectárea, y encontró que la fertilización con azufre fue efectiva para el control de la pudrición de la raíz del trigo causada por *Fusarium* sp. Por otra parte, el B a concentración no mayor a 2.0 kg ha⁻¹ puede ser efectiva en el control de la pudrición del cormo (González *et al.*, 2009b).

Para el caso del N, este nutriente en su forma NO₃ favorece el desarrollo de *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli* (Engelhard, 1989). Sin embargo con la presencia del B y el suficiente calcio para neutralizar el pH (6.5 – 7.5) se inhibe el desarrollo de *Fusarium* (Engelhard, 1989; González *et al.*, 2009b)

En la región de San Martín Texmelucan, Pué., los productores de gladiolo utilizan dosis de Nitrógeno superiores a los 200 kg ha⁻¹, lo que causa problemas de salinidad en los suelos y aumenta la incidencia de enfermedades (González *et al.*, 2009b). La fórmula de fertilización utilizada por algunos productores es de 81 N – 24 P₂O₅ – 171 K₂O – 23 MgO - 37.2 CaO kg ha⁻¹ para una densidad de población de 200,000 plantas ha⁻¹ (comunicación personal con productores).

2.7. CALIDAD DE SEMILLAS

La expresión calidad de semillas es usada libremente para reflejar el valor global de la semilla para la cual fue producida. La semilla es una mezcla de propiedades fisiológicas, morfológicas y ambientales.

2.7.1 Producción comercial de semillas

La producción comercial de semillas es una industria grande y especializada. La semilla comercial se produce principalmente en zonas donde las condiciones ambientales aseguren un medio relativamente satisfactorio para la obtención de semillas. Entre los factores que influyen en la producción de semillas se incluyen no sólo las ambientales para asegurar el completo desarrollo y maduración de las semillas, sino también el estado de los suelos en relación con los nutrientes que puede modificarse con la aplicación de macro y micronutrientes necesarios. La recolección de las semillas se debe realizar con extremo cuidado para no dañar a la semilla (embrión), así como también para evitar la presencia de patógenos dentro de un lote de semillas.

El manejo de la cosecha comprende varios pasos: determinación del estado apropiado para la cosecha, recolección de la semilla, extracción de los cormillos del corno madre, limpieza del corno madre y almacenamiento. Si la semilla es colectada demasiado temprano es posible que la semilla resulte delgada, ligera y arrugada y de mala calidad física y fisiológica. Si la cosecha se retrasa demasiado, los cormillos se desprenden y su cosecha se dificulta al ser más el tiempo que se usa en la recolección. La semilla después de colectada se clasifica y se almacena, para lo cual se debe bajar el contenido de humedad de la semilla evitando que sea atacada por patógenos durante el almacenamiento.

El uso adecuado de las técnicas de propagación de semillas, permite tener semillas que reproducen las características de la variedad que se desea propagar, y se logra una semilla viable y capaz de germinar. La calidad de la semilla (cormo) del gladiolo está determinada por los factores físicos, fisiológicos y sanitarios. La viabilidad del cormo disminuye conforme avanza el tiempo, los cormos que no son almacenados a temperaturas frescas (5°C) en un lapso de ocho meses pierden su vigor, y se obtiene entre el 60 y 40 por ciento de germinación (De Hertog and Le Nard, 1993). La viabilidad que tendrá el cormillo es determinada por factores de producción, métodos de manejo y la tasa de deterioro, algunas variedades de gladiolo son de vida corta y pierden su viabilidad con rapidez. La viabilidad de los cormos se ve afectada por el contenido de humedad durante el almacenamiento, las fluctuaciones en el contenido de humedad de la semilla reducen la longevidad.

2.7.2 Categorías de semilla (SAGARPA, 2007)

Semilla original. Esta semilla constituye la fuente inicial para la producción de semillas de las categorías Básica, Registrada y Certificada y es el resultado de un proceso de mejoramiento o selección de variedades vegetales. La semilla original conserva los caracteres pertinentes con los que la variedad fue inscrita en el Catálogo Nacional de Variedades Vegetales.

Semilla calificada: es aquella cuyas características de calidad han sido calificadas por la Secretaría o por un organismo de certificación acreditado y aprobado para tal efecto, mediante el procedimiento que se establece en la ley de semillas. La semilla calificada se clasifica en las categorías Básica, Registrada, Certificada y Habilitada.

Semilla básica: La que conserva un muy alto grado de identidad genética y pureza varietal, proviene de una semilla Original o de la misma Básica y es producida y reproducida o multiplicada cumpliendo con las reglas a que se refiere la ley federal de producción, certificación y comercio de semillas.

Semilla registrada: La que conserva un alto grado de identidad genética y pureza varietal, proviene de una semilla Original, Básica o Registrada y es producida y reproducida o multiplicada de acuerdo con las reglas a que se refiere la ley federal de producción, certificación y comercio de semillas.

Semilla certificada: La que conserva un grado adecuado y satisfactorio de identidad genética y pureza varietal, proviene de una semilla Original, Básica o Registrada y es producida y reproducida o multiplicada de acuerdo con las reglas a que se refiere la ley federal de producción, certificación y comercio de semillas.

Semilla habilitada: semilla cuyo proceso de propagación o producción no ha sido verificado o habiéndolo sido, no cumple totalmente con alguna de las características de calidad genética, física, fisiológica o fitosanitaria. Es lo que anteriormente se denominaba una semilla apta para siembra, que generalmente es grano y que se habilita como semilla por déficits en la producción de semilla calificada; debido a cuestiones de tipo fitosanitario o alguna otra causa de fuerza mayor o es semilla que estaba produciéndose bajo la supervisión del SNICS o algún otro organismo acreditado, pero que no cumplió con los estándares respectivos para ser etiquetada como una semilla de categoría certificada

Semilla declarada: semilla con características de calidad no calificadas por la Secretaría ni por un organismo de certificación acreditado y aprobado para tal efecto; dicha calidad es informada directamente por el productor o comercializador en la etiqueta comercial correspondiente, cuyo contenido está regido por el artículo 33 de la nueva ley de semillas.

2.7.3. Parámetros de certificación de semilla (SAGARPA, 2007)

Calidad Física: Medida de la pureza física de la semilla, se expresa como el porcentaje del peso que corresponde a la semilla de la especie, con respecto al peso total de la muestra de un determinado lote.

Calidad Fisiológica: Medida de la capacidad de la semilla para producir material de propagación fisiológicamente viable, se expresa como el porcentaje de semilla fisiológicamente viable, con respecto al total de la muestra de un lote.

Calidad Fitosanitaria: Medida de la sanidad de la semilla que evalúa y determina la presencia o ausencia de organismos patógenos en el lote de semillas.

Calidad Genética: Medida de la identidad genética de la semilla, se expresa como el porcentaje de semillas viables que se identifican con respecto a los caracteres pertinentes de la variedad vegetal.

2.8. CULTIVO *IN VITRO* (CTV)

En 1904 Hanning desarrolló un nuevo método de cultivo de plantas al que se llamó cultivo de embriones. Aisló *in vitro* embriones inmaduros de algunos miembros de la familia Crucíferae, obteniendo plántulas viables (Villalobos, 1990).

El nombre de cultivo *in vitro* (cultivo en vidrio), se utilizó porque, inicialmente, se usaron recipientes de vidrio para el cultivo. Así que el término cultivo *in vitro* puede definirse como el cultivo en un medio nutritivo, en condiciones estériles, de plantas, semillas, órganos, explantes, tejidos, células y protoplastos de plantas superiores. Esta técnica se caracteriza por:

- Producción a micro-escala.
- Optimiza las condiciones ambientales, en lo que se refiere a factores físicos, nutricionales y hormonales;
- Excluye todos los microorganismos (hongos, bacterias y virus), así como también las plagas de las plantas superiores (insectos y nematodos).

Los cultivos *in vitro* pueden iniciarse a partir de cualquier parte de la planta (tallo, hoja, semilla, fruto, embrión, cotiledones, raíz, etc.). Comúnmente se selecciona aquellas partes de la planta que se encuentran en división activa, como la región meristemática. Se utilizan pequeños segmentos de tejido inoculados en medios semisólidos, en los cuales, dependiendo de los reguladores de crecimiento utilizados, es posible inducir con cierta facilidad la formación de

callos (Ochoa, 1990). Generalmente no se reproducen plantas bajo el patrón normal de desarrollo. El resultado es un tejido aislado que puede dar origen a un callo o puede desarrollar otras formas poco usuales (formación de órganos, embriogénesis somática). La capacidad de cultivar protoplastos o células individuales permite manipulaciones que antes eran imposibles. Siendo el fundamento teórico del cultivo *in vitro* el concepto de la totipotencialidad celular (Villalobos, 1990).

White en 1932, logró el primer cultivo *in vitro* estable utilizando en sus experimentos ápices de raíces de jitomate. Los tejidos meristemáticos del ápice radical propiciaron crecimiento longitudinal de los mismos en el medio de cultivo. La falla en los intentos realizados por varios investigadores entre 1902 y 1932 se debió, como lo menciona White, a la mala elección del material vegetativo y a la simplicidad de los medios de cultivo utilizados. El logro de White, le dio un buen impulso al desarrollo de las técnicas de cultivo *in vitro*. Sin embargo en sus trabajos realizados hasta entonces no obtuvo proliferación celular en forma, los ápices de raíz solo crecen en longitud como lo harían normalmente en la parte de la raíz de la planta (Razdan, 2003).

No fue sino hasta 1934 cuando Gautheret logro proliferación celular *in vitro* en tejidos del cambium provenientes de plantas adultas. En 1939 el mismo Gautheret, (en tejidos de zanahoria) y White (en tejidos de tabaco) publican casi simultáneamente la formación de una masa de células parenquimatosas (callo) a partir de los explantes (tejidos) utilizados en sus experimentos. Este hecho significativo constituyó el despegue de las técnicas de cultivo *in vitro* (Razdan, 2003).

Un factor importante en el desarrollo de las técnicas de cultivo de tejidos vegetales, fue el descubrimiento de los reguladores de crecimiento. Overbeek en 1941 observó el efecto de una sustancia presente en el agua de coco que estimulaba la división celular (citocininas). Cuando el agua de coco se combinaba con 2,4-D, tenía un efecto positivo en el desarrollo de tejidos de zanahoria y papa (Razdan, 2003).

Murashige y Skoog (1962) observaron que el esperma de arenque (), desnaturalizado por calor, tenía un efecto muy marcado en la formación de brotes a partir de tejidos de tabaco. De este ácido desoxirribonucleico (ADN) desnaturalizado Miller *et*

al., (1955) aisló un compuesto de naturaleza purínica denominado 6- furfuril-aminopurina o kinetina.

En 1926 dos científicos japoneses descubrieron un compuesto hormonal, actualmente de uso ordinario en el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales denominado Giberelina, el cual es producido por un hongo *Gibberella fujikouroi*; este compuesto fue descubierto cuando se estudiaba la causa de la pudrición en plántulas de arroz. El efecto que producía dicha sustancia era un alargamiento excesivo en los tallos, sin desarrollo proporcional de la raíz (Razdan, 2003). Actualmente se le atribuyen otros efectos como la inducción de germinación en semillas, brotación en algunos tubérculos como la papa etc.

Altos rendimientos pueden ser obtenidos en cultivo de callo o en cultivo de células en suspensión en comparación con los obtenidos en plantas completas, ya que mediante CTV se tiene la ventaja que no hay problemas de plagas, enfermedades ni cambios climáticos que afecten el rendimiento del producto (Lindsey y Jones, 1992).

El cultivo *in vitro* de gladiolo ha sido reportado por varios autores (Ziv *et al.*, 1970; Simonsen y Hildebrandt, 1971; Hussey, 1977; Ziv, 1979; Ziv, 1989; Steinitz *et al.*, 1991). Sin embargo el trasplante y establecimiento de plántulas producidas *in vitro* no ha sido fácil por la influencia de diversos factores bióticos y abióticos (Dantu y Bhojwani, 1987). Se han encontrado resultados satisfactorios en la generación de nuevas variedades, pero en lo referente a la sanidad del cormo no se ha logrado la total erradicación de los patógenos que se transmiten por medio del cormo (Bajaj *et al.*, 1983).

2.8.1. Efecto de las hormonas en el desarrollo *in vitro* del gladiolo

Las auxinas y citocininas, estimulan la división celular, lo cual tiene efecto estimulante sobre el crecimiento del tallo, y en consecuencia la diferenciación del cambium, del xilema y floema (Taiz y Zeiger, 2002).

En gladiolo el ácido indolacético (AIA), ácido naflaténacético (ANA), ácido diclorofenoxiacético (2,4-D), ácido indolbutírico (IBA), 6-bencilamino purina (BA), Kinetina (Kn) y Zeatina (Za), han resultado ser buenos promotores de la formación del

cormo en el cultivo in vitro (Ziv *et al.*, 1970; Hussey, 1977; Ziv, 1989; Steinitz *et al.*, 1991). Estas auxinas y citocininas promueven la diferenciación del tallo en la capa superficial del explante. Una de las funciones de las auxinas durante la mitosis en la organogénesis es la formación de un número crítico de células en división activa, las cuales son capaces de responder a señales de desarrollo (Hartmann *et al.*, 1990). Estas zonas de división celular resultan de la capacidad misma de células divisorias que existen en el tejido. Inicialmente solo algunas células se vuelven meristemáticas y comienza el desarrollo del tallo, como una pequeña protuberancia de la capa epidermis/sub-epidermis del explante, posteriormente esas protuberancias son precursoras de la formación de estructuras más organizadas (yemas) (Dantu y Bhojwani, 1994; Kumar *et al.*, 1999).

El engrosamiento y alargamiento del tallo es ocasionado por las citocininas (Zeatina o Kinetina) y giberelinas (GA₃) pues promueven la formación del cormo. Las giberelinas promueven la activación de la de α -amilasa que produce azúcar y que es almacenada en las células del tallo basal, al mismo tiempo que las citocininas y auxinas promueven la elongación celular del tallo, que dará como resultado el engrosamiento a sus extremos lo cual induce la tuberización y la formación del cormo (El-Rahman *et al.*, 1985; Kumar *et al.*, 1990; Rees, 1993).

2.9. LITERATURA CITADA

- Agrios, G. N. 2005. Plant Pathology. 5th Ed. Academic Press. San Diego, CA. USA. 635 p.
- Bajaj, Y. P. S., M. M. S. Sidhu, and Gill, A. P. S. 1983. Some factoring affecting the in vitro propagation of gladiolus. *Scientia Horticulturae* 18: 269-275.
- Barnett, H. L., and B. B. Hunter. 1998. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. 4th Edition. American Phytopathological Society. Press. St. Paul, Minnesota. USA. 218 p.
- Best, D. J. 1985. Chemistry and biotechnology. *In: Biotechnology*. Higgins, I. J., D. J. Best, and J. Jones. (Ed). Blackwell Scientific Publications. Great Britain. pp: 11-162.
- Bessey, E. A. 1964. Morphology and Taxonomy of Fungi. 2nd Ed. Hafner Publishing Company. London, UK. 791 p.

- Buschman, M. J. C. 1989. The Gladiolus cut flower as en zones tropicales y subtropical. International Center of Flower Bulbs. Publisher International. Hillegom, Netherlands. 32 p.
- Chandel, R., and R. Deepika. 2010. Recent advances in management and control of *Fusarium* yellows in *Gladiolus* species. Journal of Fruit and Ornamental Plant Research 18: 361-380.
- Cohat, J. 1993. Gladiolus. In: Le Nard M, De Hertog AA (eds). The physiology of flower bulbs. Elsevier, Amsterdam, Netherlands, pp 297–320.
- Dantu, P. K., and S. S Bhojwani. 1987. *In vitro* propagation and corm formation in *Gladiolus*. Gartenbauwissenschaft. 52: 90-93.
- De Hertog, A. A., and M. Le Nard. 1993. The physiology of flower bulbs. Elsevier, Amsterdam, Netherlands, p 811.
- Drayton, F. L. 1934. The gladiolus dry rot caused by *Sclerotinia gladioli*. Phytopathology 24: 397-404.
- El-Rahman, A., E. Awad, and El-Hamied, A. A. 1985. Anatomical study on gladiolus stem apex as affected by kinetin, geberellin, ethephon concentration and irradiation doses. Acta Horticulturae 167: 177-185.
- Emek, Y., and B. Erdağ. 2007. *In vitro* propagation of gladiolus anatolicus (Boiss.). Pakistan Journal Botany 39: 23-30.
- Engelhard, W. A. 1989. Management of disease with macro and microelements. American Phytopathological Society. APS Press. St. Paul, Minnesota. USA. pp 2-31.
- Farr, F. D., F. G. Bills, P. G. Chamuris, and Y. H. Rossman. 1989. Fungi on Plants and Plant Products in the United States. American Phytopathological Society. APS Press. St. Paul, Minnesota. USA. 1252 p.
- Flores-Almaraz R., y A. Lagunés-Tejeda. 1998. La horticultura ornamental en México. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática-Colegio de Postgraduados. Aguascalientes, México. 88 p.
- Gardezi, A. K., V. M. Cetina-Alcalá, R. Ferrara-Cerrato, J. Velázquez-Mendoza., C. A. Pérez M., y M. Larque S. 2001. Hongos micorrízicos arbusculares como

- componente de control biológico de la pudrición causada por *Fusarium* sp. en gladiolo. Terra 19: 259-264.
- González, L. J. 1995. Enfermedades del gladiolo (*Gladiolus grandiflorus* Hort.) en las principales regiones florícolas de México. Tesis de maestría. Universidad Autónoma Chapingo. Texcoco, Edo de México. México. 93 p.
- González-Pérez, E., M. J. Yáñez-Morales, H. M. Ortega-Escobar and J. Velázquez-Mendoza. 2009. Comparative analysis among pathogenic fungal species that cause gladiolus (*Gladiolus grandiflorus* Hort.) corm rot in Mexico. Revista Mexicana de Fitopatología 27: 45-52.
- González-Pérez, E., M. J. Yáñez M., J. Velázquez M. 2009b. Efecto de la fertilización en el crecimiento de patógenos del cormo del gladiolo. Memorias del XI Congreso Internacional / XXXVI Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología. Acapulco, Guerrero, México. pp: 155-160.
- Gowda, J. V., R. Jayanthi, and B. Rajú. 1988. Studies on the effects of nitrogen and phosphorus on flowering in gladiolus. Current Research University of Agricultural Science 17: 80-81.
- Hartmann, H. T., D. E. Kester, and F. T. Davies. 1990. Plant Propagation: Principles and Practices. Prentice Hall, Inc. New Jersey, USA. 647 p.
- Hubert, F. P., and W. H. Wheeler. 1950. Disease survey of domestic bulbs 1948-49. Plant Disease Reporter 34: 53-55.
- Hussey, G. 1977. *In vitro* propagation of *Gladiolus* by precocious axillary shoot formation. Scientia. Horticulturae. 6: 287-296.
- Jackson, C. R. 1961. *Penicillium* core rot of gladiolus. Phytopathology 52: 794-797.
- Kirk, P. M., P. F. Cannon, J. C. David, and J. A. Stalpers. 2001. Dictionary of the Fungi. CAB International. UK. 655 p.
- Kumar, A., Sood, A. Palni, L. M. S. and A. K. Gupta. 1999. *In vitro* propagation of *Gladiolus hybridus* Hort.: Synergistic effect of heat shock and sucrose on morphogenesis. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 57: 105-112.
- Larson, R. A. 1992. Introduction to Floriculture. 2nd Edition. Academic Press. San Diego, California. USA. 636 p.

