

# Etiology of the rotting of gladiolus corms in storage in Cuautla, Morelos, Mexico

## Etiología de la pudrición de cormos de gladiolo en almacén en Cuautla Morelos, México

**Areli Mitshu Hernández-Moreno, Silvia Bautista-Baños, Mónica Hernández-López, Laura Leticia Barrera-Necha\***, Instituto Politécnico Nacional-Centro de Desarrollo de Productos Bióticos, Carretera Yautepec-Jojutla km. 6, Colonia San Isidro, CEPROBI 8, C.P. 62531, Morelos, México; **Renato León-Rodríguez**, Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, Tercer circuito exterior s/n Ciudad Universitaria, Coyoacán, C.P. 04510, México, D.F.; **Laura García-Barrera**, Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada, Carretera Estatal Santa Inés Tecuexcomac Tepetitla Km 1.5 Tepetitla, C.P. 90700, Tlaxcala, México. \*Autor para correspondencia: lbarrera@ipn.mx.

**Recibido:** 16 de Marzo, 2017.

**Aceptado:** 03 de Agosto, 2017.

Hernández-Moreno AM, Bautista-Baños S, Hernández-López M, Barrera-Necha LL, León-Rodríguez R, García-Barrera L. 2017. Etiology of the rotting of gladiolus corms in storage in Cuautla, Morelos, Mexico. *Revista Mexicana de Fitopatología* 35(3): 476-493.

**DOI:** 10.18781/R.MEX.FIT.1703-6

Primera publicación DOI: 31 de Agosto, 2017.

First DOI publication: August 31, 2017.

**Resumen.** Las ventajas de México como productor florícola recaen en su diversidad de climas y su cercanía al mercado norteamericano. Actualmente la exportación de flores y plantas ha quedado consolidada, tal como es el caso del gladiolo al estar libre de arancel. Los principales estados productores son Puebla, Estado de México y Morelos. La producción comercial de la flor de corte de gladiolo se inicia a través de la plantación del cormo; el cual es afectado por diversos patógenos que ocasionan

**Abstract.** The advantages of Mexico as a floricultural producer lie in its diversity of climates and its proximity to the North American market. Currently the export of flowers and plants has been consolidated, gladiolus free of tariff. The main producing states are Puebla, State of Mexico and Morelos. Commercial production of the gladiolus cut flower is initiated through the planting of the corm; Which is affected by various pathogens that cause its rot, such as *Penicillium* that attacks during storage, causing limited root development and floral abortion. This causes infections through wounds and rupture sites; Is present in 90% of apparently healthy plant material. The objectives of this work were to isolate and to identify cultural, morphological and molecularly, as well as to realize tests of pathogenicity to determine the species of *Penicillium* that cause the rot. From the variety GrandPrix® corps (10/12) with different levels of morphological deterioration and according to visual hedonistic scale of seven-point. *P. verrucosum*

su pudrición, como los del género *Penicillium* que ataca durante el almacenamiento, provocando desarrollo limitado de raíces y aborto floral. Éste provoca infecciones a través de heridas y sitios de ruptura; se encuentra presente en un 90% de material vegetal aparentemente sano. Los objetivos de este trabajo fueron aislar e identificar cultural, morfológica y molecularmente, así como realizar pruebas de patogenicidad para determinar las especies de *Penicillium* causantes de la pudrición. A partir de cormos variedad GrandPrix® (10/12) con diferentes niveles de deterioro morfológico y de acuerdo a una escala hedónica visual de siete puntos. Se aisló e identificó a *P. verrucosum* Dierckx y *P. rugulosum* Thom como causantes de la pudrición de cormos, este último reportado por primera vez como fitopatógeno en gladiolo.

**Palabras claves:** *Penicillium verrucosum*, *Penicillium rugulosum*, caracterización molecular, patógeno, caracterización cultural.

## INTRODUCCIÓN

Por la diversidad de climas y cercanía al mercado estadounidense, México cuenta con un gran potencial como productor de flores; sin embargo, su floricultura ha sido catalogada como un sector de baja calidad y bajos niveles de productividad (Claridades Agropecuarias, 2006). La FUNPROVER (2008), menciona que México se sitúa en el quinto lugar con respecto a la superficie dedicada a la floricultura a nivel mundial y al realizar la comparativa de valor comercial, México es ampliamente superado por países como Colombia y Ecuador cuya superficie de cultivo no es menor; a pesar de esto durante el periodo 2000-2011 el valor de producción de flores en México, aumentó a una tasa media anual de 9.5% y alcanzó un valor de cinco mil 646 millones de pesos (DISEMINA, 2012).

Dierckx and *P. rugulosum* Thom were isolated and identified as the cause corm rot, the latter reported for the first time as a phytopathogen in gladiolus.

**Key words:** *Penicillium verrucosum*, *Penicillium rugulosum*, molecular characterization, pathogen, cultural characterization.

## INTRODUCTION

Because of its diversity of climates and its proximity to the North American market, Mexico has a great potential as a producer of flowers; however, its flower production has been catalogued as a sector with low quality and productivity levels (Claridades Agropecuarias, 2006). FUNPROVER (2008) mentions that Mexico is fifth worldwide in terms of the surface dedicated to flower production, and when comparing commercial values, Mexico is widely surpassed by countries such as Colombia and Ecuador, the surfaces of which are not small. Regardless of this, in the period between 2000 and 2011, the value of Mexican flower production increased by an annual average of 9.5%, and reached a value of over 5.6 billion pesos (DISEMINA, 2012).

The main flower-producing states are the State of Mexico, Puebla, and Morelos, which provide 48, 22, and 12% of the country's production, respectively (CESAVEM, 2011). The economically important crops in the country are chrysanthemums, roses, carnations, and gladiolus. In terms of planted areas and demand, gladiolus is the main flower, since it adapts easily to technological (limited phytosanitary control, inadequate postharvest management) and weather limitations (extreme temperatures, high luminosity). In the state of Morelos, the crop is concentrated in the municipal areas of Cuautla, Yautepec, and Ayala.

Los principales estados productores de flor de corte son: el Estado de México, Puebla y Morelos, aportando el 48, 22 y 12% de la producción respectivamente (CESAVEM, 2011). Los cultivos de importancia económica a nivel nacional son: crisantemo, rosa, clavel y gladiola. En términos de área cultivada y demanda, la gladiola es la flor primordial, pues se adapta con facilidad a las limitantes tecnológicas (limitado control fitosanitario, mal manejo postcosecha) y climáticas (temperaturas extremas, alta luminosidad). En el estado de Morelos el cultivo se concentra en los municipios de Cuautla, Yautepec y Ayala.

La calidad de la gladiola, como flor de corte, depende en gran medida del cormo que es la estructura de reproducción vegetativa; los países especializados en su distribución son: Holanda, Francia, Chile y Estados Unidos (Claridades Agropecuarias, 2006). Los productores cuando requieren renovar el cultivar, acuden a casas comercializadoras o con productores de la misma zona para la adquisición del nuevo material. Sin embargo, la sanidad del cormo no es garantizada; enfrentando así una de las principales limitantes conocida como “pudrición del cormo” que es asociada a los hongos del género *Penicillium* (Pataky, 1983; González-Pérez *et al.*, 2009; IFBC, 2012).

En almacenamiento, el agente asociado a la pudrición del cormo en gladiola es *Penicillium gladioli*, descrito por McCulloch y Thom (1928); actualmente, existen reportes de otras especies de *Penicillium* que afectan los cormos por las que se estiman pérdidas del 50% en almacenamiento y del 15% en campo (Singh, 1970; González-Pérez *et al.*, 2009; González-Pérez, 2011). El presente estudio tuvo como objetivos: a) aislar y caracterizar cultural, morfológica y molecularmente las especies de *Penicillium* causantes de la pudrición de cormos de gladiolo en almacenamiento y b) determinar la patogenicidad de los aislamientos de *Penicillium*.

The quality of the gladiolus, as a cut flower, depends largely on the corm, which is the plant reproductive structure. The countries specialized in its distribution are the Netherlands, France, Chile, and the United States (Claridades Agropecuarias, 2006). When farmers want to renew the cultivar they go to marketing venues or to farmers of the same area to acquire the new material. However, the health of the corm is not guaranteed, presenting one of the main limitations, known as “corm rotting,” which is related to fungi of the genus *Penicillium* (Pataky, 1983; González-Pérez *et al.*, 2009; IFBC, 2012).