- Leszczyńska, B. H. 1989. Cultivo de gladiolo. Memorias del Primer Congreso Nacional sobre Floricultura en México. Universidad Autónoma del Estado de México. Toluca, Edo. de México. México pp: 248-264.
- Leszczyńska, B. H., y W. M. Borys. 1994. Gladiolo. Ed. EDAMEX. México Distrito Federal. México. 61 p.
- Leyva, M. S. G. 1992. Enfermedades del gladiolo (*Gladiolus* sp.). In: Memorias del II curso de acreditación técnica en el manejo y certificación fitosanitaria en ornamentales. Metepec, Edo de México. México. pp: 61-73.
- Lindsey, K., and M. G. K. Jones. 1992. Biotecnología Vegetal Agrícola. Editorial Acribia. Zaragoza, España. 276 p.
- Littrell, R. H., and W. E. Waters. 1967. Influence of nitrogen and lime fertilization on gladiolus corm and flower production and internal microflora of corms. Florida Agricultural Experiment Station Journal Series 2852: 405-408.
- López, M. J. 1989. Producción de Claveles y Gladiolos. Mundi-Prensa. Madrid, España. 86 p.
- Magie, R. O., and W. G. Cowperthwaite. 1952. Progress in gladiolus reseach. Florida State Horticultural Society 263-266.
- Massey, L. M. 1926. *Fusarium* rot of gladiolus corms. Phytopathology 16: 509-523.
- McClellan, W. D., F. K. Baker, and J. C. Gould. 1949. Occurrence of the *Botrytis* disease of gladiolus in the United State in relation to temperature and humidity. Phytopathology 39: 260-271.
- Melgar, R. J., M. E. Camozzi, M. Torres-Duggan, y J. Lavandera. 2001. Fertilización potásica y clorada: una herramienta eficaz para reducir la incidencia de enfermedades. Revista Fertilizar 23: 16-20.
- Miller, C. O., F. Skoog, F. S. Okumura, M. H. Von Saltza, and F. M. Strong. 1955. Isolation, structure and synthesis of kinetin, a substance promoting cell division. Journal American Chemistry Society 78: 1375–1380.
- Murashige, T., and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiology Plant 15: 473-497.

- Nelson, E. P., T. A. Toussoun, and W. F. O. Marasas. 1983. *Fusarium* species. An Illustrated Manual for Identification. The Pennsylvania State University Press. USA. 193 p.
- Neergaard, P. 1977. Seed Pathology. Vol. I. The Gresham Press. Surrey, England. 839 p.
- Nyvall, R. F. 1989. Field Crop Disease Handbook. 2nd Ed. An AVI Book, Published. New Cork. UK. pp: 321-567.
- Ochoa, A. N. 1990. Establecimiento de cultivos *in vitro*. En fundamentos teórico-prácticos de cultivo de tejidos vegetales. Boletín, FAO. pp: 23-27.
- Palacios, A. S. 1992. Manejo del gladiolo. In: Memorias del II curso de acreditación técnica en el manejo y certificación fitosanitaria en ornamentales. Metepec, Edo de México. México. pp 52-60.
- Raper, K. B., and C. Thom. 1949. A Manual of the *Penicillia*. The Williams & Wilkins Company. Baltimore, USA. 875 p.
- Razdan, M. K. 2003. Introduction to plant tissue culture. Science publishers. New Hampshire, USA. 359 p.
- Rees, A. R. 1993. Ornamental Bulbs, Corms and Tubers. CAB International. Wallingford, UK. 220 p.
- Romero, C. S. 1993. Hongos Fitopatógenos. Universidad Autónoma Chapingo. México. 347 p.
- Roy, S. K., G. Gangopadhyay, T. Bandyopadhyay, B. K. Modak, S. Datta, and K. K. Mukherjee. 2006. Enhancement of *in vitro* micro corm production in *gladiolus* using alternative matrix. African Journal of Biotechnology 5: 1204-1209.
- SAGARPA. 2007. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación: Ley Federal de Producción, Certificación y Comercio de Semillas. (<http://snics.sagarpa.gob.mx/somos/Documents/Ley%20de%20semillas.pdf>). Consultado el 16 de octubre de 2011.
- SIAP. 2010. Anuario del Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, ciclos 2009. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_wrapper&view=wrapper&Itemid=351 Consultado el 2 de septiembre de 2010.

- Simonsen, J., and A. C. Hildebrandt. 1971. *In vitro* growth and differentiation of *Gladiolus* plants from callus cultivars. Canadian Journal of Botany 49:1817-1819.
- Steinitz, B., A. Cohen, Z. Goldberg, and M. Kochba. 1991. Precocious gladiolus corm formation in liquid shake cultures. Plant Cell Tissue Organic Culture 26:63-70.
- Stewart, W. M., D. W. Dibb, A. E. Johnston, and J. T. Smyth. 2005 The contribution of commercial fertilizer nutrients to food production. Agronomy Journal 97: 1-6.
- Sutton, C. B. 1980. The Coelomycetes. Fungi Imperfecti with Pycnidia Acervuli and Stroma. Commonwealth Mycological Institute. Kew, Surrey, England. UK. 696 p.
- Tamura, J., and K. Maga. 1959. Yields of gladiolus flowers and corms supplied with differential nutrients. Bulletin of the University of Osaka Prefecture. Agricultura and Biology 9: 12-31.
- Vidalie, H. 2001. Producción de Flores y Plantas Ornamentales. 3^{ra} Ed. Mundi-Prensa. Madrid, España. 270 p.
- Villalobos, A. V. 1990. Historia del cultivo de tejidos vegetales. En Fundamentos teóricos-prácticos de cultivo de tejidos vegetales. Boletín FAO. pp:3-7.
- Woltz, S. S. 1954. Studies on the nutritional requirements of gladiolus. Florida Agricultural Experiment Station Journal Series 296: 330-335.
- Woltz, S. S., R. O. Maggie, C. Switkin, P. E. Nelson, and T. A. Tousson. 1977. Gladiolus disease response to prestorage corm inoculation with *Fusarium* species. Plant Disease Reporter 62: 134-137.
- Ziv, M. 1979. Transplanting gladiolus plants propagated *in vitro*. Scientia Horticulturae 11: 257-260.
- Ziv, M. 1989. Enhanced shoot and cormlet proliferation in liquid cultured gladiolus buds by growth retardants. Plant Cell Tissue. Organic Culture. 17: 101-110.
- Ziv, M., A. H. Halevy, and R. Shillo. 1970. Organs and plantlet regeneration of *Gladiolus* through tissue culture. Annual Botany 34: 611-676.

CAPITULO III

DESARROLLO, CALIDAD Y DOSIS DE FERTILIZACIÓN EN GLADIOLO EN SAN MARTIN TEXMELUCAN, PUEBLA

RESUMEN

San Martín Texmelucan, Puebla, es la principal zona productora de gladiolo en México. Actualmente los productores de este cultivo cuentan con poca información científico-técnica sobre su manejo y es común encontrar pérdidas en producción y calidad de gran importancia. En el presente trabajo se evaluó el efecto de cuatro dosis de fertilización (DF): 65 N - 14.9 P - 171 K - 16.6 Mg - 31.2 Ca kg ha⁻¹ (DF1), 40.5 N - 24 P - 171 K - 23 Mg - 37.2 Ca - 0.2 B - 8.5 S kg ha⁻¹ (DF2), 81 N - 24 P - 171 K - 23 Mg - 37.2 Ca - 0.2 B kg ha⁻¹ (DF3) y 81 N - 24 P - 171 K - 23 Mg - 37.2 Ca kg ha⁻¹ (DF4) en el crecimiento del cultivo, calidad de flor y sanidad de la planta de las variedades de gladiolo Borrega roja (BR) y Espuma (E). Se estimaron los grados-día (GD) necesarios para las etapas fenológicas emergencia, aparición de hojas, espigamiento, madurez comercial, madurez fisiológica del cormo. Se midió altura de planta, índice de área foliar y porcentaje de plantas enfermas. En la cosecha se evaluó el número de botones florales y la superficie de flor. El ciclo biológico fue de 111 días para BR (1424 GD) y 129 días o 1662 GD para E; ambas produjeron 7 hojas y 13 botones florales. BR tuvo un crecimiento más rápido a lo largo del ciclo. Las diferencias en precocidad se gestaron, principalmente, a partir de la aparición de la 6^a hoja (931 y 956 GD para BR y E, respectivamente). Al final del ciclo, E fue superior en altura de planta (127.0 cm), índice de área foliar (1.5), acumulación de grados día a madurez fisiológica (1662 GD) y superficie de flor (10.8 cm²). No hubo efecto de las dosis de fertilización en el desarrollo y crecimiento del cultivo. DF2 redujo la mortandad de plantas a 3.3 % sin afectar el desarrollo del cultivo ni la calidad de la flor. Los tratamientos con alto contenido de nitrógeno (DF3 y DF4), produjeron más de 4.8 % de plantas muertas debido a enfermedades.

Palabras clave: *Gladiolus*, fenología de la planta, fertilización en el suelo, enfermedades del cormo.

3.1. INTRODUCCIÓN

Las ornamentales están entre las especies agrícolas con el mayor valor de la producción por hectárea y producen una derrama económica importante, debido a la inversión en infraestructura, insumos y mano de obra necesarios para su cultivo (Flores Almaraz y Lagunés Tejeda, 1998). En particular, el gladiolo (*Gladiolus grandiflorus* Hort.) es mundialmente apreciado como flor de corte, debido a sus colores y estética de la espiga floral. En México, ocupa el tercer lugar en importancia, con 2.2 mil hectáreas sembradas, después de la rosa (*Rosa* spp.) y el crisantemo (*Chrysanthemum* spp.). Los principales estados productores son: Puebla (San Martín Texmelucan y Atlixco, donde se siembra 54 % de la producción nacional), estado de México (Chalma, Malinalco, Valle de Bravo y Villa Guerrero), Michoacán, Morelos y Veracruz (SIAP, 2010). De estas regiones, San Martín Texmelucan, en el estado de Puebla, es la principal zona productora de gladiolo en México, con 40 % de la superficie sembrada en 2009 (SIAP, 2010).

En la actualidad, en esta zona, los productores de este cultivo cuentan con poca información científico-tecnológica sobre el desarrollo del cultivo y su manejo, por lo cual existe la necesidad de conocer su fenología, fisiología y la manera de evitar pérdidas en producción y calidad, tanto en flor cortada como en cormo (semilla vegetativa).

El conocimiento de la fenología permite aplicar prácticas preventivas y oportunas, de tal forma que se pueda hacer eficiente el proceso de producción y asegurar la alta calidad del producto. En el gladiolo, esto podría disminuir las pérdidas por estrés abiótico y biótico que afectan el crecimiento y desarrollo del cultivo. En particular, las pérdidas debido a fitopatógenos pueden alcanzar 70 % de la producción, pero con frecuencia llegan a la pérdida total (González Pérez *et al.*, 2009). Desafortunadamente, el control químico ha resultado ineficiente y caro. Una opción para reducir la incidencia de enfermedades en el campo la constituye el control con la aplicación óptima de fertilizantes al suelo (Engelhard, 1989). Se ha encontrado que el K, el B y el S pueden aumentar la sanidad de crisantemo, papa (*Solanum tuberosum* L.) y trigo (*Triticum aestivum* L.) (Engelhard, 1989; Melgar *et al.*, 2001; Agrios, 2005). En una investigación previa no publicada en cormos de gladiolo *in vitro* se encontró que la fertilización con N, P, K, Mg, Ca, S y B inhibió, en 60 %, el

crecimiento de patógenos. Por el contrario, Engelhard (1989), en clavel (*Dianthus caryophyllus* L.), encontró que con aplicaciones mayores de 100 kg N ha⁻¹ se favoreció la pudrición de raíces causada por hongos fitopatógenos. Sin embargo, el disminuir la fertilización puede ocasionar reducciones de calidad y rendimiento. De esta forma, es importante encontrar la dosis óptima de fertilización que disminuya la incidencia de enfermedades del gladiolo sin afectar el desarrollo fenológico, la calidad de flor y el rendimiento del cultivo.

El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de la fertilización en la fenología, crecimiento, calidad de flor, rendimiento y sanidad de cultivo de dos variedades de gladiolo cultivadas a campo abierto en San Martín Texmelucan, Puebla.

3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1. Sitio experimental

El estudio se realizó en Tlacotepec de José Manzo, municipio de El Verde, Puebla, ubicado entre las coordenadas geográficas 19° 12'18" LN, 98° 26'54" LW y a una altitud de 2425 m. El clima es Cw, que se caracteriza por ser templado húmedo con estación invernal seca y 17 °C de temperatura media anual. El periodo de lluvia es de mayo a octubre, con 800 mm de precipitación media anual y heladas frecuentes de noviembre a febrero (García, 1988).

Como referencia indirecta de las características del suelo del sitio experimental, el análisis (A&L Southern Agricultural Laboratories, Pompano Beach, Florida, USA) indica que es de textura franco arcillosa, medianamente ácido (pH 5.8), densidad aparente de 1.43 g cm⁻³, 2.73 % de materia orgánica, conductividad eléctrica de 0.116 dS m⁻¹, 113.7 kg ha⁻¹ de N (estimated nitrogen release), 43 mg L⁻¹ de P disponible, 15 mg L⁻¹ de K disponible, 58 mg L⁻¹ de Ca total, 62.8 mg L⁻¹ de Mg total y 53 mg L⁻¹ de S total.

3.2.2. Factores y niveles de estudio

Se plantaron cormos de 2.5 ± 0.3 cm de diámetro de gladiolo (*Gladiolus grandiflorus* Hort.), el 12 de marzo de 2009, de las variedades Borrega roja (BR; flor roja, espiga de color oscuro y robusta, con hojas erectas) y Espuma (E; flor blanca, espiga de color verde alimonado y flácida, con hojas anchas y lanceoladas) en un lote comercial que no se había usado para la producción de gladiolo en los últimos 4 años, en condiciones de riego por gravedad. Se evaluaron tres dosis de fertilización (Cuadro 1) obtenidas de un estudio previo *in vitro*. El experimento fue establecido como un factorial: A) dos variedades y B) cuatro dosis de fertilización. Se empleó el diseño de bloques completos al azar y cuatro repeticiones. La unidad experimental fue de 10 surcos de 5 m de largo y 0.6 m de ancho, y cada parcela útil constó de ocho surcos centrales. La fertilización se aplicó 0, 40 y 75 días después de la siembra (DDS), en proporción de $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{2}$ y $\frac{3}{4}$ del total de la dosis, respectivamente. Como testigo se usó la dosis comercial usada en la región, la cual se basa en lo señalado por Larson (1992). Las fuentes de fertilizante fueron: fosfonitrato, nitrato de potasio, fosfato diamónico, cloruro de potasio, sulfato de magnesio, cal agrícola, y bórax.

Cuadro 1. Dosis de fertilización (DF) en kg ha^{-1} de los diferentes nutrientes utilizados.

Dosis	N	P	K	Mg	Ca	B	S
DF1	65	14.9	171	16.6	31.2	0	0
DF2	40.5	24	171	23	37.2	0.2	8.5
DF3	81	24	171	23	37.2	0.2	0
DF4*	81	24	171	23	37.2	0	0

*Testigo

3.2.3. Variables climáticas

Se midió la temperatura del aire (T_a) y la humedad relativa (%), cada media hora, con un data logger (HOBO U12; Modelo: MAN-U12012) en la sombra, a 12 cm de altura del suelo, junto a las plantas. Con la temperatura del aire y los días para alcanzar cada etapa fenológica se calcularon los grados día de desarrollo (GDD):

Si $T_a \geq T_{mc}$ entonces $GDD = (T_{mc} - T_b)/t$

Si $T_b < T_a < T_{mc}$ entonces $GDD = (T_a - T_b)/t$

Si $T_a \leq T_b$ entonces $GDD = 0$

Donde $T_{mc} = 32$ °C es la temperatura máxima de crecimiento del gladiolo; $T_b = 5$ °C es la temperatura base del gladiolo (Larson, 1992) y $t = 48$ corresponde al número de medias horas en un día.

3.2.4. Variables fenológicas y de crecimiento

Se contaron los días para alcanzar las siguientes etapas fenológicas: emergencia (primera hoja sobre el suelo), espigamiento (aparición de la espiga floral), floración o madurez comercial (presencia de pétalos en el primer botón floral, en esta fase se realizó la cosecha de la espiga floral) y madurez fisiológica del cormo (fin del estado lechoso de los cormillos). Se consideró el inicio de una etapa fenológica cuando 60 % de las plantas presentes en la unidad experimental llegaron a la etapa correspondiente.

De manera similar, se contó el número de hojas mayores de 2 cm de longitud y los días necesarios para su aparición.

En cada etapa fenológica se midió la altura de la planta (cm) desde la base del tallo hasta el ápice de la planta.

Se hicieron muestreos destructivos de 10 plantas en competencia completa, tomadas de los surcos centrales en las etapas fenológicas determinadas por 1^{ra}, 2^a, y 7^a hoja, para estimar el área foliar (AF, cm²) con una metodología basada en el proceso de imágenes digitales. Entre las 13 y 15 h se tomaron imágenes digitales a hojas sobre un fondo azul, a 80 cm de altura, bajo luz difusa con una cámara Nikon (Coolpix 5000) con 1/60 de velocidad de obturación, 3.3 de apertura de diafragma, y balance de blanco con luz del día. Después se segmentaron los píxeles (unidades básicas de las imágenes) de color verde que componían a las hojas, con el método basado en Otha *et al.* (1980), y se calculó el área relativa que ocupaban en la imagen. Finalmente, con base en una referencia de superficie

conocida, se calculó el AF de las hojas. El índice de área foliar (IAF) se obtuvo con la siguiente expresión: $IAF = (AF \times \text{densidad de la población}) / \text{unidad de superficie}$.

3.2.5. Sanidad del cultivo

Se contaron las plantas muertas con daños visibles de marchitez y/o muerte (González-Pérez *et al.*, 2008) en cada etapa fenológica para determinar la incidencia de enfermedades causadas por patógenos del cormo y se reportó la mortalidad final de plantas (%).

3.2.6. Calidad de flor

Se contaron los botones florales al momento de la cosecha (madurez comercial). Para estimar la superficie de la flor (cm^2), la espiga floral se colocó durante 2 d en un florero con *agua* destilada a 20 °C para provocar la apertura de las flores. Se midieron las cuatro flores más grandes, con una metodología similar a la utilizada para determinar el área foliar.

3.2.7. Análisis estadístico

El análisis de varianza se realizó con el programa Statistical Analysis System (SAS Institute, 2002) y se hizo la prueba de comparación múltiple de medias de Tukey ($\alpha = 0.05$). Se ajustaron funciones polinomiales a la variable altura de planta, con base en el mayor coeficiente de determinación (R^2) y el menor error estándar, con el programa Curve Expert 1.3. Los porcentajes de mortalidad de plantas se transformaron con $\arcsen(\sqrt{x/100})$ antes de su análisis de varianza. Las gráficas se elaboraron con el programa Microsoft Excel 2007 (Microsoft, EE. UU.).

3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.3.1. Ambiente y desarrollo del cultivo

Durante la germinación del cormo (13-15 DDS), la temperatura del aire (T_a) promedio fue de 13.5 °C, es decir, 3.5 °C sobre la recomendada (10 °C) para la germinación y emergencia (Larson, 1992); quizá esto contribuyó a obtener una emergencia uniforme de 90% de los cormos sembrados, ya que el cultivo requiere temperaturas bajas únicamente durante esta etapa (Larson, 1992). Entre la germinación y la cosecha del último tratamiento (28 de julio), la T_a máxima promedio fue 4 °C por debajo de la temperatura máxima de desarrollo ($T_{mc} = 32$ °C), mientras que la T_a mínima promedio fue 7 °C encima de la temperatura base ($T_b = 5$ °C). En 11 días se registraron temperaturas mayores de 32 °C y seis días con temperaturas debajo de 5 °C. La T_a media, 18.4 °C, durante el desarrollo del cultivo está dentro del intervalo recomendado por Vidalie (2001), quien señala que el cultivo requiere entre 10 y 25 °C durante el desarrollo vegetativo. La T_a mínima promedio del ciclo (12 °C) no afectó el desarrollo ni el rendimiento del cultivo de gladiolo, puesto que la temperatura se fue incrementando, conforme se acercaba el verano cuando solo se registraron temperaturas sobre la T_b .

No se encontraron diferencias estadísticas ($P \leq 0.05$) en las variables que evaluaron el desarrollo (etapas fenológicas) por efecto de las dosis de fertilización. Lo anterior sucedió probablemente pues, según el análisis químico del suelo previo al experimento, las cantidades de P (43 ppm), K (15 ppm), Ca (58 ppm) y S (53 ppm), se encontraban en el nivel de suficiencia para el cultivo del gladiolo de acuerdo con Havlin *et al.* (1999).

Se observaron diferencias estadísticas ($P \leq 0.05$) entre variedades en todas las etapas fenológicas, donde la variedad Borrega roja (BR) fue la más precoz desde la emergencia (Cuadro 2). El ciclo biológico fue de 111 días para BR (1424 GDD) y 129 días (1662 GDD) para Espuma (E). Aunque el ciclo biológico de E fue más extenso, ambas variedades diferenciaron siete hojas (Cuadro 2). La diferencia fenológica entre variedades inició desde que BR emergió 2 d antes que E. En la etapa de seis hojas, la diferencia entre ambas variedades fue 3 d. Sin embargo, en la 7^a hoja la diferencia fue 9 d (equivale a 100 GDD), y durante el espigamiento se incrementó a 18 d (equivalente a 233 GDD), diferencia que fue

constante hasta la madurez fisiológica del cormo. Esto quiere decir, que el intervalo de mayor diferencia en la duración del ciclo entre ambas variedades, se genera principalmente en la fase de formación de la espiga floral, entre la 6ª hoja y el inicio de la floración.

Cuadro 2. Días después de la siembra (DDS) y grados día de desarrollo (GDD) acumulados por etapa fenológica de dos variedades de gladiolo en Tlacotepec de José Manzo, El Verde, Puebla.

Etapa fenológica	Borrega roja		Espuma	
	GDD	DDS	GDD	DDS
Emergencia	211	13	185	15
Numero de hojas				
1	271	17	323	20
2	473	31	533	36
3	557	38	604	42
4	723	51	764	55
5	799	58	856	61
6	931	70	955	73
7	951	72	1053	81
Espigamiento	1014	78	1247	96
Floración	1048	81	1286	99
Madurez fisiológica	1424	111	1662	129

3.3.2. Índice de área foliar

Se observaron diferencias ($P \leq 0.05$) en el índice de área foliar (IAF) entre variedades; la variedad E tubo mayor IAF (máximo promedio, 1.50) que la variedad BR (1.29). Puesto que ambas variedades tuvieron el mismo número de hojas, la diferencia en IAF se atribuye a que E produce hojas de mayor tamaño que BR.

La dosis de fertilización (Figura 1) produjo diferencias estadísticas ($P \leq 0.01$) en el IAF de las variedades. En Borrega roja, solo se observaron diferencias en el último muestreo (951 GDD), donde DF3 produjo el mayor IAF (1.66), seguida por DF2 (1.28). También en Espuma, los tratamientos DF3 y DF2 mostraron mayor IAF (a los 533 y 1053 GDD) con 1.78 y 1.73 en el último muestreo, respectivamente. El mayor IAF se atribuye a la presencia de boro en la dosis de fertilización DF2 y DF3, ya que de acuerdo con Halder *et al.* (2007) es esencial en el desarrollo de la planta durante todo su ciclo; en gladiolo, el B ayuda a transferir azúcares y nutrientes a las hojas e incrementa el tamaño del cormo (Halder *et al.*, 2007). Por lo anterior se considera que los requerimientos de B en gladiolo son altos, sin rebasar el límite de tolerancia de 2 kg ha^{-1} (Rhoades *et al.*, 1992). Estos resultados concuerdan con Woltz (1954) y Halder *et al.* (2007), quienes encontraron mayor crecimiento de las hojas de gladiolo con la presencia de B.

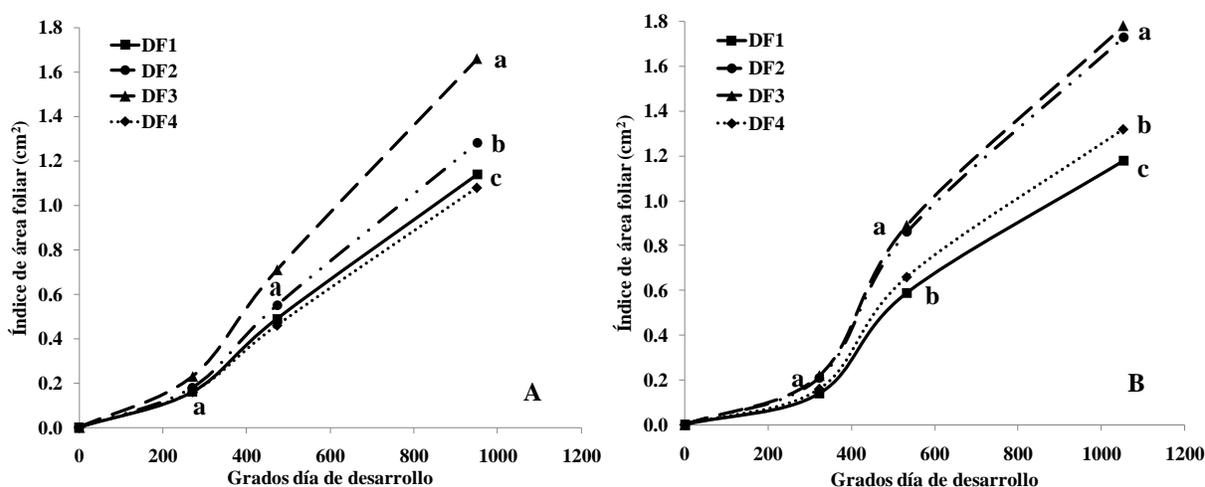


Figura 1. Índice de área foliar durante el desarrollo de dos variedades de gladiolo A) Borrega roja y B) Espuma, en función de cuatro dosis de fertilización en Tlacotepec de José Manzo, El Verde, Puebla. Primavera 2009. Valores con la misma letra en cada muestreo son estadísticamente iguales (Tukey, 0.05). DF1...4 = dosis de fertilización 1, 2, 3, 4.

También, la concentración más alta de Mg estudiada, la cual se encontraba incluida en los tratamientos DF2 y DF3 (23 kg Mg ha^{-1}), posiblemente contribuyó a que las plantas

tuvieran mayor IAF, ya que este elemento favorece la formación de clorofila (Taiz y Zeiger, 2006), en comparación con la baja cantidad de Mg en la DF1 (16.6 kg Mg ha⁻¹), la que produjo el menor IAF; esto concuerda con Woltz (1954), quien indica que dosis bajas de Mg en gladiolo producen hojas pequeñas.

Por otra parte, el nulo efecto de las dosis de fertilización en el IAF en el primer muestreo (fase de 1ª hoja) se debe muy probablemente, a que la mayoría de los nutrientes para el crecimiento en las fases tempranas del desarrollo proviene del órgano de reserva tuberizado (Adkins y Miller, 2008), es decir del cormo madre del gladiolo.

3.3.3. Altura de planta

La altura final de planta (AP) fue diferente entre variedades (Cuadro 3) pero no se observó efecto de la dosis de fertilización en esta variable ($P \leq 0.05$).

En ambas variedades, el crecimiento de AP a lo largo del ciclo es descrito por una curva tipo exponencial (Figura 2); lo cual contrasta con lo indicado por Taiz y Zeiger (2006) quienes indican que típicamente los órganos vegetales crecen describiendo una curva sigmoide. Este tipo de curvas se caracteriza por una fase inicial con crecimiento lento y una fase posterior de crecimiento exponencial que culmina con una fase de estabilización o plateau en la cual el órgano vegetal no crece más. Muy probablemente, la variable AP completaría un crecimiento tipo sigmoide si las mediciones no se hubieran interrumpido intempestivamente en el momento de la madurez comercial de la espiga floral (cosecha) a los 1048 y 1286 GDD, para BR y E, respectivamente (Cuadro 2), es posible además que el crecimiento de la espiga floral continúe aún en el florero como ocurre en tulipán (Wilford, 2006).

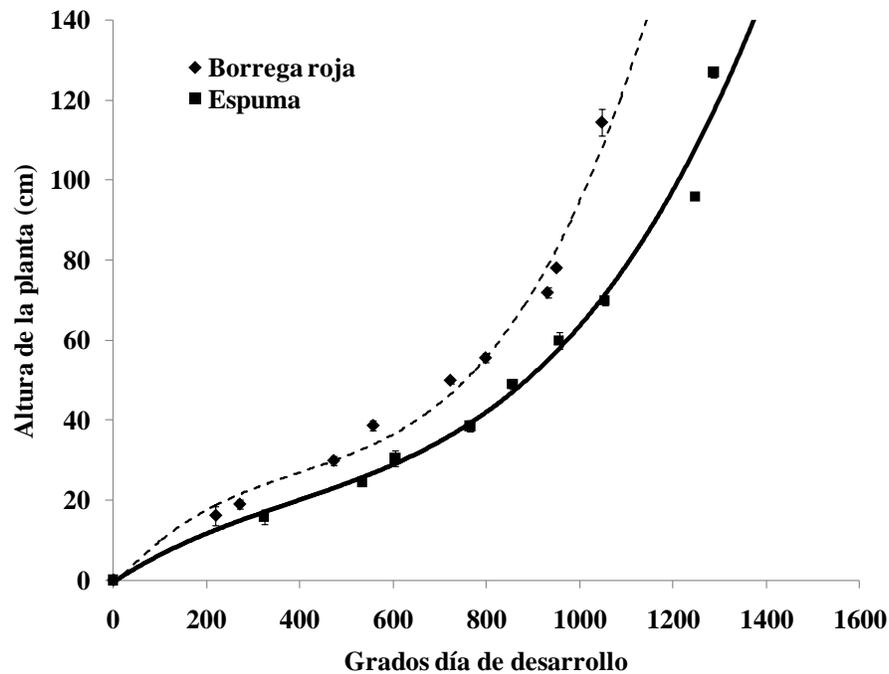


Figura 2. Altura de planta (cm) de dos variedades de gladiolo cultivadas en Tlacotepec de J. M., El Verde, Pué. Primavera, 2009. Barras verticales indican el error estándar (n = 16). Modelo polinomial para 'Borrega roja': $y = 2E-07x^3 - 0.0002x^2 + 0.1367x - 1.6747$ (n = 10, $P < 0.001$, $R^2 = 0.99$) B). Para 'Espuma' $y = 8E-08x^3 - 1E-04x^2 + 0.0764x - 0.4645$ (n = 10, $P < 0.001$, $R^2 = 0.98$). "x" es grados días de desarrollo; "y" es la altura de planta en cm.

En contraste con la duración del ciclo, donde las diferencias entre ambas variedades se observan e incrementa a partir de la 6ª hoja que corresponde a 931 GDD para Borrega roja y 955 GDD para Espuma, en la variable altura de planta (AP), desde la aparición de la primera hoja en la variedad E (323 GDD), su tamaño es ya considerablemente menor, solo 16 cm, respecto a la variedad BR que alcanza aproximadamente 24 cm (Figura 2). A los 1048 GDD, en el momento de la cosecha de BR, las plantas de esta variedad alcanzaban en promedio 114.5 cm de AP, y las plantas de E solo tenían aproximadamente 70 cm (Figura 2). Al cosecharse a los 1048 DDS, la variedad BR es más precoz y alcanza una mayor altura durante su ciclo biológico, respecto a E. Las plantas de esta variedad continúan su crecimiento, hasta su cosecha a los 1286 GDD (Figura 2), 238 GDD después que la cosecha de BR. La AP final mayor de las plantas de E respecto a las de BR se debe entonces, al

mayor periodo de crecimiento, por lo tanto el periodo de síntesis y acumulación de fotosintatos es más amplio.

Cuadro 3. Variables de rendimiento y calidad de flor en dos variedades de gladiolo Borrega roja y Espuma, en respuesta a diferentes dosis de fertilización en Tlacotepec de José Manzo, El Verde, Puebla. Primavera 2009.

Variedad	Variable		
	Altura de planta (cm)	Superficie de flor (cm ²)	Botones florales (número)
Borrega roja	114.5 b [†]	7.9 b	13.0 a
Espuma	127.0 a	10.8 a	12.6 a
DMS	4.6	2.1	1.1

[†] Valores con la misma letra en cada hilera indican valores estadísticamente iguales (Tukey, 0.05). DMS = Diferencia mínima significativa.

3.3.4. Calidad de la espiga floral

La altura final de planta se debe principalmente a la elongación de la espiga floral. La longitud de la espiga floral se considera una de las variables más importantes que definen la calidad de flor y su clasificación en la comercialización. Espigas florales mayores de 120 cm de altura son de calidad excelente o de primera, como fue el caso de Espuma (127 cm en promedio), en cambio Borrega roja con 114.5 cm, en promedio, alcanzó la calidad de segunda clase (Cuadro 3).

Por otro lado, se obtuvieron 13 botones florales por espiga independientemente de la variedad y de la dosis de fertilización ($P \leq 0.05$) (Cuadro 3). Estos resultados son similares a los reportados por Hernández Díaz *et al.* (2008) quienes al evaluar diferentes dosis de N no encontraron diferencias en esta variable. Gursan *et al.* (1986) y Karagüzel *et al.* (1997) consideran que el número de botones florales es un carácter que está determinado genéticamente por la variedad.

La superficie de flor, que es una variable importante de calidad, fue diferente entre variedades ($P \leq 0.01$) (Cuadro 3) pero no entre DF ($P \leq 0.05$). De esta forma, al no existir diferencia en el número de botones florales y consecuentemente, flores por espiga, pero sí en la superficie cubierta por estas, se interpreta que el tamaño de la flor individual es mayor en la variedad Espuma.

3.3.5. Sanidad del cultivo

El nivel de plantas muertas fue afectado por la DF ($P \leq 0.01$, Cuadro 4), pero no por la variedad. La DF₄ (testigo), junto con los tratamientos DF₁ y DF₃, presentaron una incidencia de 4.8 % o más de plantas muertas en ambas variedades. Estos tres tratamientos contenían dosis de N mayores de 65 k ha⁻¹ (Cuadro 1), lo cual es elevado. Al respecto Agrios (2005) y Engelhard (1989) recomiendan bajas concentraciones de N en la fertilización de ornamentales, considerando que 80 kg N ha⁻¹ o más favorecen el desarrollo de *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli*, causante del marchitamiento y posterior muerte de plantas debidas a la pudrición del cormo de acuerdo con estudios previos realizados en esta región (González Pérez *et al.*, 2009). El número de plantas muertas con la DF₂ fue menor de 3.3 %, lo cual es despreciable si se considera que en cultivos comerciales se presentan pérdidas hasta de 70 % de las plantas. Sin embargo, esta investigación aporta conocimiento al control de enfermedades con prácticas culturales, lo cual se puede considerar en el diseño de un control integrado.

Es posible que el menor porcentaje de plantas muertas con la DF₂ se explique no solamente por la baja concentración de nitrógeno, sino también por el aporte de boro y azufre (Cuadro 1), elementos con propiedades inhibitorias del desarrollo de fitopatógenos que inducen marchitez y muerte de plantas como las indirectamente evaluadas en esta investigación (Engelhard, 1989; Melgar *et al.*, 2001; Halder *et al.*, 2007).

Cuadro 4. Efecto de cuatro dosis de fertilización (DF_{1...4}) sobre el porcentaje de mortalidad de plantas en gladiolo creciendo en campo, en Tlacotepec de José Manzo, El Verde, Puebla. Primavera 2009.

Tratamiento	Mortalidad (%)
DF1	5.3 ab [†]
DF2	3.3 b
DF3	4.8 ab
DF4	6.3 a
DMS	1.9

[†] Valores con la misma letra en cada columna indican valores estadísticamente iguales (Tukey, 0.05). DMS = Diferencia mínima significativa.

3.4. CONCLUSIONES

Las dosis de fertilización no afectaron las variables fenológicas, el rendimiento ni calidad de la flor de gladiolo; aunque si se observaron diferencias entre variedades para estas variables. La variedad Espuma fue superior en altura de planta (127.0 cm), índice de área foliar (1.50) y acumulación de grados día a madurez comercial (1286 grados-día) respecto a la variedad Borrega roja (114.5 cm, 1.29 y 1048 grados-día, respectivamente). Las diferencias en precocidad entre ambas variedades se gestaron a partir de la aparición de la 6^a hoja (931 grados-día para Borrega roja y 955 grados-día para Espuma).

Una fertilización con alto nivel de N (mayor de 65 kg ha⁻¹) produce una respuesta negativa en la sanidad del cultivo, con una incidencia de plantas muertas mayor a 4.8 %. En cambio, la baja concentración de N (40.5 kg ha⁻¹), combinada con aportaciones de B y S, reduce la mortandad, sin afectar el desarrollo del cultivo ni la calidad de flor.

3.5. LITERATURA CITADA

Agrios, G. N. 2005. Plant Pathology. 5th ed. Academic Press. San Diego, California. USA. 635 p.

- Adkins, J. A., and W. B. Miller. 2008. Storage organs. *In: Plant Propagation*. C A Beyl, R N Trigiano (eds). CRC Press. Boca Raton, Florida, USA. pp: 303-310.
- Engelhard, W. A. 1989. Management of disease with macro and microelements. *In: Soilborne Plant Pathogens*. W A Engelhard (ed.) American Phytopathological Society Press. St. Paul, Minnesota, USA. pp 2-31.
- Flores-Almaraz R., y A. Lagunés-Tejeda. 1998. La horticultura ornamental en México. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática-Colegio de Postgraduados. Aguascalientes, México. 88 p.
- García, E. 1988. Modificaciones al sistema de clasificación climático de Köppen. Offset Larios. México. 217 p.
- González-Pérez, E., M. J. Yáñez-Morales, H. M. Ortega-Escobar and J. Velázquez-Mendoza. 2008. First report of *Acremonium strictum* and *Gliocladium roseum* causing basal stem and corm rot of *Gladiolus grandiflorus* in Mexico. *Journal of Plant Pathology* 90: 586.
- González-Pérez, E., M. J. Yáñez-Morales, H. M. Ortega-Escobar and J. Velázquez-Mendoza. 2009. Comparative analysis among pathogenic fungal species that cause gladiolus (*Gladiolus grandiflorus* Hort.) corm rot in Mexico. *Revista Mexicana de Fitopatología* 27: 45-52.
- Gursan, K., S. Yelboga, and S. Cetiner. 1986. A research on the effects of different planting time of gladiol corms on flowering and flower quality (in Turkish). TOKB, Proje Uyg. Gen. Mud., Ataturk Bahce Kult. Aras. Enst., Yalova. pp: 24.
- Halder, N. K., R. Ahmed, S. M. Sharifuzzaman, K. Anzu-Man-Ara Bagam, and M A Siddiky. 2007. Effect of boron and zinc fertilization on corm and cormel production of gladiolus in grey terrace soils of Bangladesh. *International Journal Sustainable Crop Production* 2: 85-89.
- Havlin, J. L., J. D. Beaton, S. L. Tisdale, and W. L. Nelson. 1999. *Soil Fertility and Fertilizers. An Introduction to Nutrient Management*. 6th ed. Prentice Hall. New Jersey, New York, USA. 499 p.
- Hernández-Díaz, M. I., V. Marrero-González, M. González-Hurtado, J. M. Salgado-Pulido, y A. Ojeda-Veloz. 2008. Niveles de nitrógeno y su fraccionamiento en el cultivo del gladiolo para suelos ferralíticos rojos. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* 43: 21-27.