In storage, the agent related to corm rotting in the gladiolus is *Penicillium gladioli*, described by McCulloch and Thom (1928). Currently, there are reports of other species of *Penicillium* that affect the corms, causing losses calculated in 50% in storage, and 15% on the field (Singh, 1970; González-Pérez *et al.*, 2009; González-Pérez, 2011). The aims of this study were a) to isolate and characterize culturally, morphologically, and molecularly the species of *Penicillium* that cause the rotting of gladiolus corms in storage, and b) to determine the pathogenicity of the isolations of *Penicillium*.

## MATERIALS AND METHODS

### Isolations

In August 2012, isolations were obtained from pathogenic fungi from GrandPrix commercial variety gladiolus corms, with a circumference of 10/12 cm (Grupo NederMex, S.A. de C.V. del Estado de México) that presented severe damage caused by *Penicillium*. In a laminar flow cabinet, the characteristic dust of this type of rotting was placed in Petri dishes with potato dextrose agar (PDA) medium and incubated for 10 d at 27 °C

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Aislamientos

En agosto del 2012 se obtuvieron los aislamientos de los hongos fitopatógenos de cormos de gladiola comerciales variedad GrandPrix de circunferencia 10/12 cm (Grupo Nedermax, S.A. de C.V. del Estado de México) que presentaban daño severo ocasionado por *Penicillium*. En cámara de flujo laminar, el polvo característico de este tipo de pudrición se colocó en cajas de Petri con medio papa dextrosa agar (PDA) e incubó durante 10 d a 27 °C en oscuridad total. Las diversas colonias se aislaron, y purificaron hasta obtener cultivos monospóricos, en medio agar-agua por el método de dilución decimal seriada (Villanueva Arce *et al.*, 2005), se incubó en condiciones ambientales de laboratorio por 36 h. Algunas esporas germinadas se transfirieron a cajas de Petri con PDA. La conservación de cepas fúngicas se realizó con la técnica de silica-gel (Chan y Elander, 1986).

### Pruebas de patogenicidad

Se utilizaron cuatro cormos sanos por aislamiento, los cuales no presentaron daños visibles variedad GrandPrix 10/12, y cuatro más sin inocular como tratamiento testigo. Los cormos fueron despojados de la túnica, lavados con solución jabonosa y enjuagados con agua corriente. En campana de flujo laminar, los cormos se desinfestaron con solución de hipoclorito de sodio al 1.5% por 2 min, se enjuagaron con agua destilada estéril en tres ocasiones y colocaron sobre papel secante estéril contenido en charolas de poliestireno nuevas y desinfectadas. Una vez eliminada el agua superficial de los cormos, cada charola se dispuso en bolsas herméticas con cierre dentado. Los cormos se inocularon con cultivos de *Penicillium* de 10 d e

in complete darkness. The diverse cultures were isolated and purified until monosporic cultures were obtained in water-agar medium using the decimal serial dilution method (Villanueva Arce *et al.*, 2005), and incubated under environment conditions for 36 h. Some germinated spores were transferred to Petri dish with PDA. The fungal strains were conserved using the silica-gel technique (Chan and Elander, 1986).

### Pathogenicity tests

Four healthy corms were used for every isolation, which presented no visible damages, of the variety GrandPrix 10/12, and four more without inoculating as a control treatment. The tunics were removed from the corms, which were washed with a soapy solution, and rinsed with tap water. In a laminar flow bell, the corms were disinfected with a sodium hypochlorite solution at 1.5% for 2 min, rinsed three times and placed on sterile drying paper contained in new and disinfected polystyrene trays. Once the surface water was discarded, each tray was placed in airtight bags with jagged zippers. The corms were inoculated with 10 d old *Penicillium* cultures and incubated for 8 d at 8 °C plus 22 d at room temperature. The inoculation methods used were two: by the infiltration of a suspension of spores following the method proposed by González-Pérez (2011), which consists in adjusting the suspension to a concentration of  $1 \times 10^5$  spores  $\text{mL}^{-1}$  plus a Tween 20 aliquot, adjusting to a concentration of 0.1%. Later, 2 mL were infiltrated, one in the apical bud and another in the basal disc; by inoculation with mycelia, the latter was placed in an incision made with a hole puncher, 3 mm in diameter near the apical bud. The evaluation was based on a visual appreciation using a seven-point scale (Table 1). This evaluation was complemented by performing

incubaron 8 d a 8 °C más 22 d a temperatura ambiente. Los métodos de inoculación utilizados fueron dos: por infiltración de suspensión de esporas siguiendo la metodología propuesta por González-Pérez (2011); que consiste en ajustar la suspensión a una concentración de  $1 \times 10^5$  esporas  $\text{mL}^{-1}$  más una alícuota de Tween 20 ajustando a una concentración del 0.1%; se infiltraron 2 mL, uno en el brote apical y el otro en el disco basal; por inoculación con micelio, éste se colocó en una herida hecha con un sacabocados de 3 mm de diámetro cerca del brote apical. La evaluación se basó en una apreciación visual usando una escala de siete puntos (Cuadro 1). Esta evaluación se complementó realizando un

a vertical cut in the center of each corm. The total exposed surface of each half was measured in  $\text{mm}^2$  along with the damaged surface with the aid of images and the program ImageJ (Rasband, 2006). Values were reported as a percentage of tissue affected in respect to the total area.

### Cultural and morphological characterization

In malt extract agar (MEA) and czapek agar (Cz') we observed color, texture, exudates, and maximum culture growth from a saturated spore solution from the monosporic cultures as recommended by Frisvad and Samson (2004).

**Cuadro 1. Escala de grado visual para el daño de *Penicillium* en cormos de gladiolo.**  
**Table 1. Visual scale for the damage of *Penicillium* on gladiolus corms.**

|                                                                                     |                                                                                         |                                                                                                                      |                                                                                                                |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 0                                                                                   | 1                                                                                       | 2                                                                                                                    | 3                                                                                                              |
|  |      |                                  |                           |
| Sin daño                                                                            | Daño en menos del 60% en raíces.                                                        | Daño entre el 61-100% en raíces más 30% de infección en zona centro basal y manchas de color marrón en la periferia. | Daño en 100% de raíces, 31-80% de infección en la zona centro de la parte basal. Posible daño en la periferia. |
| 4                                                                                   | 5                                                                                       | 6                                                                                                                    |                                                                                                                |
|  |      |                                 |                                                                                                                |
| Daño en el 100 % de la zona basal. Puntos color marrón bien delimitados.            | Daño en el 100 % de la zona basal. Los puntos color marrón superan los 3 mm de diámetro | Zonas blandas                                                                                                        |                                                                                                                |

corte vertical en el centro de cada cormo; de cada mitad se midió la superficie expuesta total en mm<sup>2</sup> y la superficie dañada con la ayuda de imágenes y el programa ImageJ (Rasband, 2006); los valores se reportaron como porcentaje de tejido afectado con respecto al área total.

### Caracterización cultural y morfológica

En extracto de malta agar (MEA) y agar czapek (Cz') se apreció coloración, textura, exudados y máximo crecimiento de las colonias a partir de una solución de esporas saturada proveniente de los cultivos monospóricos como lo recomiendan Frisvad y Samson (2004). Para las mediciones morfométricas se establecieron microcámaras de crecimiento (Moreno *et al.*, 2005) a partir de las cuales se prepararon montajes para observar a detalle el micelio, conidióforos y conidios bajo microscopio compuesto (Olympus CX31, objetivo 40X). Las preparaciones se realizaron con lactofenol, midiendo en promedio 50 cuerpos fructíferos y 100 esporas por aislamiento. Se consideró longitud y ancho de estipe, métula y fiálide, y el diámetro del conidio; también se determinó forma, textura y patrón de ramificación del conidióforo. Para evaluar la tasa de crecimiento (TC), como característica fisiológica y diferencial entre especies, se utilizaron discos de 5 mm provenientes de los cultivos monospóricos de *Penicillium* para colocarlos en cajas de Petri de 50 mm de diámetro con PDA e incubó a temperatura ambiente hasta que el micelio alcanzó su máxima área de crecimiento. El crecimiento micelial consideró la evaluación de la máxima área diaria utilizando imágenes y el programa ImageJ (Rasband, 2006), finalmente se utilizó la siguiente ecuación para determinar la TC:

$$TC = \frac{\text{Crecimiento final} - \text{Crecimiento inicial}}{\text{Tiempo de incubación}}$$