- Karagüzel, O., S. Altan, I. Doran, and Z. Söğüt. 1997. The effect of GA₃ and additional KNO₃ fertilization on flowering and quality characteristics of *gladiolus grandiflorus* “eurovision”. *In: Improved Crop Quality by Nutrient Management*. D Anac, P M Prevel (eds.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. pp: 259–262.
- Larson, R. A. 1992. *Introduction to Floriculture*. 2nd ed. Academic Press. San Diego, California, USA. 636 p.
- Melgar, R. J., M. E. Camozzi, M. Torres-Duggan, y J. Lavandera. 2001. Fertilización potásica y clorada: una herramienta eficaz para reducir la incidencia de enfermedades. *Revista Fertilizar* 23: 16-20.
- Otha, Y. I., T. Kanade, and T. Sakai. 1980. Color information for region segmentation. *Computer Graphics and Image Processing* 13: 222-241.
- Rhoades, J. D., A. Kandiah, and A. M. Mashali. 1992. *The Use of Saline Waters for Crop Production*. FAO. Irrigation and Drainage Paper No 48. Rome, Italy. 133 p.
- SAS Institute. 2002. *User’s Guide of SAS (Statistical Analysis System) Version 9*. SAS Institute Inc. 9th ed. Cary, North Carolina, USA. 550 p.
- SIAP. 2010. *Anuario del Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, ciclos 2009*. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_wrapper&view=wrapper&Itemid=351 Consultado el 2 de septiembre de 2010.
- Taiz, L., and E. Zeiger. 2006. *Plant Physiology*. 4th Edition. Sinauer Associates, Inc., Publishers. Sunderland, Massachusetts, USA. 764 p.
- Vidalie, H. 2001. *Producción de Flores y Plantas Ornamentales*. 3^{ra} Ed. Mundi-Prensa. Madrid, España. 270 p.
- Wilford, R. 2006. *Tulips: Species and Hybrids for the Gardener*. Timber Press Inc. Portland, Oregon, USA. 211 p.
- Woltz, S. S. 1954. Studies on the nutritional requirements of *gladiolus*. *Florida Agricultural Experiment Station Journal Series* 296: 330-335.

CAPITULO IV
PROPAGACION *IN VITRO* Y ACLIMATACIÓN DE PLÁNTULAS DE
GLADIOLO LIBRES DE ENFERMEDADES

RESUMEN

En México la propagación asexual de gladiolo (*Gladiolus grandiflorus* Hort.) es mediante cormos, pero este tipo de reproducción vegetativa es problemática para la producción de flor de calidad debido a las enfermedades transmitidas mediante esta práctica. Por esto, la propagación *in vitro* puede ser útil para producir cormos sanos. Los objetivos de este trabajo fueron producir plantas *in vitro* e investigar un ambiente de aclimatación para la producción de cormo sanos. Para la propagación *in vitro* se evaluaron cinco combinaciones de hormonas, y en la aclimatación se evaluaron cuatro ambientes. La mejor respuesta en la regeneración (95 %), número de raíces (5.4) y altura de planta (13.3 cm) fue con la auxina ácido naftalenacético (0.2 mg L⁻¹). En la aclimatación el mejor ambiente fue bajo malla sombra de 75 %, en el que se observó el mayor nivel de supervivencia 95 %, altura de planta (24 cm), biomasa total (2.51 g/planta), biomasa del cormo (1.20 g), e índice de eficiencia fotosintética (2.9); además se obtuvo una relación fluorescencia variable y fluorescencia máxima (Fv/Fm) cercana al óptimo (0.83). Este tratamiento fue el único en incrementar el tamaño del cormo, el cual fue 100 % libre de patógenos.

Palabras clave: Aclimatación, fluorescencia de hojas, malla sombra, cultivo *in vitro*, auxinas, citocininas.

4.1. INTRODUCCIÓN.

Holanda y otros países de Europa, así como Brasil y México en América son productores de flor de gladiolo (*Gladiolus grandiflorus* Hort.) para exportación (Chandel y Deepika, 2010). Su propagación es vegetativa mediante una estructura llamada cormo, producido y exportado principalmente por Holanda. El gladiolo en México es cultivado a campo abierto a partir de cormos reproducidos por los agricultores locales como es el caso de la región de San Martín Texmelucan, Puebla. El problema principal de esta forma tradicional de producción, es que los cormos generalmente están infestados por hongos fitopatógenos, como *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli*, los cuales causan pudrición del cormo (González *et al.*, 2009), y demeritan la calidad física, fisiológica y sanitaria del propágulo cuando no son controlados con químicos. En campo, los propágulos de cormos contaminados pueden presentar pudrición y síntomas aéreos de marchitez, muerte de plantas y en consecuencias extremas es factible la pérdida total del cultivo (González *et al.*, 2009).

Por lo anterior, se requieren establecer métodos de multiplicación masiva de cormos que garanticen su calidad sanitaria; una opción es la reproducción vegetativa *in vitro* (Emek y Erdağ, 2007). En Holanda los cormos de gladiolo se reproducen por micropropagación (Ziv *et al.*, 1970) y en la India (Gupta y Prasad, 2010) y Portugal (Nhut *et al.*, 2004) se ha inducido la formación de plántulas y cormos *in vitro* (experimentalmente). Pero esta técnica no es suficiente para tener éxito en la reproducción vegetativa; se requiere establecer el procedimiento y ambiente más apropiado (humedad relativa, humedad del suelo, nivel de irradiación, y la temperatura de planta y aire) para aclimatar las plantas al invernadero y/o campo y propiciar su desarrollo (Steinitz *et al.*, 1991; Roy *et al.*, 2006). Por esto, los objetivos de esta investigación fueron reproducir vegetativamente *in vitro* plantas de gladiolo libres de fitopatógenos, y determinar un ambiente adecuado de aclimatación bajo condiciones protegidas con cubiertas plásticas o malla sombra.

4.2. MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1. Obtención de explantes

En un lote de 500 cajas de cormos de la variedad Borrega roja producidos en la región de estudio se seleccionaron al azar 120 cormos aparentemente sanos, es decir, sin daños visibles por enfermedades. Los cormos se expusieron a chorro de agua por 20 min y secaron en papel toalla estéril para liberarlos de sus túnicas e impurezas. Después se les extrajo su meristemo apical (0.5 ± 0.1 cm de longitud) para usarlo como explante. Los explantes se desinfectaron con etanol al 80 % (v/v) por 2 min, enjuagaron con agua destilada estéril y secaron; posteriormente se desinfectaron con hipoclorito de sodio a 1.5 % por 3 min, enjuagaron y secaron como se indicó anteriormente (Remotti y Löffler, 1995).

4.2.2. Cultivo *in vitro*

Los explantes se cultivaron en el medio MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con 30 g L^{-1} de sacarosa, 4 g L^{-1} de agar y reguladores de crecimiento (auxinas y citocininas). Con estos se conformaron seis tratamientos: tres concentraciones (mg L^{-1}) de ácido dicloro fenoxiacético (2,4 D; 0.2, 0.6, 1.0; auxina), una de ácido naftalenacético (ANA; 0.2; auxina), una de ácido indolacético más kinetina (AIA/Kn; 0.2 / 0.05; auxina /citocinina), y un control sin reguladores de crecimiento. El pH del medio se ajustó a 5.8 antes de esterilizar en autoclave (Isolab, Laborgerate GMBH) a $120 \text{ }^\circ\text{C}$ por 15 min. De cada tratamiento, se vertieron 20 mL de solución en frascos de vidrio de 120 mL de capacidad. Se sembraron cuatro explantes por frasco con cinco repeticiones por tratamiento en condiciones asépticas en una cámara de flujo laminar (ESCO). Los explantes pasaron por dos fases de incubación. En la primera fase se expusieron a un fotoperiodo de 16/8 h luz/oscuridad, a $26 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ por 15 días; al término de esta fase los explantes con raíces y brotes se transfirieron a vasos de plástico que contenían turba previamente desinfectada e hidratada, donde transcurrió la segunda fase bajo las mismas condiciones de incubación por 18 días. Al final de la segunda fase se evaluaron las siguientes respuestas morfogénicas: regeneración (%; frecuencia de explantes con raíz, tallo y hoja), número de raíces por cormo, longitud promedio de las tres principales raíces (cm) y altura de planta (cm) de la base del cormo al ápice de hoja.

4.2.3. Trasplante

Las plántulas regeneradas con las características morfológicas evaluadas, es decir con raíz, tallo y una hoja, se lavaron con agua destilada, secaron en papel toalla estéril y transfirieron bajo condiciones asépticas a macetas (dos plantas por maceta) de plástico de 0.5 L y 12 cm de diámetro, con turba (esterilizada a 120 °C por 20 min). Para asegurar alta humedad relativa alrededor de la planta, se cubrieron las macetas con vasos de plástico transparente de 1.0 L y de diámetro igual que las macetas, y se incubaron a 16/8 h luz/oscuridad y 26 ± 2 °C en una cámara bioclimática por 10 días. Al final de esta fase, se les hicieron tres perforaciones en la parte lateral a los vasos transparentes sobrepuestos y las macetas se colocaron bajo maya sombra de 50% en el Campo Experimental del Colegio de Postgraduados, Texcoco, México, en condiciones ambientales rústicas, sin control de humedad ni temperatura por siete días (del 3 al 10 de febrero 2010) en donde las macetas permanecieron sin los vasos sobrepuestos en los últimos cuatro días). Se aplicaron dos riegos ligeros tres veces por semana y se fertilizó dos veces con la fórmula 20-30-10 de nitrógeno, fosforo y potasio, respectivamente.

4.2.4. Aclimatación

Siete días del transplante (11 de febrero 2011) las plántulas se transfirieron a macetas de 1.0 L y 16 cm de diámetro (54 macetas con dos plantas) con turba húmeda y esterilizada como ya se mencionó y se estableció un experimento en cuatro ambientes de aclimatación como tratamientos (malla sombra de 50 %, malla sombra de 75 %, cubierta plástica de polietileno blanco lechoso con 75% de transmisión de luz y a la intemperie) y 32 repeticiones. En cada ambiente se colocaron 16 macetas (dos plantas por maceta) y un Data Logger (HOBO H8-032-08, Onset Computer Corporation, EE. UU.) para registrar la temperatura del aire (°C) y humedad relativa (HR) cada 30 min. Se calculó la temperatura media, máxima, y mínima promedio diaria y días con temperaturas por debajo de 0 °C. Las variables: altura de la planta medida desde el ras de suelo al ápice de la hoja más larga (AP, cm), biomasa total (BT, g) que incluyó raíz, cormo y hojas, y biomasa de cormo (BC, g) se analizaron estadísticamente. Se midió una vez la temperatura de la hoja más ancha y erecta de cinco plantas bien hidratadas por ambiente con un termómetro de infrarrojo (ZyTemp; TN408LC) al medio día y en condiciones ambientales de cielo despejado y sin viento.

Además, se obtuvieron registros de radiación solar diaria de la estación meteorológica del Campo Experimental Montecillo del Colegio de Postgraduados (19° 29' N y 98° 53' O y 2260 m de altitud), a 50 m del sitio experimental.

4.2.5. Variables de fluorescencia de la hoja

La fluorescencia de la clorofila de la hoja se midió con un Handy PEA o Analizador de Eficiencia de la Planta (Hansatech Instruments, Reino Unido), en cinco plantas por ambiente. La medición se realizó en la hoja de mayor anchura de plantas con dos hojas. Se indujo la fluorescencia con un pulso de un segundo de luz roja (640 nm) emitido por 6 diodos (600 Wm⁻²) (Strasser *et al.*, 1995). La fluorescencia fue medida con un fotodiodo PIN con un filtro con 50 % transmisión a 750 nm. Se registraron las siguientes variables: fluorescencia mínima (Fo); fluorescencia máxima (Fm); fluorescencia variable, es decir Fm-Fo (Fv); tiempo en el cual se presenta la Fm (Tfm); área sobre la curva entre Fo y Fm (Área), relación Fv/Fm y el índice de eficiencia fotosintética (IEF).

4.2.6. Sanidad de plántulas

Para evaluar la presencia de fitopatógenos en cormos de plántulas producidas *in vitro*, se lavaron veinte cormos de los que se transfirieron a macetas con agua corriente por 20 min y secaron en papel toalla estéril dentro de una cámara de flujo laminar. Posteriormente los cormos fueron partidos longitudinalmente a la mitad y se desinfectaron con el procedimiento antes indicado para explantes. Las mitades de cormos se sembraron en cajas de Petri con medio PDA (papa-dextrosa-agar) y se incubaron por diez días a 21 °C en luz blanca continua de lámparas de 40 W (36 µE cm⁻² s⁻¹). A los siete días se contó el número de colonias fungosas.

4.2.7. Análisis estadístico

El análisis de varianza de las variables respuesta se hizo con el programa Statistical Analysis System y la comparación de medias fue con la prueba de medias de Tukey (P ≤ 0.05) (SAS Institute, 2002).

4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.3.1. Cultivo *in vitro*

Los cinco tratamientos con hormonas generaron plántulas, mientras que con el control no se observó regeneración. (Cuadro 1). El mejor tratamiento fue ANA (0.2 mg L⁻¹) con el cual 19 plántulas (95 %) generaron raíces y elongaron sus hojas. Por el contrario, con 2,4 D (2,4D-2) solo se obtuvieron tres plántulas (15 %).

Cuadro 1. Efecto de auxinas y citocininas en la regeneración de plántulas de gladiolo.

Tratamiento	Regeneración (%)	Número de Raíces	Altura de plántula (cm)
1) 2,4 D (0.2 mg L ⁻¹)	15 cb	2.2 bc	0.78 c
2) 2,4 D (0.6 mg L ⁻¹)	50 b	5.6 a	4.68 b
3) 2,4 D (1 mg L ⁻¹)	35 cb	3.4 ba	1.52 c
4) ANA (0.2 mg L ⁻¹)	95 a	5.4 a	13.3 a
5) AIA+Kn (0.2/0.05 mg L ⁻¹)	35 cb	2.6 bac	2.28 cb
6) Control (sin hormona)	0 c	0 c	0 c
DMS	35.14	3.13	2.91

Medias con distinta letra en una columna son estadísticamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$). 2,4D: ácido dicloro fenoxiácetico; ANA: ácido naftalenácetico; AIA: ácido indolácetico; Kn: Kinetina

El mayor número de raíces (Cuadro 1) se indujo con 2,4 D (2,4D-6) a 0.6 mg L⁻¹ y con ANA con 5.6 y 5.4 raíces por explante, respectivamente. En ambas concentraciones, la emisión de raíz comenzó a los seis días, y terminó a los 12 días. La menor proliferación fue en 2,4 D-2, mientras que con el control no se obtuvieron raíces

La longitud de raíz no fue diferente estadísticamente entre tratamientos, y todos los explantes tuvieron una longitud promedio de 1.3 ± 0.2 cm.

El tratamiento de ANA (Cuadro 1) destacó por producir plántulas de mayor longitud. En los cinco tratamientos, excepto en el control, el alargamiento del meristemo apical comenzó a los cuatro días después de establecido el experimento.

Con base en la regeneración de plántulas, número de raíces, y altura de planta, el mejor tratamiento fue con ANA, mientras que el peor fue 2,4 D-2 con 0.2 mg L^{-1} (Cuadro 1).

Resultados de diversas investigaciones han sido satisfactorios con ANA. Dantu y Bhojwani (1995) obtuvieron resultados similares a los del presente estudio a concentraciones de 0.25 y 0.5 mg L^{-1} en gladiolo cultivar 'Friendship'; mientras que Kumar *et al.* (1999) encontraron mejor respuesta en MS adicionado con $10.0 \mu\text{M}$ ANA y $1.0 \mu\text{M}$ BA (6-benziladenina) en los cultivares híbridos Her Majesty, Aldebaran y Bright Eye. Emek y Erdağ (2007) lograron mejor enraizamiento con ANA a 0.2 mg L^{-1} en *G. anatolicus*. Otros autores mencionan que ANA a 0.1 mg L^{-1} promueve la diferenciación de raíces sin generar callo (Ziv, 1979) y a 2.0 mg L^{-1} se induce la formación de hojas (Aftab *et al.*, 2008).

En general las auxinas se usan en horticultura para acelerar el enraizamiento al estimular la división en el cambium y la diferenciación del xilema y floema. Según Aloni (2004), las auxinas están involucradas en la inducción de raíces y tienen efectos positivos en la regeneración de plántulas, debido a que modifican la redistribución de carbohidratos durante el proceso de enraizamiento, lo cual depende del estado fisiológico del explante. La presencia de ANA en el medio de cultivo confirma que la inducción de raíz depende de la incorporación de reguladores de crecimiento; la ausencia de hormonas, como fue en los explantes del testigo, no permitió el desarrollo de estructuras, posiblemente por la ausencia o insuficiente concentración endógena de hormonas en el explante, lo que impidió la diferenciación; según Remotti y Löffler (1995), los explantes no generan estructuras en ausencia de hormonas.

4.3.2. Trasplante

La supervivencia de plántulas transferidas a turba e incubadas en la cámara de crecimiento a 26 °C por diez días fue 100 % (150 plantas). En este periodo se incrementó el tamaño de la hoja, algunas plantas emitieron la segunda hoja, se incrementó la longitud de raíz e inicio la diferenciación del cormo nuevo. Todas las plántulas sobrevivieron por 7 días bajo malla sombra 50 %, pero no se observó crecimiento ni desarrollo durante esta fase.

4.3.3. Aclimatación

En la aclimatación, las temperaturas del aire media y máxima promedio diaria fueron similares entre los tratamientos a la intemperie y malla sombra de 75 y 50 %, mientras que fueron más altas en el ambiente bajo cubierta plástica. A la intemperie se registró la menor temperatura del aire mínima promedio, y se presentaron ocho días con heladas, es decir con temperaturas menores o iguales a 0 °C, mientras que en los otros tres ambientes solo fue registrado un día con helada (Cuadro 2). Vidalie (2001) indica que la temperatura máxima de crecimiento para gladiolo es 32 °C y la mínima es 5 °C, de hecho la supervivencia de plántulas de gladiolo generadas *in vitro* y transferidas a condiciones de campo es mejor a temperaturas frescas (18 ± 2 °C) (Sen y Sen 1995).

Cuadro 2. Temperatura media, máxima y mínima promedio diaria de cuatro ambientes de aclimatación de plántulas generadas *in vitro*.

Ambiente	Temperatura (°C)			HR (%)	Días con heladas
	Media	Máxima	Mínima		
Intemperie (testigo)	15.5	31.4	1.5	41.9	8
Malla sombra 75 %	16.8	31.3	2.7	54.2	1
Malla sombra 50 %	16.4	31.6	2.8	47.8	1
Cubierta plástica	21.0	39.4	3.1	41.9	1

HR: humedad relativa

Cuadro 3. Variables de calidad de plantas de gladiolo de dos meses de edad producidas *in vitro*, en cuatro condiciones ambientes de aclimatación.

Tratamiento	SV (%)	AP (cm)	BT (g)	BC (g)	TH (°C)
Intemperie (testigo)	6.2 d	15.1 b	0.06 b	0.06 b	25.6 b
Malla sombra 75 %	96.8 a	24.0 a	2.51 a	1.20 a	22.8 c
Malla sombra 50 %	90.7 b	19.1 ba	0.10 b	0.03 b	26.8 b
Cubierta plástica	18.7 c	17.5 b	0.05 b	0.02 b	32.1 a
DMS	0.0	6.28	0.22	0.10	3.05

Medias con distinta letra en una columna son estadísticamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$).