For morphometric measurements, growth microchambers were set up (Moreno *et al.*, 2005), and from there, assemblies were prepared to observe the mycelium, conidophora, and conidia in retail under the compound microscope (Olympus CX31, lens 40X). The preparations were made with lactophenol, measuring an average of 50 fruit bodies and 100 spores per isolation. We considered the length and width of the stipe, metula, and phialide, as well as the diameter of the conidium; we also determined the shape, texture and ramification pattern of the conidiophore. To evaluate the growth rate (TC), as a physiological and differential characteristic between species, 5 mm discs from monosporic *Penicillium* cultures were used to place them in Petri dishes, 50 mm in diameter, with PDA, and incubated at room temperature until the mycelium reached its maximum growth area. Mycelial growth considered the evaluation of the maximum daily area using images and the program ImageJ (Rasband, 2006); finally, the following equation was used to determine the TC:

$$TC = \frac{\text{Final growth} - \text{Initial growth}}{\text{Time of incubation}}$$

The cultural and morphological characterization of each isolation was compared with the referent species obtained from molecular characterization using the taxonomic codes described by Frisvad and Samson (2004) and Pitt and Hocking (2009).

### Extraction and purification of genomic DNA

Based on the protocol proposed by Doyle and Doyle (1990) with some modifications, in order to obtain the fungal mycelium PDA discs, 5 mm in diameter, from monosporic discs, were used to plant in 50 mL of potato dextrose broth

La caracterización cultural y morfológica de cada aislado se comparó con la especie referencia obtenida de la caracterización molecular utilizando las claves taxonómicas descritas por Frisvad y Samson (2004) y Pitt y Hocking (2009).

### Extracción y purificación del ADN genómico

Con base en el protocolo propuesto por Doyle y Doyle (1990) con algunas modificaciones; para obtener el micelio del hongo se usaron discos de PDA de 5 mm de diámetro, provenientes de cultivos monospóricos, para sembrar en 50 mL de medio caldo papa dextrosa el cual se incubó por 4 d a 27 °C. El micelio recuperado con papel filtro estéril, se maceró y trituró con nitrógeno líquido en un mortero de porcelana. En tubos Eppendorf, se agregó 0.2 g de micelio pulverizado más 600 mL de solución amortiguadora de lisis, se agitó en vortex e incubó 30 min a 65 °C en un termomezclador (Thermomixer Compact-Eppendorf®). A continuación, se adicionaron 250 mL de acetato de potasio 5 M y se agitó hasta homogeneizar en vortex y centrifugo; esta al igual que las subsecuentes se realizaron durante 5 min, 13000 rpm, 4 °C. El sobrenadante se recuperó y colocó en un tubo nuevo más un volumen de fenol:cloroformo: isoamilico (25:24:1 v/v/v), se mezcló y centrifugó. Recuperado nuevamente el sobrenadante en un tubo nuevo, se agregó 1 mL de RNAsa e incubó por 30 min a 37 °C. Pasados los 30 min, se adicionó un volumen de Cloroformo:Isoamilico (24:1 v/v), se mezcló y centrifugó. Se recuperó el sobrenadante en un tubo nuevo, se adicionaron 2/3 de volumen de isopropanol frío, dejando reposar 2 h a -20 °C; posteriormente se centrifugo y eliminó el sobrenadante. La pastilla se lavó con 1000 mL de etanol 70%, y se dejó secar hasta que se evaporó totalmente el alcohol. Las muestras se resuspendieron en 50 mL de agua destilada estéril y almacenaron a -20 °C. La

medium, which was incubated for 4 d at 27 °C. The mycelium recovered with sterile filter paper was macerated and crushed with liquid nitrogen in a porcelain mortar. In Eppendorf tubes, 0.2 g of pulverized mycelia were added along with 600 mL of lysis buffer solution, it was stirred in a vortex and incubated for 30 min at 65 °C in a thermomixer (Thermomixer Compact-Eppendorf®). Next, 250 mL of potassium acetate 5 M were added and stirred until homogenized in a vortex and a centrifuge. This one, as all the following, were carried out for 5 min, 13000 rpm, 4 °C. The supernatant was recovered and placed in a new tube with a volume of phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1 v/v/v), then mixed and centrifuged. Once the supernatant was separated again and placed in a new tube, 1 mL of RNase was added and incubated for 30 min at 37 °C. After the 30 min, one volume of chloroform: isoamyl alcohol (24:1 v/v) was added, mixed and centrifuged. Once again, the supernatant was taken and placed in another tube, 2/3 volume of cold isopropanol were added, then left to rest for 2 h at -20 °C. It was then centrifuged and the supernatant was discarded. The pellet was washed with 1000 mL of ethanol at 70%, and left to dry until the alcohol evaporated completely. The samples were resuspended in 50 mL of sterile distilled water and stored at -20 °C. The purity of the DNA obtained was verified by electrophoresis in an agarose gel at 1% stained with 1 mL of GelRed 10,000x (0.1 mg mL<sup>-1</sup>) and observed in a molecular photodocumenter (Imager®).

### DNA Quantification

The DNA concentration was determined in the Nano Drop® (ND-1000), to later adjust to 50 ng mL<sup>-1</sup>, as established by the method for quantification and sequencing.

pureza del ADN obtenido, se verificó por electroforesis en un gel de agarosa al 1 % teñido con 1 mL de GelRed 10,000x (0.1 mg mL<sup>-1</sup>) y se observó en un fotodocumentador molecular (Imager®).

### Cuantificación del ADN

Se determinó la concentración del ADN en el Nano Drop® (ND-1000), para posteriormente ajustar a 50 ng mL<sup>-1</sup>, como lo establece el método para la cuantificación y secuenciación.

### Amplificación por PCR

Los iniciadores utilizados para amplificar la región ITS del ADN ribosomal fueron ITS1 con la secuencia 5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG3' y el ITS4 5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3' (White *et al.*, 1990). La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) se realizó con un volumen final de la mezcla de 50 µL y se corrió en un termociclador (Bio Rad DNA engine®). La mezcla de reacción se compuso de: 5.0 µL de solución amortiguadora para la PCR, 3.0 µL de MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 2.0 mL de la mezcla de dNTPs (10 mM), 1 mL de cada uno de los ITS's (50 pmol µL<sup>-1</sup>) y 0.5 µL de Taq-DNA polimerasa (Invitrogen® 94 kDa). El programa para la PCR (por sus siglas en inglés) consistió de 30 ciclos: desnaturalización inicial 95 °C por 5 min; desnaturalización 95 °C por 1 min; alineación a 57 °C por 40 s; extensión 72 °C por 1 min. Los fragmentos amplificados se verificaron por electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con 1 µL de GelRed 10, 000x (0.1 µg mL<sup>-1</sup>) y comparados los pesos moleculares con el marcador TriDye 1kb DNA. Los productos de la PCR amplificados se purificaron mediante el kit GeneJet™ (Fermentas, USA).

### Amplification by PCR

The primers used to amplify the ITS region of the ribosomal DNA were ITS1, with the sequence 5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG3', and ITS4 5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3' (White *et al.*, 1990). The Polymerase Chain Reaction (PCR) was carried out with a final volume of the mixture of 50 µL and run in a thermocycler (Bio Rad DNA engine®). The reaction mixture was composed of: 5.0 µL of buffer solution for the PCR, 3.0 µL of MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 2.0 mL of the mixture of dNTPs (10 mM), 1 mL of each one of the ITS's (50 pmol µL<sup>-1</sup>) and 0.5 µL of Taq-DNA polymerase (Invitrogen® 94 kDa). The program for the PCR consisted of 30 cycles: initial denaturalization 95 °C for 5 min; denaturalization 95 °C for 1 min; alignment at 57 °C for 40 s; extension 72 °C for 1 min. The amplified fragments were verified by gel electrophoresis in agarose gel at 1% stained with 1 µL of GelRed 10, 000x (0.1 µg mL<sup>-1</sup>) and compared with the molecular weights with the marker TriDye 1kb DNA. The products of the amplified PCR were purified with the kit GeneJet™ (Fermentas, USA).

### Sequencing

The DNA was quantified and sequenced in both ways to avoid assembly and comparison errors in the Institute of Biotechnology of the National Autonomous University of Mexico (Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México), Cuernavaca, Morelos. The sequences were aligned and compared with the National Center for Biotechnology Information (Centro Nacional para la Información de Biotecnológica) using BLAST.

## Secuenciación

El ADN se cuantificó y secuenció en ambos sentidos para evitar errores de ensamble y comparación; en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos. Las secuencias se alinearon y compararon con la base de datos del Centro Nacional para la Información de Biotecnológica mediante BLAST.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Aislamientos

De los aislados que se obtuvieron de los cormos con síntomas de pudrición en almacén, se seleccionaron cuatro colonias representativas de *Penicillium* de acuerdo a su comportamiento cultural en PDA, las colonias se etiquetaron como 1P, 2P, 3P y 4P.

### Pruebas de patogenicidad

La evaluación del porcentaje de superficie infectada y daño visual indicó que los cuatro aislados de *Penicillium*, inoculados en cormos de gladiolo variedad GrandPrix 10/12, fueron patogénicos con diferente grado de virulencia los aislados 1P y 4P fueron los más agresivos (Cuadro 2). Se observaron diferencias entre la inoculación por suspensión de esporas o micelio. El daño visual fue mayor en la inoculación con micelio. La evaluación de daño externo reportó necrosis de raíces de anclaje, manchas y hundimientos de color marrón, con presencia de micelio; aunque la presencia de micelio en raíces fue mayor. En general el daño interno mostró decoloración del tejido. En ambos casos, el hongo se reaisló y verificaron las características y el comportamiento cultural para cumplir con los postulados

## RESULTS AND DISCUSSION

### Isolations

Out of the isolations obtained from the corms with symptoms of rotting in storage, four cultures, representative of *Penicillium*, were selected according to their cultural behavior in PDA; the cultures were labeled as 1P, 2P, 3P, and 4P.

### Pathogenicity tests

The evaluation of the percentage of the surface infected and of the visual damage indicated that the four *Penicillium* isolations, inoculated in gladiolus corms of the variety GrandPrix 10/12, were pathogenic with different degrees of virulence, and isolations 1P and 4P were the most aggressive (Table 2). Differences were noticed between inoculation of spores and of mycelia. Visual damage was greater in the inoculation with mycelia. The evaluation of external damage reported the necrosis of anchor roots, spots and brown-colored collapses, with the presence of mycelia, although the presence of mycelia was greater in roots. In general, internal damage presented tissue discoloring. In both cases, the fungus was reisolated and its characteristics and cultural behavior were verified to comply with the postulated by Koch. Despite the aggressiveness of *Penicillium* as a phytopathogen being considered low, the pathogenicity tests carried out in this study show that the infection level increases depending on the places with lesions and the natural rupture of the corm. González-Pérez *et al.* (2009) reported an isolation of *Penicillium* affecting the production area of Puebla with a aggressiveness that manifests itself in only 2.7% of the exposed area of the corms. The behavior of the isolations found in this investigation resemble descriptions by Overy *et al.* (2005), who point out that in their pathogenicity

**Cuadro 2. Patogenicidad de cuatro aislados de *Penicillium* sp. en cormos de gladiola var. GrandPrix® 10/12.**  
**Table 2. Pathogenicity of four *Penicillium* sp. isolations in gladiolus corms, var. GrandPrix® 10/12.**

| Aislamiento | Suspensión de esporas     |             | Micelio                |             |
|-------------|---------------------------|-------------|------------------------|-------------|
|             | Superficie infectada %    | Daño visual | Superficie infectada % | Daño visual |
| 1P          | 37.3 ± 6.4 a <sup>x</sup> | 3.0         | 18.0 ± 10.4 bc         | 3.5         |
| 2P          | 30.9 ± 12.6 ab            | 2.2         | 31.8 ± 11.0 ac         | 2.7         |
| 3P          | 23.5 ± 24.3 ab            | 2.5         | 20.5 ± 4.3 bc          | 3.0         |
| 4P          | 28.0 ± 14.4 ab            | 2.7         | 41.5 ± 22.3 a          | 3.7         |
| Testigo     | 9.4 ± 6.2 b               | 0.7         | 29.5 ± 6.5b            | 2.7         |

Valores con la misma letra representan valores estadísticamente iguales. Prueba de análisis de varianza de una vía con una F = 4.206, F = 8.55, gl (4, 35) y  $P \leq 0.007$  determinada con comparación de medias por Tukey ( $P \geq 0.05$ ). El valor mostrado en daño visual corresponde a la media / Values with the same letter represent statistically equal values. One-way test of analysis of variance with one F = 4.206, F = 8.55, gl (4, 35) y  $P \leq 0.007$  determined with a Tukey comparison of averages ( $P \geq 0.05$ ). The value shown for visual damage corresponds to the average.

de Koch. Aún cuando la agresividad de *Penicillium* como fitopatógeno es considerada baja; las pruebas de patogenicidad realizadas en este trabajo, muestran que el nivel de infección incrementa dependiendo de los sitios lesionados y ruptura natural del cormo. González-Pérez *et al.* (2009), reportaron un aislado de *Penicillium*, afectando la zona productora de Puebla cuya agresividad se manifiesta sólo en el 2.7% del área expuesta de los cormos. El comportamiento de los aislados encontrados en este trabajo se asemejan a lo descrito por Overy *et al.* (2005), quienes señalan que en sus pruebas de patogenicidad, los cormos presentaron moteado, decoloración externa, necrosis de raíces y en su caso, daño interno.

### Caracterización cultural y morfológica de los aislamientos

El comportamiento cultural y las características morfológicas de los aislados de *Penicillium* se encuentran resumidas en los Cuadros 3 y 4; se observa que, las características descritas coinciden en la mayoría de los puntos referidos por la literatura para la especie reportada en la identificación molecular (Crous *et al.* 2004; Pitt y Hocking, 2009;

test, corms presented spots, external discoloring, root necrosis, and in their case, internal damage.

### Cultural and morphological characterization of isolations

The cultural behavior and the morphological characteristics of the *Penicillium* isolations are summarized in Tables 3 and 4. We can observe that the characteristics described coincide with most of the points referred to by the bibliography for the species reported in the molecular identification (Crous *et al.* 2004; Pitt and Hocking, 2009; Frisvad and Samson, 2004). The morphological characteristics of the conidiophore and the behavior of the cultures in specific media have been acknowledged as the main taxonomic characteristics (Comerio, 2000). Figures 1, 2, 3, and 4 show the cultural behavior in media Cz', MEA, and PDA. Isolations 1P, 2P, and 4P belong to the same species *P. verrucosum*, although the cultural characteristics differ between isolation 1P and isolations 2P y 4P, probably considering the presence of two varieties, since they presented lower growth rates (.12 to .55 cm<sup>2</sup> d<sup>-1</sup>) and this physiological characteristic helps separate

**Cuadro 3. Comparación del comportamiento cultural y micromorfológico de aislados de *Penicillium* en cormos de gladiolo var. GrandPrix® en su tiempo de almacén con la especie de *P. verrucosum* (KC009832).**  
**Table 3. Comparison of the cultural and micromorphologic behavior of *Penicillium* isolations in gladiolus var. GrandPrix® corms in their time of storage with the species *P. verrucosum* (KC009832).**