SV: supervivencia; AP: altura de planta; BT: biomasa total; BC: biomasa del cormo; TH: temperatura de la hoja.

La disminución de la supervivencia de las plantas de gladiolo a la intemperie, se debió posiblemente a la temperatura mínima promedio registrada (1.5 °C) y la incidencia de ocho días con heladas (Cuadro 2, Figura 1). De acuerdo con Vidalie (2001) temperaturas inferiores a 5 °C son la causa de la pobre supervivencia de plantas de gladiolo. La mayor mortalidad se presenta cuando las plantas se cambian de un ambiente controlado a uno no controlado (Shillo y Halevy 1981), y en particular cuando las plantas se transfieren a condiciones naturales (23 ± 2 °C) (Dantu y Bhojwani 1995).

En nuestra investigación, el transplante no fue letal para las plántulas, pero durante la aclimatación, se observaron descensos importantes en la supervivencia de las plantas, con 60 % de mortandad acumulada después de diez días a la intemperie, 10 % después de 13 días en el ambiente de cubierta plástica, y cercanos a 5 % después de 9 y 13 días en los ambientes bajo malla sombra 75 y 50 %. En el ambiente bajo cubierta plástica la temperatura de la hoja fue cercana a la temperatura máxima de crecimiento (Cuadro 3) lo cual favoreció la muerte de plantas (Figura 1), debido a que en el estado de crecimiento, la regulación de la transpiración vía estomas es insuficiente y con facilidad las plantas se deshidratan y mueren (Taiz y Zeiger, 2006).

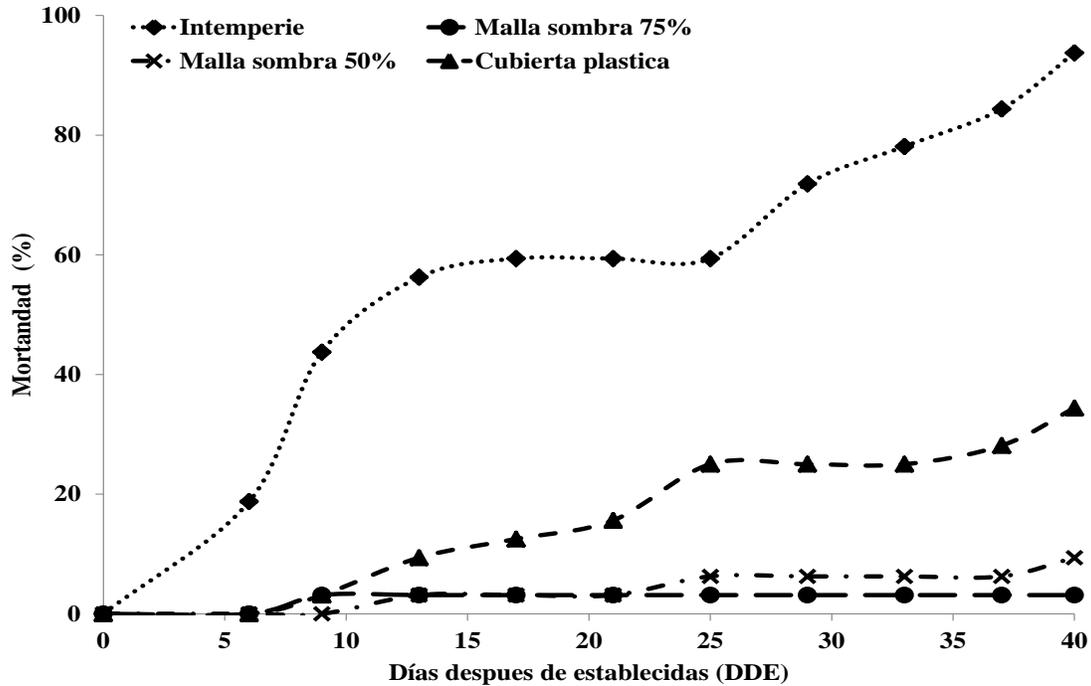


Figura 1. Porcentaje de mortandad acumulada de plántulas de gladiolo producidas *in vitro* y cultivadas en cuatro ambientes, en el invierno, 2010 en Montecillo, México.

Posiblemente las mayores AP y BT obtenidas en malla sombra 75 % se debieron a la menor temperatura de la hoja durante el día (Cuadro 3) y a la intensidad luminosa baja (Dantu y Bhojwani, 1995), que fue $2.6 \text{ MJ m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ en la banda fotosintética, con máximas promedio de $116 \text{ W m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, ya que el gladiolo es muy sensible a altas intensidades lumínicas durante la emisión de la primera hoja (Shillo y Halevy, 1981), en cambio la AP es menor en los ambientes con mayor intensidad luminosa. Además, la intensidad lumínica tiene un efecto sinérgico con la temperatura en las plantas, ya que una mayor acumulación de biomasa de la planta se presenta en días largos con temperaturas frescas ($15 \text{ }^\circ\text{C}$) (Shillo y Halevy (1976a, b). En especies del género *Freesia* se obtienen mayores AP y BT a $18 \text{ }^\circ\text{C}$ (Kho y Baër, 1973). En el tratamiento a la intemperie, las menores AP y BT se debieron al menor desarrollo, y a la senescencia prematura de plantas porque se observó mayor número de días con temperaturas inferiores o iguales a $0 \text{ }^\circ\text{C}$, mientras que la temperatura mínima de desarrollo de gladiolo es $5 \text{ }^\circ\text{C}$ (Vidalie, 2001). En el ambiente bajo cubierta plástica, se registró una temperatura máxima promedio del aire superior a la recomendada para

gladiolo, lo cual redujo las variables de calidad del cultivo, además de la alta intensidad lumínica (promedio de irradiancia fotosintética máxima de $326.6 \text{ W m}^{-1} \text{ s}^{-1}$).

Finalmente la mayor BC del gladiolo en malla sombra 75 % se atribuye al mayor peso de los cormos, que por cierto, fueron las únicas plantas que incrementaron el tamaño del nuevo cormo. En los otros ambientes las plantas senescieron después de seis semanas de edad, antes de la etapa de diferenciación y crecimiento del tallo.

Con base en los datos de supervivencia, altura de planta, biomasa total y biomasa del cormo, el mejor ambiente de aclimatación fue bajo malla sombra 75 %, y el más desfavorable fue a la intemperie (Cuadro 3).

4.3.4. Variables de fluorescencia de la hoja

La fluorescencia variable (F_v/F_m) fue 0.8 en los tratamientos de malla sombra 50 y 75 %, mientras que fue menor 50 % en las plantas cultivadas a la intemperie y bajo cubierta plástica (Cuadro 4). La F_v/F_m de 0.83, se considera como óptimo en un gran número de especies cultivadas C3 y C4 (Björkman y Demming, 1987). Así mismo, se observaron diferencias significativas ($P < 0.05$) en el índice de eficiencia fotosintética (IEF) entre ambientes (Cuadro 4).

El mayor IEF se obtuvo en plantas bajo malla sombra de 75 %, mientras que el menor fue encontrado en plantas a la intemperie. Pero las plantas bajo malla sombra de 50 % tuvieron la mayor área sobre la curva entre F_o y F_m , lo cual indica que fue mayor la cantidad de aceptores de electrones en el sistema de transporte de electrones. De acuerdo con Björkman y Demming (1987) y Cornic (1994), la disminución en la eficiencia del PSII se debe a déficit hídrico, temperaturas extremas o bajo nivel de radiación solar. Las plantas en intemperie y cubierta plástica presentaron estrés por temperaturas bajas y altas, respectivamente. Además, es posible que en estos tratamientos, el intervalo amplio de temperatura provocara fotoinhibición, más si se considera que las plantas en estos ambientes se expusieron a niveles de radiación solar altos. Cornic (1994) considera que los

procesos fotosintéticos pueden ser limitados por causas no estomáticas debido a temperaturas extremas.

Cuadro 4. Variables de fluorescencia de la hoja de plantas de gladiolo, bajo cuatro ambientes de aclimatación.

Ambiente	Fo [†]	Fm	Fv/Fm	IEF	Tfm	Área
Intemperie	490.0a	1213.8b	0.429b	1.095bc	322ba	12400b
Malla sombra 75 %	506.6a	2570.6a	0.804a	2.920a	700a	43200a
Malla sombra 50 %	495.4a	2558.6a	0.801a	2.502ba	498ba	46772a
Cubierta plástica	473.0a	742.0b	0.396b	0.465c	577b	6240b
DMS	62.4	646.3	0.23	1.51	310.9	25746

Medias con distinta letra en una columna son estadísticamente diferentes (Tukey, $P \leq 0.05$).

Fo: fluorescencia mínima; Fm: Fluorescencia máxima; Fv: fluorescencia variable (Fm-Fo); IEF: índice de eficiencia fotosintética; Tfm: tiempo en el que la fluorescencia máxima ocurre; Área: área bajo la curva entre Fo y Fv, relacionada con el tamaño de la fuente del PSII.

4.3.5. Sanidad

En el medio de cultivo no se desarrollaron colonias de *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli*, *Penicillium* spp, ni de otro hongo. Esto indica que las plántulas generadas *in vitro* estaban libres de estos patógenos.

4.4. CONCLUSIONES.

Se obtuvieron plántulas sanas de gladiolo variedad Borrega roja a partir de meristemos apicales cultivados *in vitro* en el medio Murashige y Skoog adicionado con 0.2 mg L⁻¹ de la auxina ácido naftalenacético, con 95 % de regeneración a las 12 días después de la siembra. El mejor ambiente de aclimatación de plántulas provenientes de cultivo *in vitro* se obtuvo bajo malla sombra 75 %, en donde 95 % de las plántulas sobrevivieron después de dos meses de edad. Las plántulas en este ambiente se caracterizaron por tener

las mayores variables fisiológicas, y fueron las únicas que incrementaron el tamaño del nuevo cormo. En cambio, fue evidente que temperaturas altas (ambiente bajo cubierta plástica) o bajas (intemperie) con respecto al intervalo de crecimiento del gladiolo, y niveles altos de radiación solar (los ambientes anteriores y malla sombra 50 %) causan deterioro en la capacidad fotosintética y esto repercute en la sobrevivencia y en el crecimiento de las plántulas.

4.5. LITERATURA CITADA

- Aftab, F., M. Alam, and H. Afrasiab. 2008. *In vitro* shoot multiplication and callus induction in *Gladiolus hybridus* Hort. Pakistan Journal Botany 40: 517-522.
- Aloni, R. 2004. The induction of vascular tissues by auxin. *In: Plant Hormones, Signal Transduction, Action*. P. J. Davies (Ed). Kluwer Academic-Publishers. Dorrecht, The Netherlands. pp: 471-493.
- Björkman, O., and B. Demming. 1987. Photon yield of O₂ evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77K among vascular plants of diverse origins. *Planta* 170: 489-504.
- Chandel, R., and R. Deepika. 2010. Recent advances in management and control of *Fusarium* yellows in *Gladiolus* species. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research* 18: 361-380.
- Cornic, G. 1994. Drought stress and high light effects on leaf photosynthesis. *In: Photoinhibition of Photosynthesis From Molecular Mechanisms to the Field*. Baker, N. R., and J. R. Bowyer (eds). Bios Scientific Publishers. Oxford, USA. pp: 297-311.
- Dantu, P. K., and S. S. Bhojwani. 1995. *In vitro* corm formation and field evaluation of corm-derived plants of *Gladiolus*. *Scientia Horticulturae* 61: 115-129.
- Emek, Y., and B. Erdağ. 2007. *In vitro* propagation of *gladiolus anatolicus* (Boiss.). *Pakistan Journal Botany* 39: 23-30.
- González-Pérez, E., M. J. Yáñez-Morales, H. M. Ortega-Escobar and J. Velázquez-Mendoza. 2009. Comparative analysis among pathogenic fungal species that cause

- gladiolus (*Gladiolus grandiflorus* Hort.) corm rot in Mexico. *Revista Mexicana de Fitopatología* 27: 45-52.
- Gupta, D. S., and V. S. S. Prasad. 2010. Shoot multiplication kinetics and hyperhydric status and regenerated shoots of gladiolus in agar-solidified and matrix-supported liquid cultures. *Plant Biotechnology Report* 4: 85-94.
- Kho, Y. O., and J. Baer. 1973. The effect of temperature during growth and flowering on the seed set of tetraploid freesia. *Euphytica* 22: 35-38.
- Kumar, A., A. L. Sood, S. M. Palni, and A. K. Gupta. 1999. *In vitro* propagation of *Gladiolus hybridus* Hort.: Synergistic effect of heat shock and sucrose on morphogenesis. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 57: 105-112.
- Murashige, T., and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plant* 15: 473-497.
- Nhut, D. T., J. A. Teixeira da Silva, P. X. Huyen, and K. Y. Paek. 2004. The importance of explant source on regeneration and micropropagation of *Gladiolus* by liquid shake culture. *Scientia Horticulturae* 102: 407-414.
- Remotti, C. P., and H. J. M. Löffler. 1995. Callus induction and plant regeneration from gladiolus. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 42: 171-178.
- Roy, S. K., G. Gangopadhyay, T. Bandyopadhyay, B. K. Modak, S. Datta, and K. K. Mukherjee. 2006. Enhancement of *in vitro* micro corm production in *gladiolus* using alternative matrix. *African Journal of Biotechnology* 5: 1204-1209.
- Sarasan, V., R. Cripps, M. Ramsay, C. Atherton, M. McMichen, G. Prendergast, and J. K. Rowntree. 2006. Conservation *in vitro* of threatened plants-progress in the past decade. *In vitro Cell Develop Biology Plant* 42: 206-214.
- SAS. 2002. User's Guide of SAS (Statistical Analysis System) Version 9. SAS Institute Inc. Ninth Edition. Cary, North Carolina, USA. 550 p.
- Sen, J., and S. Sen. 1995. Two-step bud culture technique for a high frequency regeneration of *Gladiolus* corms. *Scientia Horticulturae* 64: 133-138.
- Shillo, R., and A. H. Helevy. 1976a. The effect of various environmental factors on flowering of gladiolus. I Light intensity. *Scientia Horticulturae* 4: 131-137.

- Shillo, R., and A. H. Helevy. 1976b. The effect of various environmental factors on flowering of gladiolus. III Temperature and moisture. *Scientia Horticulturae* 4: 147-155.
- Shillo, R., and A. H. Halevy. 1981. Flower and corm development in gladiolus as affected by photoperiod. *Scientia Horticulturae* 14: 187-196.
- Steinitz, B., A. Cohen, Z. Goldberg, and M. Kochba. 1991. Precocious gladiolus corm formation in liquid shake cultures. *Plant Cell Tissue Organic Culture* 26:63-70.
- Strasser, R. J., A. Srivastava, and A. Govindjee. 1995. The polyphasic chlorophyll a fluorescence transient in plants and cyanobacteria. *Photochemistry and Photobiology* 61: 32-42.
- Strasser, R. J., A. Srivastava, and M. Tsimilli-Michael. 2000. The fluorescence transient as a tool to characterize and screen photosynthetic samples. *In: Probing Photosynthesis: Mechanisms, Regulation and Adaptation*. M. Junus, U. Pathre, and P. Mohantray (eds). Taylor and Francis LTD. London, UK. pp: 445-483.
- Taiz, L., and E. Zeiger. 2006. *Plant Physiology*. 4th Edition. Sinauer Associates, Inc., Publishers. Sunderland, Massachusetts, USA. 764 p.
- Vidalie, H. 2001. *Producción de Flores y Plantas Ornamentales*. 3^{ra} Ed. Mundi-Prensa. Madrid, España. 270 p.
- Ziv, M. 1979. Transplanting gladiolus plants propagated *in vitro*. *Scientia Horticulturae* 11: 257-260.
- Ziv, M., A. H. Halevy, and R. Shillo. 1970. Organs and plantlet regeneration of *Gladiolus* through tissue culture. *Annual Botany* 34: 611-676.

CAPITULO V
PUDRICIÓN DEL CORMO DE GLADIOLO EN ALMACÉN CAUSADA POR DOS
ESPECIES DE *Penicillium*

RESUMEN

La producción de gladiolo (*Gladiolus grandiflorus* Hort.) es la actividad económica más importante en la región de San Martín Texmelucan, Puebla. Las enfermedades más importantes del cultivo en México, son causadas por hongos del suelo y del cormo en almacén. El objetivo de esta investigación fue identificar especies de *Penicillium* causantes de la pudrición del cormo en almacén. De una sub-muestra de 20 cormos se aislaron 16 colonias de *Penicillium*, cinco fueron patogénicas de acuerdo con los postulados de Koch y causaron pudrición seca de cormos con diferencias en agresividad de 16 a 46 % de daño. Su identificación fue de acuerdo con su morfología, cultural y fisiológica en seis medios de cultivo (CYA, Cz'P, MEA, ME2 %, OA y YES). La caracterización molecular fue por secuenciación del gen Beta Tubulin1. Se identificó la especie *P. brevicompactum* por morfología y 99.8 % de similaridad en GenBank. Otra especie no fue identificada con base en los criterios utilizados por lo que se considera como *P. sp.* y requerirá de mayor análisis para su identificación.

Palabras clave: taxonomía, Beta Tubulin1, gladiolo, secuenciación

5.1. INTRODUCCIÓN

En todo el mundo el gladiolo (*Gladiolus grandiflorus* Hort.) es una de las ornamentales más importantes para flor de corte. Este cultivo en México ocupa el tercer lugar en producción con una superficie de 2.5 mil ha (SIAP, 2010). De las enfermedades del cultivo, las del suelo que infectan al cormo e inducen la marchitez y muerte de las plantas son causadas por diversas especies de hongos (González-Pérez *et al.*, 2008, 2009). Esto ocasiona que sea una necesidad el rotar el cultivo, y dejar de sembrar gladiolo de 6-8 años después de cada ciclo anterior (comunicación personal con Presidente de la Asociación de Productores de Gladiolo). Además de las enfermedades del cormo en campo, en almacén los cormos pueden ser podridos por especies de *Penicillium*. *P. gladioli* L. McCulloch & Thom ha sido la principal especie que causa la pudrición seca del cormo en almacén en varios países del mundo [México (Leyva, 1992) y USA] (Onions, 1966) y Brasil (Chandel y Deepika, 2010). En Estados Unidos, *P. funiculosum* Thom y *P. sp.*, también han sido reportados en cormos de gladiolo en almacén (Farr *et al.*, 1989). Tales especies de *Penicillium* se encuentran en el suelo y contaminan los cormos que son transportados en contenedores y almacenados en condiciones inapropiadas de temperatura y humedad, lo que propicia y difunde la pudrición del cormo en almacén. Otro problema se deriva en campo cuando los cormos infectados por *Penicillium* son usados en las siembras. En campo, el cormo madre infecta la base del nuevo cormo y de ahí el síntoma de pudrición avanza al corazón de éste causando su destrucción y por consiguiente, la marchitez y muerte de la planta. Tales daños se estiman de un 15 % causados por *Penicillium* (Jackson, 1961).

En la región de San Martín Texmelucan, Puebla, las pérdidas estimadas por pudrición del cormo en almacén son de 30 a 50 % (comunicación personal con Presidente de la Asociación de Productores de Gladiolo). En estudios previos en esta misma región se aislaron especies desconocidas de *Penicillium* de cormos infectados en almacén y en campo y se demostró su patogenicidad, (González-Pérez *et al.*, 2009). Por ello, el objetivo del estudio fue identificar las especies de *Penicillium* causantes de la pudrición del cormo.

5.2. MATERIALES Y MÉTODOS

5.2.1. Muestreos

En 2008 se realizaron muestreos de cormos en un almacén de Tlacotepec de José Manzo, El Verde, Puebla (19° 12'18" LN, 98° 26'54" LW y 2,425 m de altitud), en un clima Cw: templado húmedo con estación invernal seca y 17°C de temperatura media anual; periodo de lluvia de mayo a octubre con 800 mm de precipitación media anual y heladas frecuentes de noviembre a febrero (García, 1998).