|                                    |     | Cepa 1P                                    | Cepa 2P                                            | Cepa 4P                                                     | <i>P. verrucosum</i> <sup>x</sup>                                                                  |
|------------------------------------|-----|--------------------------------------------|----------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| TC cm <sup>2</sup> d <sup>-1</sup> | PDA | 2.159                                      | 0.555                                              | 0.120                                                       | Nr                                                                                                 |
| Diámetro (mm)                      | Cz  | 32                                         | 25                                                 | 27                                                          | 15 – 25                                                                                            |
|                                    | MEA | 36                                         | 27                                                 | 25                                                          | 12 – 20                                                                                            |
| Textura                            | Cz  | Plano Aterciopelada                        | Aterciopelada ligeramente algodonoso y granular    | Surcada y aterciopelada                                     | De crecimiento limitado o esparciéndose ampliamente, textura aterciopelada a algodonosa o granular |
|                                    | MEA | Aterciopelada algodonoso                   | Aterciopelado, centro con micelio aéreo y surcado  | Sin y con centro abultado, surcado y granular a las orillas | Surcado, aterciopelado con centro algodonoso                                                       |
| Coloración                         | Cz  | Verde grisáceo con margen blanco al centro | Verde opaco con micelio blanco                     | Verde con margen blanco estriado                            | Amarillo-verde, verde oscuro a gris, verde-azul, blanco u ocre                                     |
|                                    | MEA | Verde opaco y blanco                       | Amarillo, verde y blanco                           | Amarillo delimitado por margen blanco                       | Micelio blanco                                                                                     |
| Exudado                            | Cz  | np                                         | Np                                                 | Claro                                                       | Claro                                                                                              |
|                                    | MEA | np                                         | Np                                                 | Naranja                                                     | Ocasional, de color claro                                                                          |
| Reverso                            | Cz  | Centro marrón a pálido en las orillas      | Beige, crema, centro oscuro                        | Marrón                                                      | Incoloro u amarillo, rosa, naranja o marrón                                                        |
|                                    | MEA | Amarillo al centro, crema a las orillas    | Amarillo claro                                     | Amarillo                                                    | Marrón a café, amarillo u olivo                                                                    |
| Forma del conidióforo              | PDA | Monoverticillate y Terverticillate         | Monoverticillate, Biverticillate y Terverticillate | Terverticillate                                             | Biverticillate y Terverticillate                                                                   |
| Estipe (µm)                        | PDA | 79.475±65.232 x 3.195                      | 70.395 x 2.958                                     | 77.738 x 2.887                                              | 200 – 400 x 3.0 – 4.0                                                                              |
| Textura de Estipe                  | PDA | Rugosa                                     | Rugosa                                             | Rugosa                                                      | Rugosa                                                                                             |
| Métula (µm)                        | PDA | 13.679 x 2.746                             | 10.762 x 2.664                                     | 10.935 x 2.656                                              | 8 – 13 x 3 – 4                                                                                     |
| Forma de Métula                    | PDA | Cilíndrica                                 | Cilíndrica                                         | Cilíndrica                                                  | Cilíndrica                                                                                         |
| Fialide (µm)                       | PDA | 9.254 x 2.3                                | 8.115 x 2.192                                      | 8.951 x 2.466                                               | 7.0 – 9.0 x 2.0 – 2.5                                                                              |
| Forma de la Fialide                | PDA | Ampuliforme, con colula corta              | Ampuliformes                                       | Ampuliforme o lectiforme con colula corta                   | Ampuiforme                                                                                         |
| Conidia(µm)                        | PDA | 2 – 3                                      | 2 - 2.8                                            | 2 – 3                                                       | 3.0 – 4.0                                                                                          |
| Forma de conidias                  | PDA | Esféricas, emergiendo en cadenas ordenadas | Esféricas, emergiendo en cadenas ordenadas         | Esféricas emergiendo en cadenas ordenadas                   | Esféricas o elipsoidales, en cadenas ordenadas                                                     |

Características en medio agar Czapek (Cz) y extracto de malta agar (MEA) a 25 °C 7 días en oscuridad. Presencia de exudados a 25 °C 14 días en oscuridad en medio Cz y MEA; Np: no presente; Nr: no reportado. Montajes en papa dextrosa agar (PDA), observaciones a 3 – 5 días en microscopio compuesto Olympus CX31, objetivo 40X. \* Crous *et al.* 2004; Pitt y Hocking, 2009; Frisvad y Samson, 2004 / Characteristics in Czapek (Cz) agar medium and malt extract agar (MEA) at 25 °C 7 days in darkness. Presence of exudates at 25 °C 14 days in darknes in Cz medium and MEA; Np: not present; Nr: not reported. Mounted on potato dextrose agar (PDA), observations at 3 – 5 days under Olympus CX31 compound microscope, lens 40X. \* Crous *et al.* 2004; Pitt and Hocking, 2009; Frisvad and Samson, 2004.

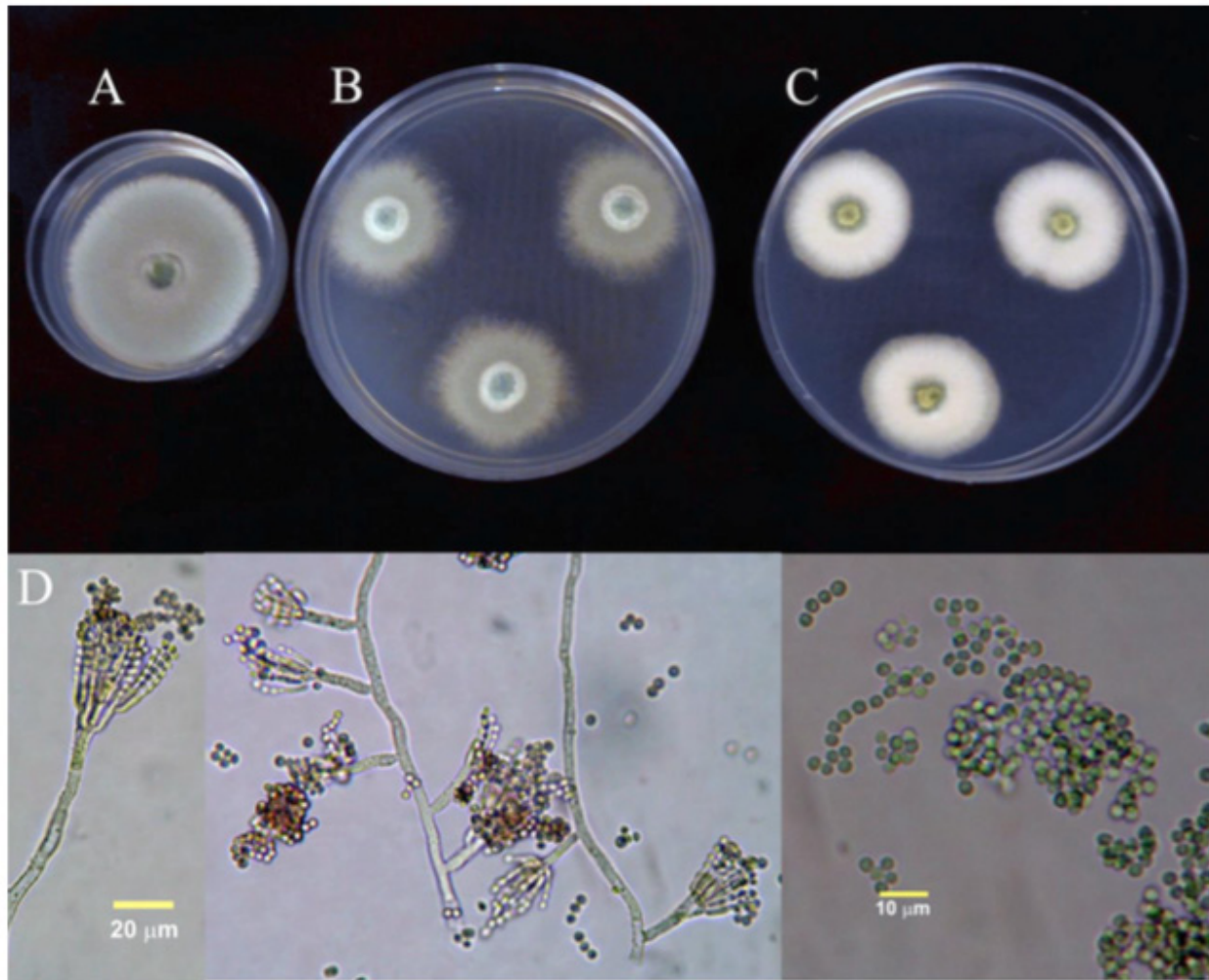
**Cuadro 4. Comparación del comportamiento cultural y micromorfológico de aislados de *Penicillium* en cormos de gladiolo var. GrandPrix® en su tiempo de almacén con la especie de *P. rugulosum* (GU566230.1).**  
**Table 4. Comparison of the cultural and micromorphologic behavior of *Penicillium* isolations in gladiolus var. GrandPrix® corms in their time of storage with the species *P. rugulosum* (GU566230.1).**

|                                    |     | Cepa 3P                                  | <i>P. rugulosum</i> <sup>x</sup>                                  |
|------------------------------------|-----|------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|
| TC cm <sup>2</sup> d <sup>-1</sup> | PDA | 0.794                                    | Nr                                                                |
| Diámetro (mm)                      | Cz  | 11 – 60                                  | 4 – 8 – 12                                                        |
|                                    | MEA | 6 – 60                                   | 10 – 20                                                           |
| Textura                            | Cz  | Aterciopelada, ligeramente algodonosa    | Aterciopelada                                                     |
|                                    | MEA | Aterciopelada, plana                     | Aterciopelada                                                     |
| Coloración                         | Cz  | Amarillo, beige, blanco                  | Usualmente blanco, se presenta también amarillo o rojo incrustado |
|                                    | MEA | Amarillo, verde, blanco                  | Amarillo incrustado                                               |
| Exudado                            | Cz  | Np                                       | Ausente o limitado                                                |
|                                    | MEA | Claro                                    | Ausente o limitado                                                |
| Reverso                            | Cz  | Np                                       | Pálido, verde-olivo opaco o café                                  |
|                                    | MEA | Amarillo pálido                          | Pálido, verde-olivo, opaco o café                                 |
| Forma del conidióforo              | PDA | Biverticillate, terverticillate          | Biverticillate principalmente                                     |
| Estipe (µm)                        | PDA | 78.775 x 2.506                           | 70 – 100                                                          |
| Textura de Estipe                  | PDA | Lisas o finamente rugosas                | Paredes lisas                                                     |
| Métula (µm)                        | PDA | 9.168 x 2.003                            | 10 – 15                                                           |
| Forma de Métula                    | PDA | cilíndrica                               |                                                                   |
| Fialide (µm)                       | PDA | 11.011 x 1.989                           | 8 – 11                                                            |
| Forma de la Fialide                | PDA | Largas y ampuliformes                    | Ampuliformes o cilíndricas                                        |
| Conidia (µm)                       | PDA | 1.6 – 2.6                                | 2.5- 3.0                                                          |
| Forma de conidias                  | PDA | Elipsoidal (limón) emergiendo en cadenas | Elipsoidal de pared suave o rugosa                                |

Características en medio agar Czapek (Cz) y extracto de malta agar (MEA) a 25 °C 7 días en oscuridad. Presencia de exudados a 25 °C 14 días en oscuridad en medio Cz y MEA; Np: no presente; Nr: no reportado. Montajes en papa dextrosa agar (PDA), observaciones a 3 – 5 días en microscopio compuesto Olympus CX31, objetivo 40X. \*Crous *et al.* 2004; Pitt y Hocking, 2009; y Frisvad y Samson, 2004 / Characteristics in Czapek (Cz) agar medium and malt extract agar (MEA) at 25 °C 7 days in darkness. Presence of exudates at 25 °C 14 days in darkness in Cz medium and MEA; Np: not present; Nr: not reported. Mounted on potato dextrose agar (PDA), observations at 3 – 5 days under Olympus CX31 compound microscope, lens 40X. \*Crous *et al.* 2004; Pitt and Hocking, 2009; Frisvad and Samson, 2004.

Frisvad y Samson, 2004). Las características morfológicas del conidióforo y el comportamiento de las colonias en medios específicos han sido reconocidas como carácter taxonómico primario (Comerio, 2000). En las Figuras 1, 2, 3 y 4 se observa el comportamiento cultural en medio Cz', MEA y PDA. Los aislados 1P, 2P y 4P, pertenecen a la misma especie *P. verrucosum*; sin embargo, las

individuals of the same species. On the other hand, the ITS region and the subunit 5.8s of the rDNA used in this type of analyses are very preserved intraspecifically, and they are therefore not the most adequate to carry out studies of subspecific groups. Regarding isolation 3P, it belongs to the species *P. rugulosum*. The difference lies in the maximum growth of the culture. The bibliography

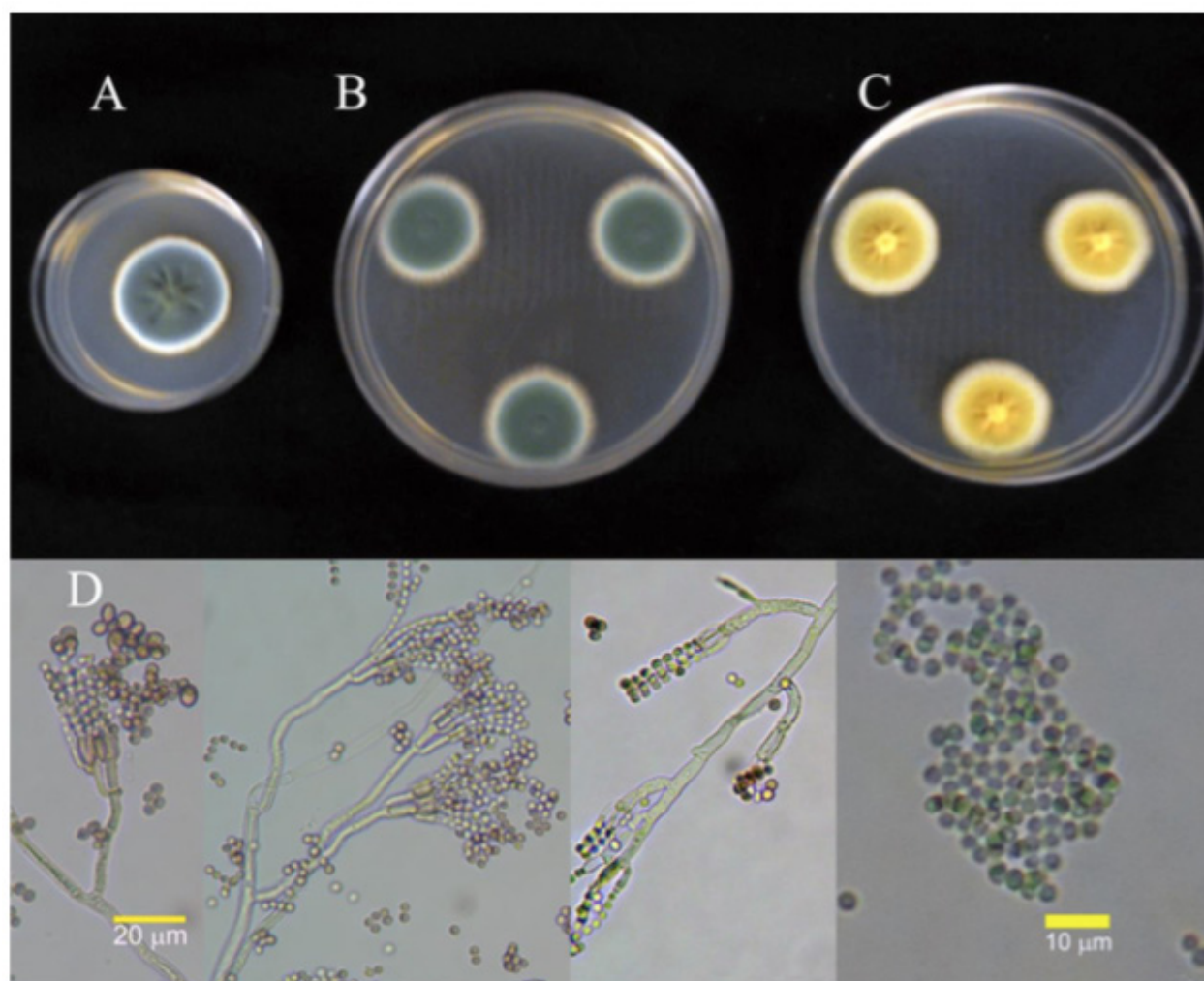


**Figura 1.** Colonias del aislado 1P identificado como *P. verrucosum* de 7 días, 25 °C en (A) PDA, (B) Cz y (C) MEA. (D) Conidióforos y conidias.