De un lote de 20 costales (50 kg de cada uno) de cormos de la variedad Borrega Roja (BR; flores rojas) se extrajo 60 ± 5 g de cormos por costal, y con todos se formó una mezcla compuesta, y de la cual se obtuvo una sub-muestra de 500 g de cormos (48 cormos) tomados al azar. Los cormos se clasificaron en cinco categorías de acuerdo al daño observado: 1) sanos, 2) con manchas negras en túnicas, 3) con manchas en corona radical, 4) con pudrición seca, y 5) momificados. Para el análisis en cada categoría se seleccionaron cuatro cormos al azar.

5.2.2. Aislamientos fungosos

De cada cormo dañado o sano (20 en total) se cortaron cinco trozos de tejido (mitad dañada más mitad sana) de ± 0.25 cm² de área. Los trozos se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 1.5% por dos minutos, se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril y se secaron en toallas de papel estéril en una cámara de flujo laminar. Los tejidos por cormo se sembraron en cajas Petri con medio de cultivo de Potato-Carrot-Agar (PCA; 20 g de cada uno/L de agua) e incubaron por ocho días a 21 °C y luz negra constante de 40 W. Las diversas colonias de *Penicillium* desarrolladas se aislaron y purificaron por cultivo monospórico (Crous *et al.*, 2009) y las colonias se conservaron por suspensión de conidios en glicerol al 25 % a -85 °C.

5.2.3. Pruebas de patogenicidad

En 2009 en condiciones asépticas, 64 cormos aparentemente sanos, más cuatro cormos usados como testigo (sin hongo inoculado), se inocularon con 17 aislamientos de

Penicillium, de éstos, un aislamiento fue de referencia de la variedad Lupe de un estudio anterior (González-Pérez *et al.*, 2009) y 16 aislamientos fueron obtenidos del muestreo de cormo de la variedad BR en este estudio. Primero los cormos se limpiaron de residuos de túnicas o “scales”, se lavaron con agua jabonosa, enjuagaron en agua corriente y secaron. Enseguida se desinfectaron en hipoclorito de sodio al 1.5 % por dos minutos, se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril y secaron en toallas de papel estéril en una cámara de flujo laminar. En charolas de plástico de 33 x 12 x 10 cm (nuevas, desinfectadas, con papel toalla estéril en el fondo y humedecido con agua destilada estéril) se colocaron asépticamente cuatro cormos por charola y ésta dentro de bolsas de plástico para su inoculación por aislamiento. La inoculación fue por infiltración de una suspensión de conidios. Con cultivos de 10 días de edad se preparó una suspensión saturada de conidios en 10 mL de agua destilada estéril más una alícuota de gota de Tween 20. Enseguida con una jeringa estéril se infiltraron lentamente 2 mL de la suspensión de conidios por cormo y por aislamiento alrededor del área de emergencia del hipocótilo. Los cormos testigos se inocularon sólo con 2 mL de agua destilada estéril más el Tween. Las charolas se incubaron por 15 días a 100 % de HR y 28 ± 1 °C, después se cambiaron a HR ambiental (60 a 70 %) por otros 15 días, y se evaluaron.

5.2.4. Evaluación

En condiciones asépticas cada cormo fue partido verticalmente atravesando su centro. a) Se midió la superficie expuesta total en cm^2 (largo por ancho), b) La superficie correspondiente a tejido sintomático alrededor del punto de inoculación también se midió (cm^2) y ésta última se transformó a porcentaje de tejido infectado en relación a toda el área de cada cormo, y c) Para demostrar los postulados de Koch (Agrios, 2005), del margen de tejidos sintomáticos internos de cada cormo, se re-aisló al hongo en cultivo-agar puro y monospórico, como especificado anteriormente.

5.2.5. Identificación morfológica

Se realizó con base en la metodología y claves de Frisvad y Samson (2004). Para la identificación a especie se seleccionaron los cinco aislamientos que fueron patogénicos y se basó en tres parámetros: a) morfología en condiciones estándares de medio de cultivo e

incubación, b) características culturales de las colonias, y c) algunos caracteres fisiológicos. Los medios de cultivo usados fueron seis: CYA (Czapek-levadura autolizada-agar), Cz'P (Czapek Dox-agar), MEA (extracto de malta-agar), ME2 % (extracto de malta-agar 2 %), OA (harina de avena-agar) y YES (extracto de levadura-sacarosa-agar). Primero, de cada aislamiento esporulado de 10 días de edad se hizo una suspensión saturada de conidios en agua destilada estéril. Enseguida se tomaron 20 µl que se depositaron por triplicado y equidistantes cada uno, sobre el medio de cultivo por caja de plástico Petri de 9 cm de diámetro.

5.2.6. Morfología

En cajas con MEA se sembró cada aislamiento con tres repeticiones por caja como arriba indicado, e incubaron en oscuridad constante a 25 °C por 14 días. Para los análisis morfológicos de cada aislamiento se hicieron montajes en ácido láctico al 60 % y se observaron usando campo de contraste de fases en microscopio compuesto (Nikon, ECLIPSE E400, Japón) y se realizaron 20 mediciones por estructura en micrómetros a 100X con aceite de inmersión. Las estructuras medidas fueron: longitud y ancho del conidio, longitud de la fiálide y célula soporte (métula), y largo y ancho del conidióforo. En este último se determinó forma del tallo (recto o curvado), grado de compactación y patrón de ramificación de métulas (biverticillate, terverticillate, o quaterverticillate). Otras observaciones fueron la ornamentación (lisa, rugosa o equinulada) de conidios y tallos del conidióforo, y la forma de fiálides.

Para inducir la formación de esclerocios los aislamientos se sembraron en CYA, MEA, ME2 %, y OA, e incubaron en oscuridad continua a 25 y 30 °C por tres y cuatro semanas.

5.2.7. Características culturales

En colonias de 7 días de edad en los medios CYA, Cz'P (30 °C), MEA y YES incubadas a 25 °C, se midió (cm) el diámetro de cada colonia, y otras características como: coloración por el reverso (CYA), y presencia y coloración de exudados; en YES también se midió el diámetro de cada colonia, coloración por el reverso y el grado de esporulación

según la siguiente escala: 0 = sin o pobre esporulación, 1 = esporulación sólo en el centro de la colonia, y 2 = esporulación en más del 90 % de la colonia; en MEA fue la textura del micelio aéreo [velutinous (aterciopelado), floccose (ligeramente algodonoso) o crustose (costroso)], y agrupación de conidióforos: fasciculados (en pequeños grupos o racimos) o sinematosos.

5.2.8. Caracteres fisiológicos

Se determinó en colonias de 7 días y fue la presencia de ácido ciclopiazónico (formación de anillos de color violeta) y otros alcaloides (anillos rosa-rojo y amarillo) determinados por la reacción de coloración con el reactivo de Ehrlich (Lund, 1995 citado por Frisvad y Samson, 2004). De los cultivos en CYA se tomó un disco de 0.5 cm de diámetro del centro de cada colonia y sobre éste se colocó por 2-6 min papel filtro (Whatman No. 1) de 1.0 cm de diámetro impregnado con el reactivo de Ehrlich. La reacción de coloración se consideró débil si se presentó después de 7 min y nula si se presentó después de 10 min.

5.2.9. Análisis molecular

Cinco aislamientos monoconidiales de especies de *Penicillium* (Nos. 10, 11, 14, 15, y 17) se analizaron por amplificación del gene β -Tubulin1 (Bt1) con los iniciadores (primers): Bt1a (5'-TTCCCCCGTCTCCACTTCTTCATG-3') y Bt1b (5'-GACGAGATCGTTCATGTTGAACTC-3') (Glass & Donaldson, 1995). La extracción de ADN de los aislamientos se realizó con el kit AxyPrep Multisource Genomic ADN Miniprep Kit (Axygen Biosciences, USA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La calidad del ADN se evaluó por electroforesis en gel de agarosa (0.8 %, y el marcador Lambda Hind III DNA). Todas las reacciones de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) (White *et al.*, 1990) se realizaron con un volumen final de la mezcla de 25 μ L y el programa de amplificación se corrió en un termociclador Biometra (TGradient Thermal Cycler, Ref. 050-801, USA).

La mezcla de reacción se compuso de: 15 μ L de agua estéril ultrapura, 2.0 μ L de ADN, 2.5 μ L de solución buffer 10X, 0.8 μ L de MgCl₂ a 50 mM, 0.5 μ L de la mezcla de dNTPs a 10 mM, 2 μ L de cada primer a 10 pmol/ μ L, y 0.2 μ L de Taq-DNA polimerasa a 5

U/μL (Invitrogen[®], USA). El programa usado fue el siguiente: desnaturalización inicial a 94 °C por 1 min, 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 20 s, alineación a 60 °C por 25 s, y extensión a 72 °C por 40 s; y una extensión final a 72°C por 7 min.

El producto de PCR se purificó y secuenció en dos direcciones (5 → 3 and 3 → 5) por la Cía. MACROGEN (South Korea) con un secuenciador ABI 3700 (Applied Biosystems, USA) y con los mismos primers Bt1a, Bt1b.

Las secuencias se analizaron con el programa Lasergene[®] 2001, Versión 5 (DNASTAR, Inc., USA) (DNASTAR, 2001). Cuando en algunas secuencias algunos nucleótidos se detectaron visualmente que no se complementaban entre sí, entonces de manera manual se ajustaron cuando fue necesario y 100 % confiable, en base a los cromatogramas en formato “abi” generados por el programa de secuenciación; y en otros casos se volvió a secuenciar. Las secuencias se alinearon en la base de datos del banco de genes del National Center for Biotechnology Information (NCBI, USA).

Un análisis filogenético múltiple con los genes Bt1 y de las regiones internas ITS1, ITS2 de genes rRNA fue construido con 14 secuencias: cinco obtenidas de este estudio (depositadas en NCBI), más una secuencia de un estudio anterior (DQ279802; González-Pérez *et al.*, 2009), y ocho bajadas del banco de genes del NCBI.

El árbol filogenético se construyó por el método de Neighbor-Joining, Kimura 2-parameter, con 5000 réplicas de bootstrap del programa *MEGA* versión 5 (Tamura *et al.*, 2011). Una secuencia de *Celophorte* sp. (HQ730818) fue la raíz para las secuencias del gen Bt1 y la secuencia de *A. tenuissima* (AF347032) para las secuencias de las regiones internas ITS.

5.2.10. Análisis estadístico

Los datos del porcentaje de área infectada en los cormos inoculados y sus testigos se sometieron a un análisis de varianza en un diseño completamente al azar (18 tratamientos y cuatro repeticiones) y se hizo la comparación de medias por Tukey ($P > 0.05$) usando el programa Statistical Analysis System (SAS Institute, 2002).

5.3. RESULTADOS Y DISCUSION

5.3.1. Aislamientos

De los tejidos de cormos de almacén con síntomas de pudrición seca y sembrados en PCA, fueron aisladas 20 colonias: una de *Alternaria*, tres de *Fusarium*, y 16 de *Penicillium*.

5.3.2. Identificación

Los cinco únicos aislamientos de *Penicillium* que resultaron patogénicos se identificaron en dos especies: *P. brevicompactum* Dierckx y *P. sp.* (Frisvad y Samson, 2004; Raper y Thom, 1949).

La primera especie fue de los aislamientos 14 y 15, y se caracterizó morfológicamente por conidios en cadena principalmente elipsoidales, verde, lisos y de 2.8-4.0 x 2.5-3.0 μm ; fiálides en forma de botella de 7.5-9.5 μm , célula soporte terverticillate (3 ramas) de 9-13 μm , conidióforos lisos de 453-500 x 3.8-5.0 μm , ramificación compacta, y no formó esclerocios (Cuadro 1, Fig. 1C-1G); colonia aterciopelada o ligeramente algodonosa, amarillo crema por el reverso, con difusión de pigmento pálido amarilloso, presencia de exudados amarillo pálido a coloración ámbar, y diámetro de 5-9 (Cz'P), 13-19 (MEA) y 20-31 (YES) mm; y no formó ácido ciclopiazónico u otros alcaloides (Cuadro 2, Fig. 1A, 1B).

Cuadro 1. Comparación de estructuras morfológicas en μm de dos aislamientos de *Penicillium* de cormos de gladiolo en almacén de la variedad Borrega Roja en Tlacotepec de José Manzo, El Verde, Pue., con la especie de *P. brevicompactum* alineada en el banco de genes del NCBI* con 99.8% de similitud.

Estructuras morfológicas en MEA***	No. de aislamientos		Referencia**
	14	15	<i>P. brevicompactum</i>
<u>Conidios</u>			
forma	elipsoides, algunos globosos	elipsoides, algunos globosos	elipsoides
color (CYA)	verde opaco	verde	verde-opaco a verde-gris
ornamentación	lisos	lisos	finamente rugosos
tamaño (largo x ancho)	3.2-4.0 x 2.5-2.8	2.8-4.0 x 2.5-3.0	2.5-3.5 x 2.0-2.5
<u>Fiálides</u>			
largo	7.5-9.0	8.2-9.5	6.5-9.0
forma	de botella	de botella	de botella
<u>Célula soporte (metula)</u>			
largo	9.0-13.0	11.5-13.0	10.0-15.0
ramificación	terverticillate	terverticillate	terverticillate

continuación Cuadro 1....

Estructuras morfológicas en MEA***	No. de aislamientos		Referencia**
	14	15	<i>P. brevicompactum</i>
<u>Conidióforo</u>			
tallo (largo x ancho)	453-500 x 3.8-5.0	468-500 x 4.0-4.5	400-800 x 4.0-6.0
ornamentación	liso	liso	liso
ramas	compactadas	compactadas	compactadas
Esclerocios [▲]	---	---	---

*National Center for Biotechnology Information

**Frisvad y Samson (2004)

---No se formaron

***Medio de cultivo de Malta Extracto Agar incubado a 25°C por 14 días en oscuridad continúa

[▲]En CYA, MEA, ME2% y OA incubados a 25 y 30°C en oscuridad continúa por 3 y 4 semanas.

Cuadro 2. Comparación de características culturales y fisiológicas de dos aislamientos de *Penicillium* de cormos de gladiolo en almacén de la variedad Borrega Roja de Tlacotepec de José Manzo, El Verde, Pue., con la especie de *P. brevicompactum* alineada en el banco de genes del NCBI^Δ con 99.8% de similaridad.

Características de colonias [¶]	No. de aislamiento		Referencia*
	14	15	<i>P. brevicompactum</i>
<u>Culturales:</u>			
Textura micelio aéreo (MEA) ¹	velutinous (con margen blanco)	Floccose (ligeramente algodonoso) (con margen blanco)	velutinous (aterciopelado)
Grado de esporulación (YES)	2 (abundante)	2	no mencionado
Color por reverso:			
CYA ²	amarillo crema	amarillo crema	beige a amarillo crema
YES ³	amarillo crema	amarillo crema	crema a beige**
Pigmento difusible (CYA)	pálido amarilloso	pálido amarilloso	pálido a café claro

continuación Cuadro 2....

Características de colonias [¶]	No. de aislamiento		Referencia*
	14	15	<i>P. brevicompactum</i>
<u>Diámetro (mm):</u>			
CYA	25-28	22-26	14-30
CzP	5-9	7-8	9-18
MEA	13-15	17-19	10-26
YES	20-31	27-31	20-36
Exudados (CYA)	amarillo pálido	crystalino ámbar	amarillo pálido, o café rojizo
<u>Fisiológicas:</u>			
Reacción de Ehrlich ⁴	no***	no	no, o amarillo

[¶]National Center for Biotechnology Information
rojo y difusible pigmento es producido

*Frisvad y Samson, 2004
¹Malta Extracto Agar

**En pocos aislamientos un notorio
²Czapek-levadura autolizada-agar

³Extracto de levadura-sacarosa-agar

⁴Presencia de ácido ciclopiazónico u otros alcaloides en base a coloración

***Color amarillo tenue solo en la periferia del papel, no alrededor de la colonia como esperado según Frisvad y Samson (2004)

[¶]En oscuridad continúa por 7 días a 25°C (excepto CzP que fue a 30°C).

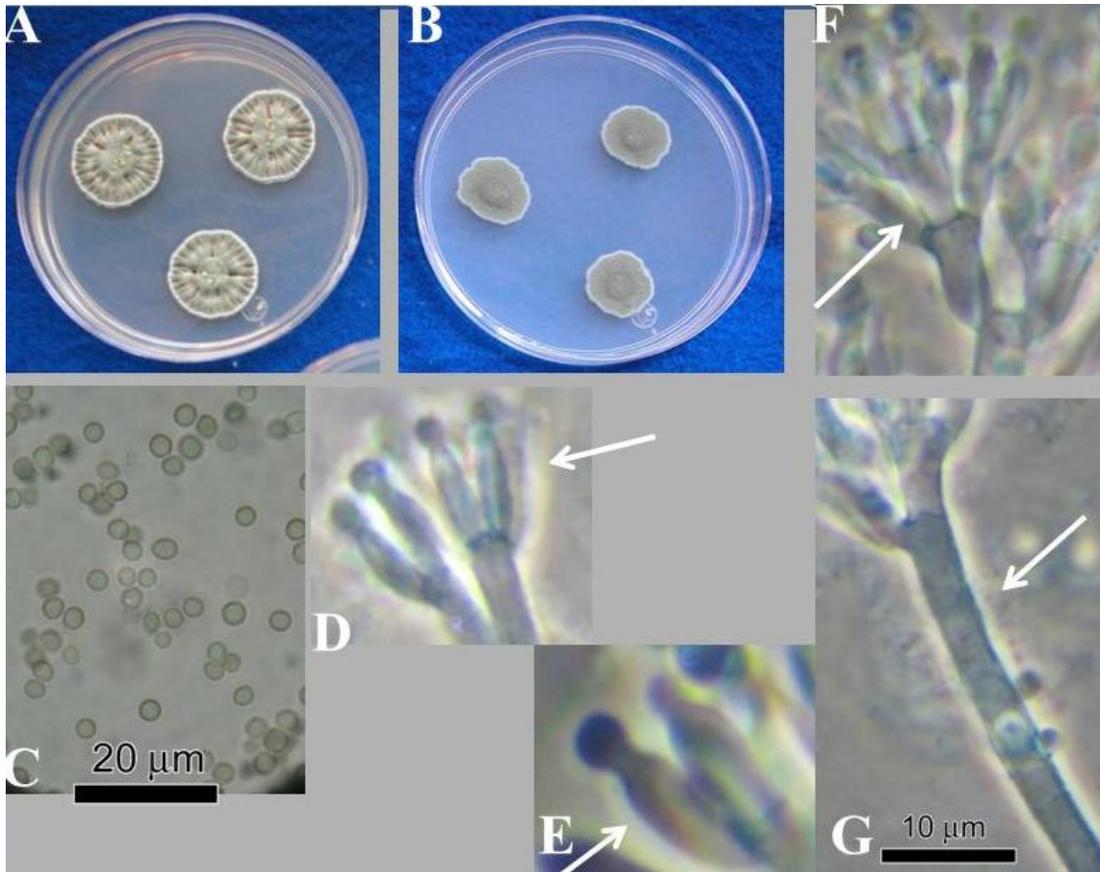


Figura 1. *Penicillium brevicompactum*. A) Colonias en CYA, B) Colonias en MEA, C) Conidios, D, E) Fiálide en forma de botella más un conidio apical, F) Métulas G) Tallo liso del conidióforo. Las ampliificaciones D-G fueron a 100X, y C fue a 40X. Barras en micrómetros (C, G).