**Figure 1.** Cultures of isolate 1P identified as 7-day old *P. verrucosum*, at 25 °C in (A) PDA, (B) Cz and (C) MEA. (D) Conidiophora and conidia.

características culturales difieren entre el aislado 1P y los aislados 2P y 4P, considerándose probablemente la presencia de dos variedades debido a que presentaron tasas de crecimiento menores ( $.12$  a  $.55 \text{ cm}^2 \text{ d}^{-1}$ ) y esta característica fisiológica permite separar individuos de la misma especie. Por otra parte la región ITS y la subunidad 5.8s del ADNr utilizada en este tipo de análisis son muy conservadas intraespecíficamente por lo que no son las más adecuadas para estudiar grupos subespecíficos. Con

reports behavior characteristics for the reference species in a czapek yeast agar (CYA) medium and the medium used for this characterization was czapek agar medium (Cz'). However, the behavior displayed in malt extract agar (MEA), reported in the bibliography, also differs. Therefore, the use of culture media is not considered a part of the explanation in the discrepancy in the size of the cultures. This discrepancy may also be justified by the difference in growth rates.



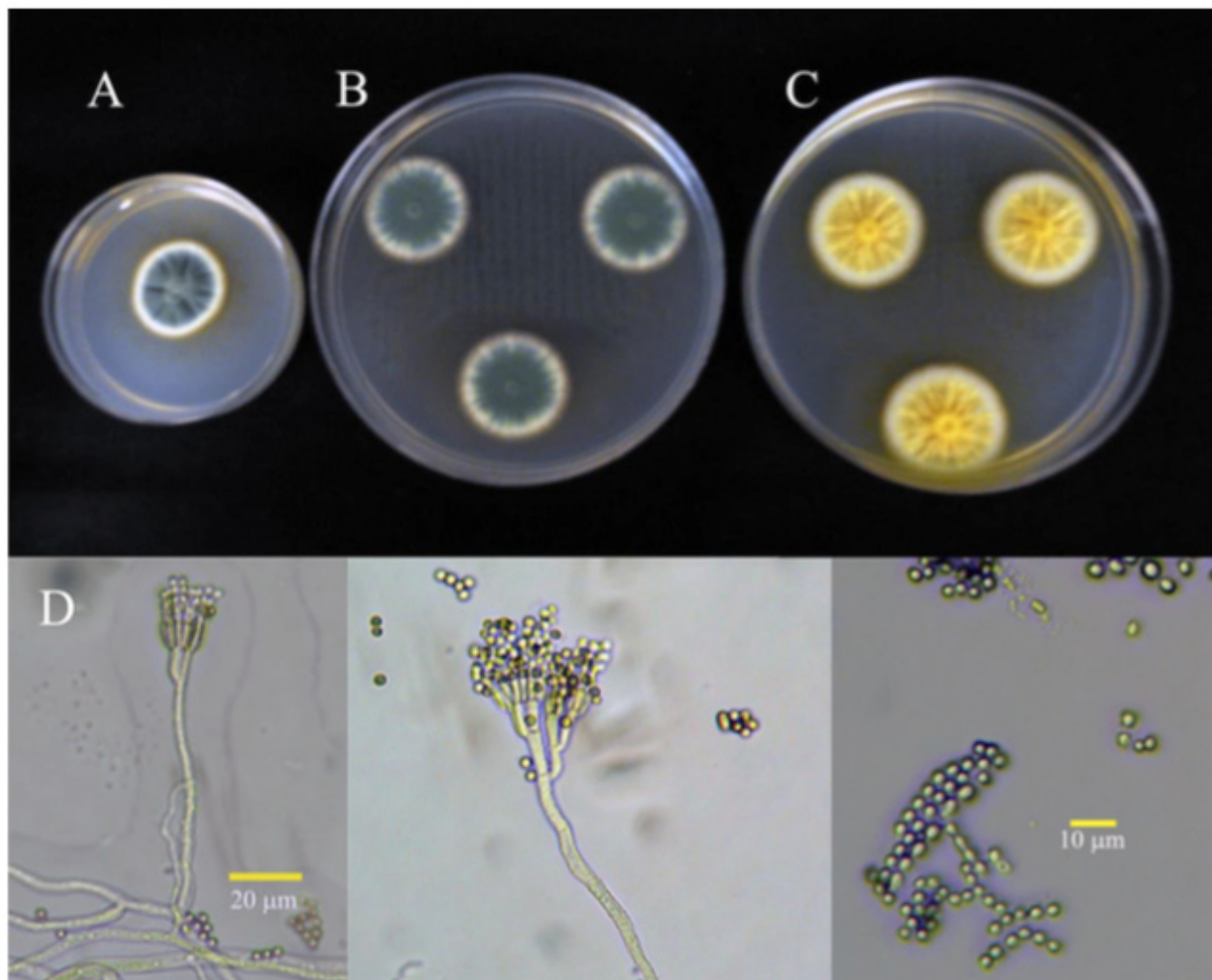
**Figura 2.** Colonias del aislado 2P identificado como *P. verrucosum* de 7 días, 25 °C en (A) PDA, (B) Cz y (C) MEA. (D) Conidióforos y conidias.

**Figure 2.** Cultures of isolate 2P identified as 7-day old *P. verrucosum*, at 25 °C in (A) PDA, (B) Cz and (C) MEA. (D) Conidiophora and conidia.

respecto al aislado 3P, pertenece a la especie de *P. rugulosum*, la diferencia se encuentra en el crecimiento máximo de la colonia. La literatura reporta características de comportamiento para la especie referencia en medio agar czapek extracto de levadura (CYA) y el medio usado para esta caracterización fue medio agar czapek (Cz'). Sin embargo, el comportamiento en extracto de malta agar (MEA), reportado en literatura, también difiere; por lo que

### Molecular characterization of isolations

Table 5 shows the results of the amplification and sequencing in both directions of the rDNA of the four *Penicillium* isolations. This teste reported that the causal agents of the rotting of gladiolus agents in storage are *P. verrucosum* and *P. rugulosum*. Traditionally, this pathology is related to *P. gladioli* (McCulloch and Thom, 1928). However, Frisvad



**Figura 3.** Colonias del aislado 4P identificado como *P. verrucosum* de 7 días, 25 °C en (A) PDA, (B) Cz y (C) MEA. (D) Conidióforos y conidias.

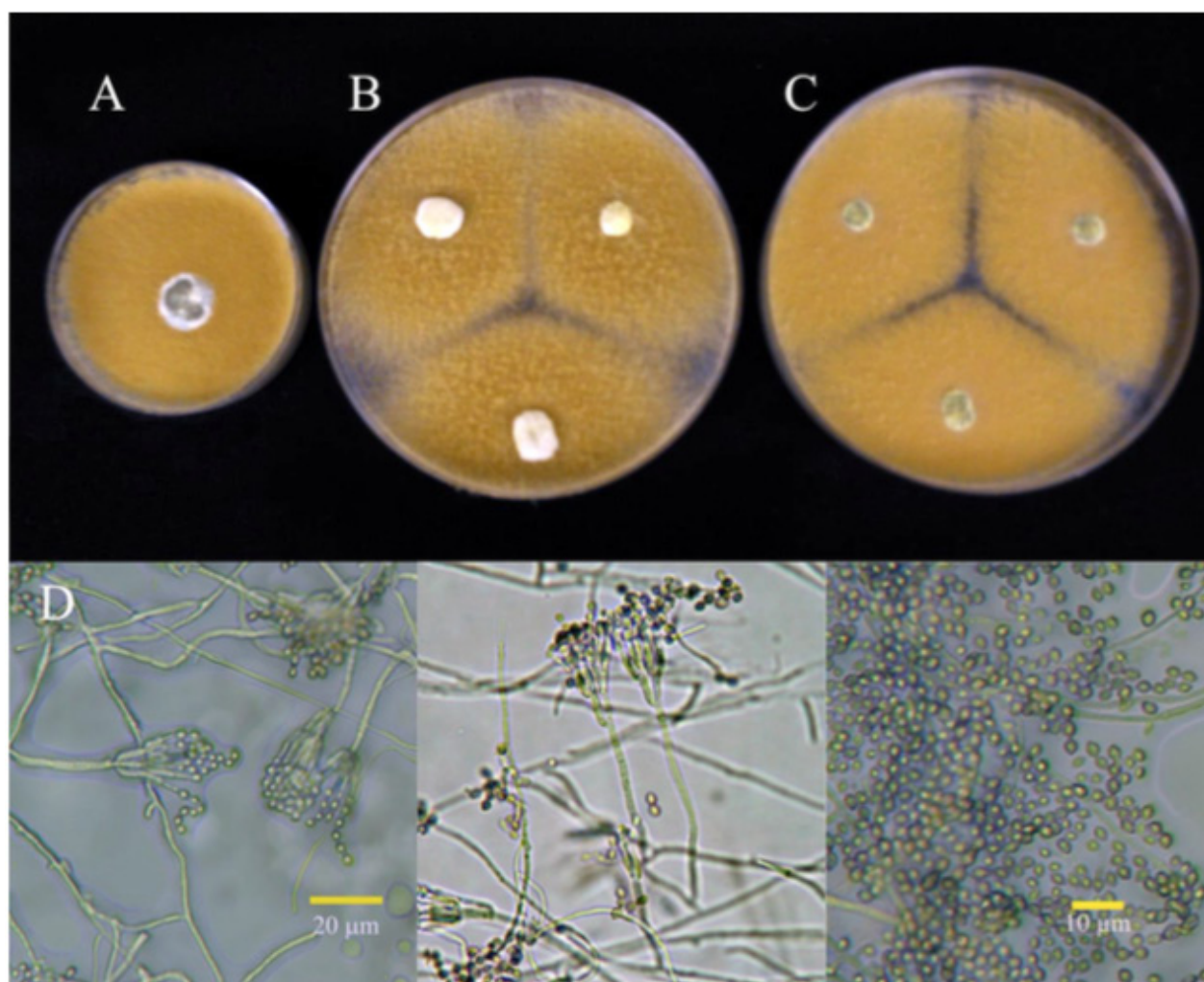
**Figure 3.** Cultures of isolate 4P identified as 7-day old *P. verrucosum*, at 25 °C in (A) PDA, (B) Cz and (C) MEA. (D) Conidiophora and conidia.