La segunda especie no fue identificada, *P. sp.* y correspondió a tres aislamientos, Nos. 10, 11 y 17. Ésta se caracterizó morfológicamente por conidios en cadena globosos, verde claro y verde olivo, lisos y de 2.5-4.0 x 2.2-3.6 µm; fiálides en forma de botella de 8.2-9.4 µm, célula soporte biverticillate (2 ramas) y terverticillate (3 ramas) de 9-13 µm, conidióforos rugosos de 192-311 x 2.9-4.1 µm, ramificación compacta, y no formó esclerocios (Cuadro 3, Fig. 2C-2H); colonia aterciopelada, café claro a beige por el reverso, sin difusión de pigmento, nula presencia de exudados, y diámetro de 19-37 (CZP), 36-47 (CYA) y 41-52 (YES) mm; y no formó ácido ciclopiazónico u otros alcaloides (Cuadro 4, Fig. 2A, 2B).

Cuadro 3. Comparación de estructuras morfológicas en μm de tres aislamientos de *Penicillium* de cormos de gladiolo en almacén de la variedad Borrega Roja de Tlacotepec de José Manzo, El Verde, Pue., con la especie de *P. chrysogenum* alineada en el banco de genes del NCBI* con 94.3% de similitud.

Estructuras morfológicas en MEA***	No. de aislamiento			Referencia**
	10	11	17 [▲]	<i>P. chrysogenum</i>
<u>Conidios</u>				
forma	globosos	globosos	globosos	globosos a elipsoides
color (CYA)	verde claro	verde olivo	verde olivo	azul verde a verde
ornamentación	lisos	lisos	lisos	lisos
tamaño (largo x ancho)	2.5-4.0 x 2.2-2.7	2.5-3.7 x 2.2-2.7	2.8-4.0 x 2.8-3.6	2.5-4.0 x 2.3-3.5
<u>Fiálides</u>				
largo	9.0-9.4	8.6-9.4	8.2-9.1	7.0-9.0
forma	de botella	de botella	de botella	de botella

continuación Cuadro 3....

Estructuras morfológicas	No. de aislamiento			Referencia**
en MEA***	10	11	17 [▲]	<i>P. chrysogenum</i>
<u>Célula soporte (métula)</u>				
largo	11-13	10-12	9-12	8-12
ramificación	biverticillate, terverticillate	biverticillate, terverticillate	biverticillate, terverticillate	bi-, ter-, quarterverticillate
<u>Conidióforo</u>				
tallo (largo x ancho)	228-311 x 2.9-3.5	205-298 x 3.0-3.5	192-246 x 3.2-4.1	200-300 x 3.0-4.0
ornamentación	rugoso	rugoso	rugoso	rugoso
ramas	Compactado	Compactado	Compactado	Compactos y divergentes
Esclerocios [¶]	---	---	---	---

*National Center for Biotechnology Information

**Frisvad y Samson, 2004

***Medio de cultivo de Malta Extracto

Agar incubado a 25°C por 14 días en oscuridad continúa
un estudio previo (González-Pérez *et al.*, 2009), aislado de la variedad Lupe
y 30°C en oscuridad continúa por 3 y 4 semanas.

---No se formaron

[▲]Aislamiento de referencia de

[¶]En CYA, MEA, ME2% y OA incubados a 25

Cuadro 4. Comparación de características culturales y fisiológicas de tres aislamientos de *Penicillium* de cormos de gladiolo en almacén de la variedad Borrega Roja de Tlacotepec de José Manzo, El Verde, Pue., con la especie de *P. chrysogenum* alineada en el banco de genes del NCBI* con 94.3% de similitud.

Características de colonias [¶]	No. de aislamiento			Referencia**
	10	11	17 [▲]	<i>P. chrysogenum</i>
<u>Culturales:</u>				
Textura de micelio aéreo (MEA) ¹	velutinous (con margen blanco)	velutinous (con margen blanco)	velutinous (con margen blanco)	floccose a velutinous
Grado de esporulación	1***	1	1	2 (abundante)
Color por reverso:				
CYA ²	café claro a beige	café claro a beige	café claro a beige	crema, amarillo, café ⁴
YES ³	café claro	café claro	café claro	amarillo
Pigmento difusible (CYA)	no	no	no	pigmento amarillo

continuación Cuadro 4....

Características de colonias [¶]	No. de aislamiento			Referencia**
	10	11	17 [▲]	<i>P. chrysogenum</i>
Diámetro (mm):				
CYA	36-41	43-47	39-47	23-46
CzP	19-23	24-37	23-31	18-33
MEA	37-42	43-53	49-51	19-52
YES	41-46	44-46	48-52	40-64
Exudados (CYA)	no	no	No	frecuente, amarillo
Fisiológicas:				
Reacción de Ehrlich ⁵	no	no	no	no, o amarillo

*National Center for Biotechnology Information

**Frisvad y Samson, 2004

***solo en centro de colonia

[▲] Aislamiento de referencia de un estudio previo (González-Pérez *et al.*, 2009), aislado de la variedad Lupe.

¹Malta Extracto Agar

²Czapek-levadura autolizada-agar

³Extracto de levadura-sacarosa-agar

⁴Raramente

⁵Presencia de ácido ciclopiazónico y otros alcaloides en base a coloración

[¶]En oscuridad continua por 7 días a 25°C (excepto CzP que fue a 30°C).

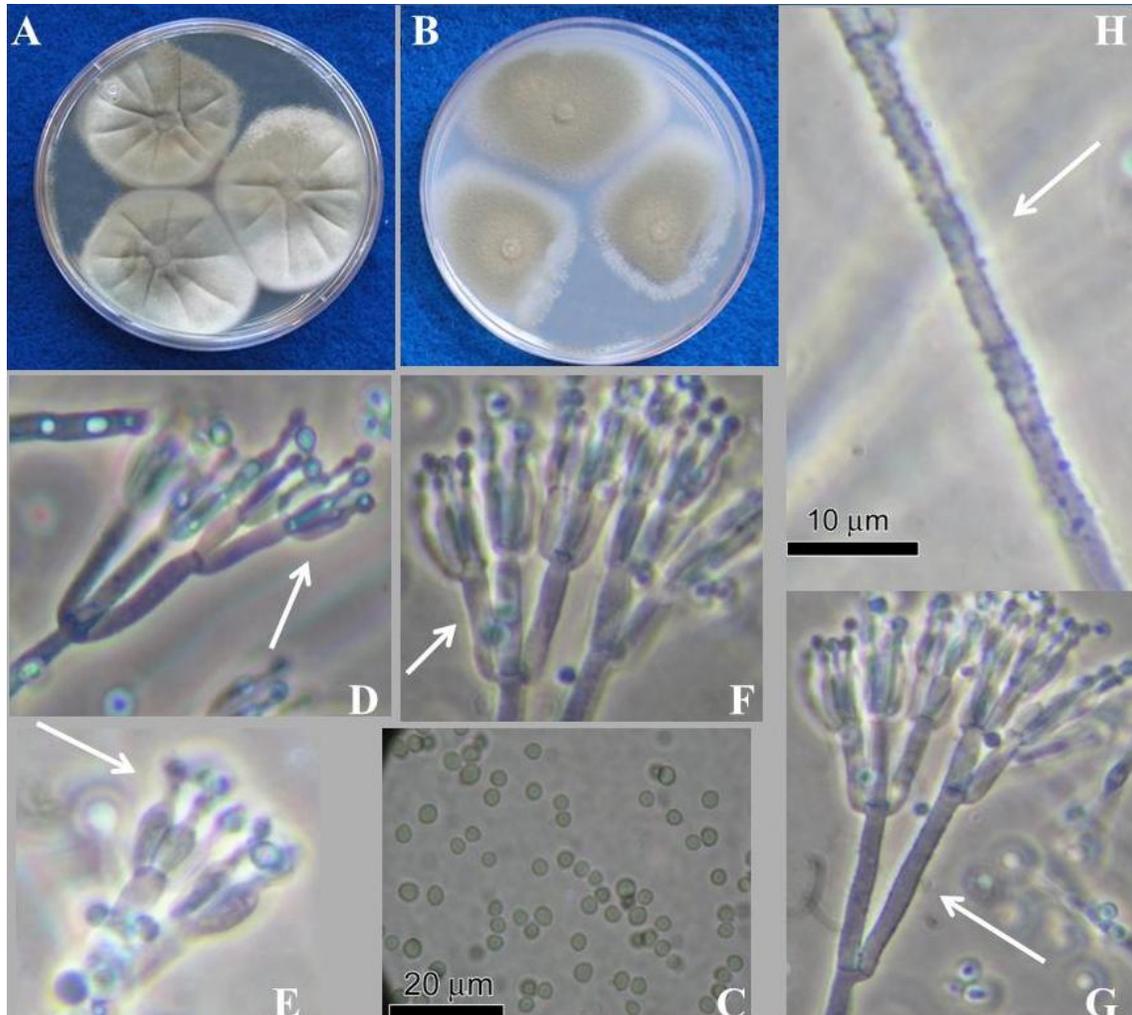


Figura 2. *Penicillium* sp. A) Colonias en CYA, B) Colonias en MEA, C) Conidios; D, E) Fiálide en forma de botella más un conidio apical, F) Métulas, G) Ramas de conidióforo, H) Tallo del conidióforo con ornamentaciones. Las ampliaciones D-H fueron a 100X y la C fue a 40X. Barras en micrómetros (C, H).

P. sp. se comparó con *P. chrysogenum* Thom como la especie más posible y más cercana especie según las claves y descripciones de Frisvad y Samson (2004) y Raper y Thom (1949), y de acuerdo a sus características se demostró que difieren en morfología del color de conidios, células soporte que son hasta quarterverticillate (4 ramas) en *P. chrysogenum* (Cuadro 3); y diversas características culturales de *P. sp.*, como grado de esporulación, color de colonia por el reverso, sin producción de pigmento difusible, y ausencia de exudados (Cuadro 4).

Ambas especies descritas en este estudio no formaron esclerocios, lo que las diferencia de *P. gladioli*, que sí forma esclerocios. *P. gladioli* ha sido la principal especie reportada en cormos de almacén, aunque actualmente se considera extinta por la práctica continua de tratamiento químico según Frisvad y Samson (2004). Otra especie reportada en cormos de gladiolo es *P. funiculosum* Thom que se caracteriza por formar hifas aéreas en forma de cuerdas y producir en Czapek-agar coloración amarillo a anaranjado o rojo por el reverso de las colonias (Raper y Thom, 1949), características culturales que la distinguen de las especies de este estudio.

5.3.3. Pruebas de patogenicidad

De los 17 aislamientos de *Penicillium* inoculados en cormos de la variedad BR, sólo cinco fueron patogénicos (Cuadro 5). Estos de acuerdo al porcentaje de infección causada a los 30 días se agruparon confidentemente en tres categorías por su agresividad con base en la prueba de Tukey (Cuadro 5).

Cuadro 5. Clasificación de aislamientos de *Penicillium* spp., aislados de cormos en almacén, por la infección causada en cormos de la variedad Borrega Roja, en Tlacotepec de José Manzo, El Verde, Pue., en 2009.

# de aislamiento y especie*	†Superficie infectada (%)	Agresividad
15. <i>P. brevicompactum</i>	46.4a	Alta
14. <i>P. brevicompactum</i>	32.3ba	Moderada
17. <i>P. sp.</i>	32.1ba	Moderada
11. <i>P. sp.</i>	19.1c	Baja
10. <i>P. sp.</i>	16.7c	Baja
1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 12, 13, 16	0.0 d	No patogénicos
Testigo	0.0 d	Sin daño

DMS = 1.34

†Valores con la misma letra en columna indican valores estadísticamente iguales

(Tukey, $P < 0.05$)

DMS = Diferencia mínima significativa

*En orden de mayor a menor porcentaje de infección causada.

En comparación al testigo que permaneció sano (Fig. 3A), los dos aislamientos de *P. brevicompactum* (14 y 15) tuvieron de moderada a alta agresividad con 32.3 a 46.4 % de pudrición seca del cormo (Fig. 3B, 3C); y en los otros tres aislamientos de *P. sp.* (10, 11 y 17) fue de baja a moderada con 16.7 a 32.1 % de agresividad o pudrición seca de cormo (Fig. 3D-3F). Por la infección, el corazón de los cormos mostraron pudrición seca y no formaron un nuevo cormo, en comparación al testigo que permaneció sano y que sí formó un nuevo cormo (Fig. 3A). De la periferia de tejidos infectados se re-aisló nuevamente el hongo inoculado en medio agar por cultivo monospórico, cumpliéndose así con los postulados de Koch (Agrios, 2005). Los cinco aislamientos se depositaron en la Colección de Cultivos Puros del laboratorio de Hongos Fitopatógenos No. 128, en Fitopatología, edificio de Fitosanidad.

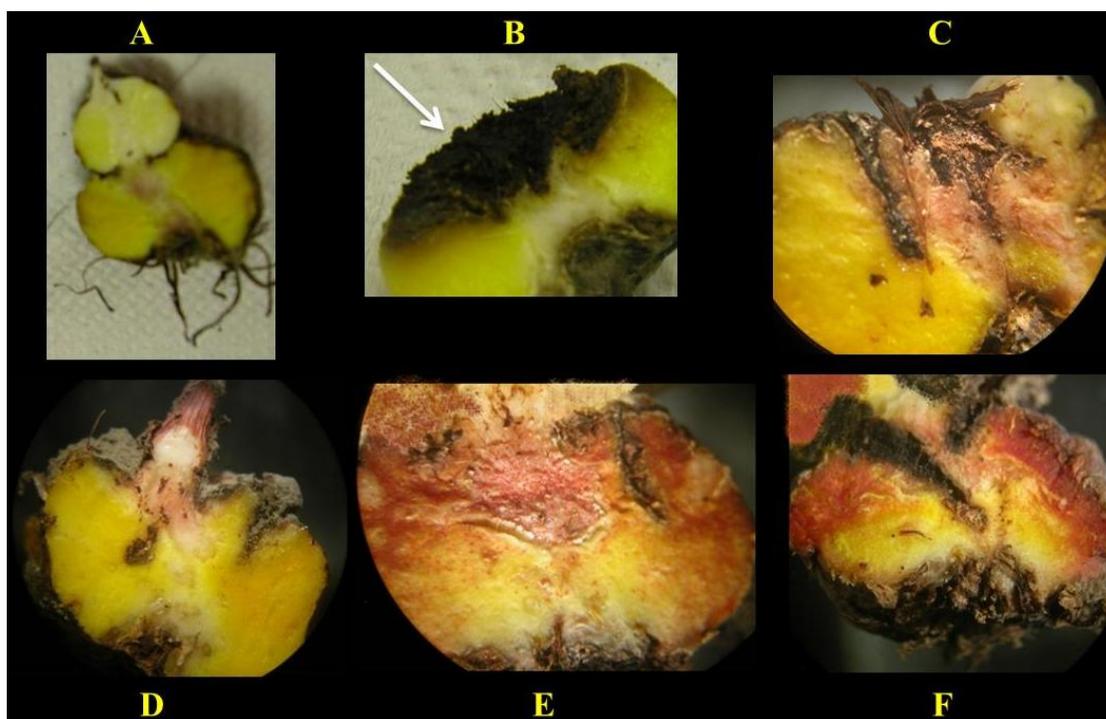


Figura 3. Síntomas de infección causados por cinco aislamientos de *Penicillium* a los 30 días de inoculación en cormos de la variedad Borrega Roja en comparación al testigo no infectado y que además produjo un nuevo cormo sano (A). Aislamientos 14 y 15 de *P. brevicompactum* (B-C) con moderada y alta agresividad por su porcentaje de área de infección; y 10, 11, 17 de *P. sp.* (D-F) con baja a moderada agresividad respectivamente. Ninguno de los cormos infectados produjo un nuevo cormo (B-F).

5.3.4. Caracterización molecular

El DNA tuvo un peso molecular con el marcador de Lambda Hind III de 12.2 kb (kilo bases) y la banda del producto del Bt1 gene fue de 500 bp (bases pares). Las secuencias en dos direcciones de cada aislamiento tuvieron 100% de similaridad. Por múltiple alineamiento la amplificada porción total de las cinco secuencias fue de 456-475 bp.

En el banco de genes las secuencias de los aislamientos 14 y 15 de *P. brevicompactum* Dierckx se alinearon con secuencias de la misma especie, *P. brevicompactum*, con 99.8 % de similaridad (No. de accesoión FJ012879) y seguido por *P. bialowiezense* K.M. Zalessky con baja similaridad, 98.5 % (JF302653). Las secuencias de los otros aislamientos (10, 11, 17) de *P. sp.*, fue con secuencias de *P. chrysogenum* Thom (XM002559715) con lejana similaridad, 94.3 %.

El aislamiento 17 de *P. sp.* en un estudio previo (González-Pérez *et al.*, 2009) se secuenció (DQ279802) por amplificación de las regiones ITS de genes rRNA y se alineó en el banco de genes del NCBI con *P. simplicissimum* (Oudemans) Thom (HM469430) y *P. sp.* (DQ279802) con 100 % de similaridad en ambos casos, y actualmente sigue la misma alineación y similaridad en NCBI. Por morfología *P. simplicissimum* difiere del aislamiento 17 (*P. sp.*) en que los conidios de *P. simplicissimum* son finamente equinulados y el reverso de la colonia es sin color a color amarillo (Raper y Thom, 1949). En este estudio se retomó el análisis para corroborar que la amplificación de ambos genes Bt1 y rRNA, mostraron que el aislamiento 17 y los otros dos (10, 11) de *P. sp.*, y que tuvieron igual secuencia, son una especie desconocida o quizás que cuya secuencia no se ha depositado en el banco de genes. Se amplificaran otros genes incluyendo Beta-Tubulin2.

Por otro lado, por ITS la secuencia de *P. gladioli* (DQ339568) mostró 91.8 % de similaridad con las secuencias de los anteriores aislamientos de *P. sp.*, y lo que indica molecularmente además de lo especificado por morfología, que son especies totalmente diferentes.

Para la construcción del árbol filogenético (Fig. 4) se cortaron todas las secuencias a una porción de 352 bp. Como esperado, las secuencias por Bt1 se agruparon en una rama, y las de ITS en otra rama. Con 90 a 100 % de confiabilidad (“bootstrap” replicas), en una sub-rama se agruparon las secuencias de aislamientos 14 y 15 por Bt1 de *P.*

brevicompectum con sus secuencias alineadas, y en otra sub-rama las de los aislamientos 10, 11, y 17 de *P. sp.*, mientras que *P. chrysogenum* se ubicó en una sub-rama diferente a las dos anteriores, y mostró una marcada distancia genética. En la segunda rama por ITS, *P. gladioli* se diferenció en una sub-rama de las otras secuencias de *Penicillium*. Las secuencias de estudio se transformaron a secuencia de “proteínas” con DNASTAR software y se depositaron en NCBI para obtener los números de accesión

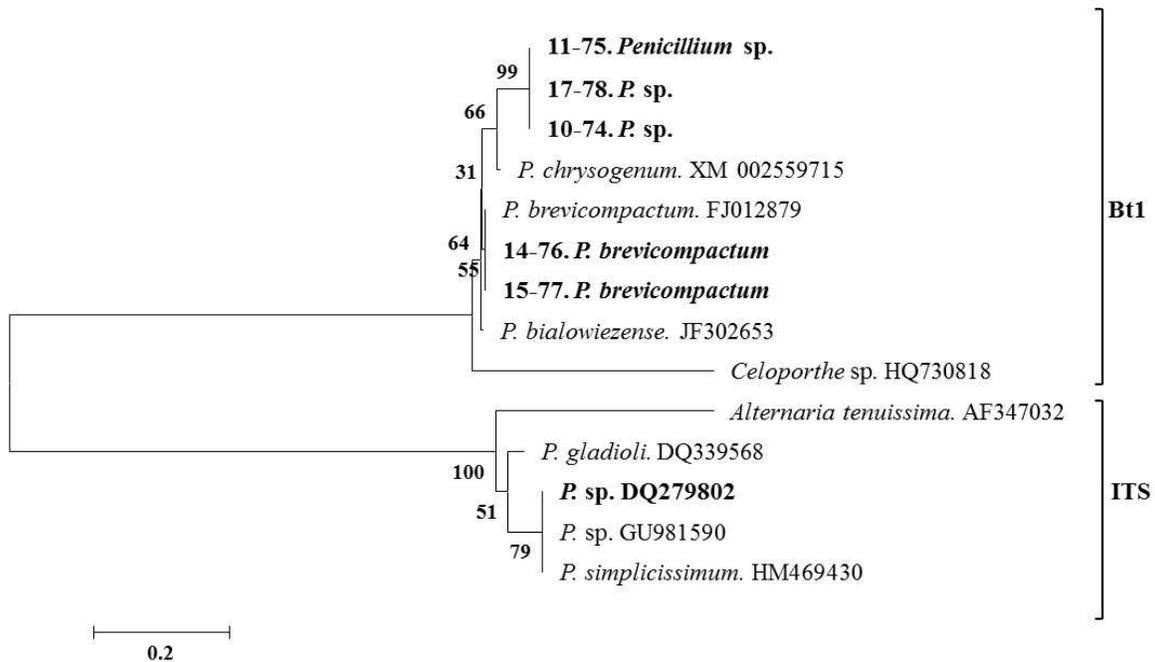


Figura 4. Árbol filogenético que muestra el alineamiento de cinco secuencias por amplificación del gen Bt1 de aislamientos de cormos de almacén con pudrición seca (en azul), y la secuencia por ITS (*P. sp.* DQ279802) de un estudio previo (González-Pérez *et al.*, 2009). El árbol se construyó de acuerdo al método de Neighbor-Joining, Kimura 2-parameter, con 5000 réplicas, bootstrap, de confianza del programa *MEGA* versión 5. Las raíces del árbol fueron secuencias del banco de genes: *Celoporthes* sp (HQ730818) para el gen Bt2 y *A. tenuissima* (AF347032) para las regiones internas ITS. Las otras secuencias en bold normal fueron del NCBI. La barra (0.2) indica la distancia genética de acuerdo al método de Neighbor-Joining.

La especie patógena identificada en el presente estudio ha sido registrada en la literatura en diversos cultivos, pero no en gladiolo. Se conoce que *P. brevicompectum*

habita en suelos agrícolas y tiene como hospedantes cultivos de avena, cebada, y trigo (Frisvad y Samson, 2004). Se ha reportado que causa pudrición de bulbos de *Lilium candidum* y *Tulipa gesneriana* (tulipán holandés) (ambas de la Familia Liliaceae) (Ress, 1993). En la región de estudio el bulbo del tulipán se conserva en los mismos almacenes que el gladiolo, se infiere que al estar en las mismas condiciones ambientales de almacenamiento esta especie paso del tulipán al gladiolo y a partir de entonces se ha convertido en un patógeno del gladiolo que causa pudrición seca en almacén. Por otro lado, *P. chrysogenum* es muy común encontrarlo al aire libre; en China se ha reportado en suelos agrícolas (Frisvad y Samson, 2004), pero se desconoce si esta especie afecta plantas o causa deterioro de estructuras vegetativas en almacén. Con respecto a la especie no identificada, *P. sp.*, Farr *et al.* (1989) reportan *P. spp.* en cormos de gladiolo en USA.

5.4. CONCLUSIONES

Las dos especies caracterizadas de *Penicillium* mostraron ser responsables de la pudrición seca del cormo en almacén en la región de San Martín Texmelucan, Puebla. Se reporta *P. brevicompactum* en cormos de gladiolo por primera vez en México y en el mundo. En el caso de *P. sp.*, no fue posible determinar la especie con las técnicas descritas en esta investigación, por lo que se tendrá que recurrir a la colaboración de algún experto de la IMA (International Mycological Association).

5.5. LITERATURA CITADA

- Agrios, G. N. 2005. Plant Pathology. 5th Edition. Academic Press. San Diego, California, USA. 635 p.
- Chandel, R., and R. Deepika. 2010. Recent advances in management and control of *Fusarium* yellows in *Gladiolus* species. Journal of Fruit and Ornamental Plant Research 18: 361-380.
- Crous, P. W., G. J. M. Verkley, J. Z. Groenewald, and R. A. Samson (eds). 2009. Fungal Biodiversity. CBS Laboratory Manual Series. CBS-KNAW. Fungal Biodiversity. Utrecht, The Netherlands. 269 p.
- DNASTAR. 2001. Lasergene expert sequence analysis software. User's manual. Version 5. DNASTAR Inc. Madison, Wisconsin, USA. 475 p.

- Farr, F. D., F. G. Bills, P. G. Chamuris, and Y. H. Rossman. 1989. Fungi on Plants and Plant Products in the United States. APS Press. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, USA. 1252 p.
- Frisvad, J. C., and R. A. Samson. 2004. Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*: A guide to identification of food and air-borne terverticillate *Penicillia* and their mycotoxins. pp: 1-174. In: Samson R. A., and J. C. Frisvad (eds.). *Penicillium* subgenus *Penicillium*: new taxonomic schemes and mycotoxins and other extrolites. Studies in Mycology No. 49. Utrecht, The Netherlands. 251 p.
- García, M. E. 1998. Modificaciones al Sistema de Clasificación Climática de Köppen. Instituto de Geografía. Universidad Nacional Autónoma de México. No. 6. 90 p.
- Glass, N. L., and G. C. Donalson. 1995. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. Applied Environmental Microbiology 61: 1323-1330.
- González-Pérez, E., M. J. Yáñez-Morales, H. M. Ortega-Escobar and J. Velázquez-Mendoza. 2008. First report of *Acremonium strictum* and *Gliocladium roseum* causing basal stem and corm rot of *Gladiolus grandiflorus* in Mexico. Journal of Plant Pathology 90: 586.
- González-Pérez, E., M. J. Yáñez-Morales, H. M. Ortega-Escobar and J. Velázquez-Mendoza. 2009. Comparative analysis among pathogenic fungal species that cause gladiolus (*Gladiolus grandiflorus* Hort.) corm rot in Mexico. Revista Mexicana de Fitopatología 27: 45-52.
- Jackson, C. R. 1961. *Penicillium* core rot of gladiolus. Phytopathology 52: 794-797.
- Leyva, M. S. G. 1992. Enfermedades del gladiolo (*Gladiolus* sp.). In: Memorias del II curso de acreditación técnica en el manejo y certificación fitosanitaria en ornamentales. Metepec, Edo de México. México. pp. 61-73.
- Lund, F. 1995. Differentiating *Penicillium* species by detection of indole metabolites using a filter paper method. Letters in Applied Microbiology 20: 228-231.
- Onions, A. H. S. 1966. *Penicillium funiculosum*. CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria. No. 98. Commonwealth Mycological Institute, Kew, UK.

- Raper, K. B., and C. Thom. 1949. A Manual of the *Penicillia*. The Williams and Wilkins Company. Baltimore, USA. 875 p.
- Rees, A. R. 1993. Ornamental Bulbs, Corms and Tubers. CAB International. Wallingford, UK. 220 p.
- SAS (Statistical Analysis System) Institute Inc. 2002. SAS/SAT User's Guide. Version 9. Ninth Edition. Volume 2. Cary, NC: SAS Institute Inc. 943 p.
- SIAP. 2010. Anuario el Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, ciclos 2009. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. *In*: http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_wrapper&view=wrapper&Itemid=351. Consultado el 2 de septiembre de 2010.
- Tamura, K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei, and S. Kumar. 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731-2739.
- White, T.J., T. Bruns, S. Lee, and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. pp: 315-322. *In*: M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky, and T.J. White (eds.). PCR Protocols: A guide to Methods and Applications. San Diego, California, USA. 482 p.

CAPÍTULO VI.

DISCUSIÓN GENERAL Y PERSPECTIVAS

Las ornamentales están entre las especies agrícolas con el mayor valor de la producción por hectárea y producen una derrama económica importante, debido a la inversión en infraestructura, insumos y mano de obra necesarios para su cultivo (Flores Almaraz y Lagunés Tejeda, 1998). En particular, el gladiolo (*Gladiolus grandiflorus* Hort.) es mundialmente apreciado como flor de corte, debido a sus colores y estética de la espiga floral. En México, ocupa el tercer lugar en importancia entre las ornamentales, con 3.6 mil hectáreas sembradas y un valor de la producción de \$ 739, 218.67 después de la rosa (*Rosa* spp.) y el crisantemo (*Chrysanthemum* spp.) (SIAP, 2011). El principal estados productor es Puebla, donde se siembra alrededor de 54 % de la producción nacional (SIAP, 2011). En la región de San Martín Texmelucan, Pue., el gladiolo es uno de los cultivos de mayor importancia. Este se produce en el periodo de marzo – septiembre. Las variedades de mayor importancia económica son Borrega roja, Grand prix, Borrega blanca y Espuma.

El presente trabajo contiene tres Capítulos en los que mediante diferentes experimentos se investigó sobre algunos de los principales factores que limitan la producción de gladiolo. En él se utilizaron herramientas para explorar de manera directa los factores que afectan la producción de flor de alta calidad: primeramente se obtuvo el conocimiento del desarrollo fenológico y uso de fertilización para el control de la pudrición del cormo (Capítulo III), en segundo lugar se estudió la técnica de cultivo *in vitro* para la obtención de cormo libre de enfermedades (Capítulo IV) y finalmente la identificación de las especies causantes de la pudrición del cormo en almacén (Capítulo V). A lo largo de los tres estudios se utilizarón la variedad Borrega roja, que es apreciada por su color rojo, espiga gruesa y su mayor valor económico durante todo el año; y la variedad Espuma que produce flor de color blanco y es la variedad más producida por su adaptabilidad a suelos pobres en nutrimentos y por su mayor tamaño de espiga. Se considera que la variedad Borrega roja es muy sensible a la pudrición del cormo causada por hongos fitopatogenos lo que la hace difícil de propagar, mientras que se ha observado que Espuma tiene mayor resistencia a estas enfermedades.

En esta discusión general, se pretende dar una visión integradora de lo expuesto en cada capítulo, identificando los principales resultados obtenidos.

En el capítulo III, se utilizaron dosis de fertilización para evaluar su efecto en la fenología, crecimiento, calidad de flor, rendimiento y sanidad de cultivo de dos variedades de gladiolo cultivadas a campo abierto. Estas dosis de fertilización son basadas en datos obtenidos en un estudio previo (González-Pérez *et al.*, 2009). Tienen como ventaja un efecto benéfico en la sanidad del cultivo, además de no afectar el desarrollo fenológico ni el rendimiento y calidad de la flor de gladiolo. Conocer correctamente la fenología es importante porque permitirá optimizar el manejo del cultivo buscando obtener mayor rendimiento y calidad de corno y flor. Además ayudara a los productores y técnicos a establecer estrategias de producción y control de patógenos. Las principales diferencias se presentaron debido al genotipo: la variedad Espuma fue superior en altura de planta (127.0 cm), índice de área foliar (1.50) y acumulación de grados día a madurez comercial (1286 grados-día) respecto a la variedad Borrega roja (114.5 cm, 1.29 y 1048 grados-día, respectivamente). La dosis de fertilización que controlo mejor la incidencia de enfermedades en campo fue la dosis que tuvo la menor concentración de N (40.5 kg ha⁻¹), lo cual demostró que en esta zona la aplicación de dosis bajas de N combinada con aportaciones de B y S, reduce la mortandad sin afectar la calidad y rendimiento del cultivo.

Al ser el principal problema del gladiolo las enfermedades el objetivo del Capítulo IV fue la producción *in vitro* de gladiolo libres de enfermedades. Se estandarizó el protocolo de propagación determinado por diferentes autores (Ziv *et al.*, 1970; Kumar *et al.*, 1999; Nhut *et al.*, 2004; Gupta y Prasad, 2010). Al ser un método que necesita de un estricto control aséptico, requirió de varios ensayos para establecer las condiciones óptimas de manejo. Para la multiplicación, el protocolo resultante se utiliza diferentes concentraciones hormonas para estimular la diferenciación celular del tejido a propagar (Ziv *et al.*, 1970), y finalmente se generó una recomendación de las condiciones microclimáticas para una adecuada sobrevivencia de las plántulas bajo malla sombra de 75% (2.6 MJ m⁻² d⁻¹ en la banda fotosintética, con máximas promedio de 116 W m⁻² s⁻¹) y temperatura media promedio diaria de 16.8 °C.

Para el conocimiento de los patógenos que afectan al cormo y en base a cual establecer estrategias de control en el Capítulo V se identificaron por taxonomía y análisis moleculares las diferentes especies de *Penicillium* que causan la pudrición del cormo en almacén (Frisvad y Samson, 2004; Raper y Thom, 1949). Se aplicaron los postulados de Koch: aislamiento, purificación, patogenicidad, re-aislamiento, confirmación de la misma especie inicial e identificación. Se identificaron dos especies por ambos métodos. Por taxonomía se llegó a las especies *Penicillium brevicompactum* y *P. sp.*, mientras que molecularmente se identificó a *P. brevicompactum* y *P. sp.*, según el análisis filogenético de genes Bt1 y rRNA. En un trabajo posterior se definirá la especie por análisis de genes y la colaboración de algún experto de la IMA (International Mycological Association) y otros.

En esta tesis se dan lineamientos culturales para producir flor de alta calidad y cormo para certificación. De esta forma se podría establecer un proyecto de transferencia de tecnología para incrementar el rendimiento y calidad del gladiolo en San Martín Texmelucan, Pue., la cual es una de las zonas de producción más importantes en el país. Ello involucra el control de enfermedades que son el agente principal del declive en la producción del cultivo de gladiolo en la zona (comunicación personal con productores de gladiolo), por lo que, mediante el cultivo de tejidos se puede obtener plantas libres de enfermedades, seguida por la reproducción de cormo a campo abierto con la utilización de dosis bajas en nitrógeno (40.5 N - 24 P - 171 K - 23 Mg - 37.2 Ca - 0.2 B - 8.5 S kg ha⁻¹), resultando en una estrategia de control integral de enfermedades que son la principal limitante en la producción de gladiolo de alta calidad; y finalmente determinar un adecuado control químico para *Penicillium* previo al almacenamiento del cormo que será utilizado para la siembra.

Por otro lado, (datos no presentados) los resultados de la investigación indicaron que es posible producir cormo de gladiolo de alta calidad que cumpla con los requerimientos establecidos por las normas internacionales para la certificación de semilla.

De esta manera, las estrategias de producción (que involucran observaciones no sistematizadas) incluirían sembrar densidades de 200,000 cormos ha⁻¹ del calibre 8-10 incrementa la calidad de la espiga, altura de la planta y ayuda a tener menos incidencia de enfermedades. Para la reproducción de cormo (semilla) se recomienda el uso de cormillos de calibre 2-4, ya que estos cormillos son los de mayor vigor y al sembrarlos se asegura un 98 % germinación. Por otro lado la misma dosis que se ocupa para producir flor, puede ser utilizada para producción de cormos y así se asegura la menor presencia de pudriciones en el cultivo.

En base a lo anterior se plantea la producción de flor de alta calidad y cormo certificado bajo las metodologías establecidas en la presente tesis. Cabe destacar que en México no existen programas de producción, por lo que, la información de esta tesis será de gran utilidad para los productores de gladiolo del país.

El éxito de la producción de cormo certificado estará en función del seguimiento que se le dé a las metodologías propuestas durante los procesos de producción, y otras medidas a generar del control del problema en el almacenamiento del cormo.

6.1. LITERATURA CITADA

- Frisvad, J. C., and R. A. Samson. 2004. Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*: A guide to identification of food and air-borne terverticillate *Penicillia* and their mycotoxins. pp: 1-174. In: Samson R. A., and J. C. Frisvad (eds.). *Penicillium* subgenus *Penicillium*: new taxonomic schemes and mycotoxins and other extrolites. Studies in Mycology No. 49. Utrecht, The Netherlands. 251 p.
- González-Pérez, E., M. J. Yáñez-Morales, H. M. Ortega-Escobar and J. Velázquez-Mendoza. 2009. Comparative analysis among pathogenic fungal species that cause gladiolus (*Gladiolus grandiflorus* Hort.) corm rot in Mexico. *Revista Mexicana de Fitopatología* 27: 45-52.

- Gupta, D. S., and V. S. S. Prasad. 2010. Shoot multiplication kinetics and hyperhydric status and regenerated shoots of gladiolus in agar-solidified and matrix-supported liquid cultures. *Plant Biotechnology Report* 4: 85-94.
- Kumar, A., A. L. Sood, S. M. Palni, and A. K. Gupta. 1999. *In vitro* propagation of *Gladiolus hybridus* Hort.: Synergistic effect of heat shock and sucrose on morphogenesis. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 57: 105-112.
- Nhut, D. T., J. A. Teixeira da Silva, P. X. Huyen, and K. Y. Paek. 2004. The importance of explant source on regeneration and micropropagation of *Gladiolus* by liquid shake culture. *Scientia Horticulturae* 102: 407-414.
- Raper, K. B., and C. Thom. 1949. *A Manual of the Penicillia*. The Williams and Wilkins Company. Baltimore, USA. 875 p.
- SIAP. 2011. Anuario del Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, ciclos 2009. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_wrapper&view=wrapper&Itemid=351 Consultado el 8 de diciembre de 2011.
- Ziv, M., A. H. Halevy, and R. Shillo. 1970. Organs and plantlet regeneration of *Gladiolus* through tissue culture. *Annual Botany* 34: 611-676.

CAPÍTULO VII.

CONCLUSIONES GENERALES

Las dosis de fertilización no afectaron las variables fenológicas, el rendimiento ni calidad de la flor de gladiolo. La variedad Espuma fue superior en altura de planta (127.0 cm), índice de área foliar (1.50) y acumulación de grados día a madurez comercial (1286 grados-día) respecto a la variedad Borrega roja (114.5 cm, 1.29 y 1048 grados-día, respectivamente). Lo anterior puede ser usado para considerar las fechas de siembra óptimas para el desarrollo del cultivo.

La fertilización con alto nivel de Nitrógeno (mayor de 65 kg ha⁻¹) produce una respuesta negativa en la sanidad del cultivo, con una incidencia de plantas muertas mayor a 4.8 %. En cambio, la baja concentración de N (40.5 kg ha⁻¹), combinada con aportaciones de Boro y Azufre, reduce la mortandad, sin afectar el desarrollo del cultivo ni la calidad de flor.

Con el cultivo *in vitro* se obtuvieron plántulas sanas de gladiolo variedad Borrega roja a partir de meristemos apicales cultivados en el medio Murashige y Skoog adicionado con 0.2 mg L⁻¹ de la auxina ácido naftalenacético. El mejor ambiente de aclimatación se obtuvo bajo malla sombra 75 %, en donde 95 % de las plántulas sobrevivieron después de dos meses de edad. En cambio, fue evidente que temperaturas altas (ambiente bajo cubierta plástica) o bajas (intemperie) respecto al intervalo de crecimiento del gladiolo, y niveles altos de radiación solar (los ambientes anteriores y bajo malla sombra de 50 %) causan deterioro en la capacidad fotosintética y esto repercute en la disminución de la sobrevivencia y el crecimiento de las plántulas.

Las dos especies caracterizadas de *Penicillium* mostraron ser responsables de la pudrición seca del cormo en almacén en la región de San Martín Texmelucan, Pue. *P. brevicompactum* se reporta por primera vez en México y en el mundo en cormos de gladiolo. De *P. sp.*, se definirá la especie con colaboración de algún experto de la IMA (International Mycological Association) y por análisis de genes.