el uso de medios de cultivo no se considera como parte de la explicación en la discrepancia en el tamaño de las colonias. Esta discrepancia también puede justificarse por la diferencia en las tasas de crecimiento.

#### Caracterización molecular de los aislamientos

En el Cuadro 5 se muestran los resultados de la amplificación y secuenciación en ambos sentidos

and Samson (2004) mention that this species could be extinct due to the chemical management given to plants. On the other hand, there are reports of other species of *Penicillium* related to the rotting of gladiolus corms: *P. funiculosum* (Singh, 1970), *P. hirsutum*, *P. venetum* and *P. tulipae* (Overy *et al.*, 2005), *Penicillium* sp. (González-Pérez *et al.*, 2009) and *P. brevicompactum* (González-Pérez, 2011). Crous *et al.* (2004) mention in the mycobank database, that the species *P. verrucosum*,



**Figura 4.** Colonias del aislado 3P identificado como *P. rugulosum* de 7 días, 25 °C en (A) PDA, (B) Cz' y (C) MEA. (D) Conidióforos y conidias.

**Figure 4.** Cultures of isolation 3P identified as 7-day old *P. rugulosum*, at 25 °C in (A) PDA, (B) Cz' and (C) MEA. (D) Conidiophora and conidia.

**Cuadro 5.** Identificación molecular de aislados de *Penicillium* en cormos de gladiolo var. Grand Prix® 10/12.

**Table 5.** Molecular identification of *Penicillium* isolations in gladiolus var. GrandPrix® corms 10/12.

| Aislado | Especie                      | Tamaño molecular | Porcentaje de identidad | No. de acceso al NCBI* |
|---------|------------------------------|------------------|-------------------------|------------------------|
| 1P      | <i>P. verrucosum</i> Dierckx | 522              | 100                     | KC009832.1             |
| 2P      | <i>P. verrucosum</i> Dierckx | 526              | 100                     | KC009832.1             |
| 3P      | <i>P. rugulosum</i> Thom     | 529              | 100                     | GU566230.1             |
| 4P      | <i>P. verrucosum</i> Dierckx | 517              | 100                     | KC009832.1             |

\*NCBI: National Center for Biotechnology Information / NCBI: National Center for Biotechnology Information.

del ADNr de los cuatro aislados de *Penicillium*. Esta prueba reportó que los agentes causales de la pudrición de cormos de gladiolo en almacén son *P. verrucosum* y *P. rugulosum*. Tradicionalmente, esta patología es relacionada a *P. gladioli* (McCulloch y Thom, 1928). Sin embargo, Frisvad y Samson (2004) mencionan que esta especie puede estar extinta a causa del manejo químico que se da a las plantas. Por otro lado, existen reportes de otras especies de *Penicillium* asociadas a la pudrición del corno de gladiolo: *P. funiculosum* (Singh, 1970), *P. hirsutum*, *P. venetum* y *P. tulipae* (Overy *et al.*, 2005), *Penicillium* sp. (González-Pérez *et al.*, 2009) y *P. brevicompactum* (González-Pérez, 2011). Crous *et al.* (2004), mencionan en la base de datos mycobank, que la especie *P. verrucosum*, reportada en el análisis molecular, se encuentra relacionada con *P. hirsutum* y *P. verrucosum* var. *corymbiferum*, por lo que se asocia como uno de los principales agentes de pudrición de bulbos de flor (Chauhan y Saaltink, 1969; Smid *et al.*, 1995; Overy *et al.*, 2005). Por otro lado, *P. rugulosum* es conocida como una especie ampliamente distribuida; aislada de tejido enfermo o sano de diversos productos. Prince *et al.* (1988), aislaron esta especie de bulbos de Tulipan; sin embargo, hasta la fecha no se encuentran reportes de su presencia en cormos de gladiolo.

## CONCLUSIONES

*Penicillium verrucosum* y *Penicillium rugulosum* se identificaron como agentes causales de la pudrición del corno de gladiolo durante almacenamiento. La primera especie identificada se consideró como la más agresiva en las pruebas de patogenicidad. *Penicillium rugulosum* es reportado por primera vez como un agente fitopatogénico para gladiola.

reported in the molecular analysis, is related to *P. hirsutum* and *P. verrucosum* var. *corymbiferum*, and therefore associated as being one of the main agents of the rotting of flower bulbs (Chauhan and Saaltink, 1969; Smid *et al.*, 1995; Overy *et al.*, 2005). On the other hand, *P. rugulosum* is known as a widely distributed species; isolated from diseased or healthy tissues of diverse products. Prince *et al.* (1988), isolated this species from tulip bulbs; however, to date there are no reports found of its presence in gladiolus corms.

## CONCLUSIONS

*Penicillium verrucosum* and *Penicillium rugulosum* were identified as causal agents of rotting of the gladiolus corm during storage. The first species identified was considered the most aggressive in the pathogenicity tests. *Penicillium rugulosum* is reported for the first time as a phytopathogenic agent for gladiolus.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank the National Polytechnic Institute (Instituto Politécnico Nacional - IPN) of Mexico for the financial support.

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

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Instituto Politécnico Nacional (IPN) de México por el apoyo financiero.

## LITERATURA CITADA

- CESAVEM. Comité Estatal de Sanidad Vegetal del Estado de México. 2011. Manejo fitosanitario de ornamentales. Disponible en línea: <http://www.cesavem.org/?accion=ornamentales>
- Chang LT, Elander RP. 1986. Long-term preservation of industrially important microorganism. Manual of industrial Microbiology and Biotechnology. In: Demian AL, Solomon NA (eds). American Society for microbiology. USA. pp. 49-55. <http://doi.org/10.1002/food.19880320124>
- Chauhan SK, Saaltink GJ. 1969. A *Penicillium* attack on hyacinth bulbs as affected by temperature and humidity. Netherlands Journal of Plant Pathology 75: 197-204. <http://doi.org/10.1007/BF01981990>
- Claridades Agropecuarias. 2006. La floricultura mexicana, el gigante que está despertando. La Floricultura mexicana; flores de corte 154: 3-38. Disponible en línea: <http://www.infoasercia.gob.mx/claridades/revistas/154/ca154.pdf#page=3>
- Comerio RM. 2000. Nefrotoxinas y especies nefrotóxicas del género *Penicillium* Link. Revista Iberoamericana de Micología 17: 82 – 89. Disponible en línea: <http://www.reviberoammicol.com/2000-17/082089.pdf>
- Crous PW, Gams W, Stalpers JA, Robert V and Stegehuis G. 2004. MycoBank: an online initiative to launch mycology into the 21st century. Studies in Mycology 50: 19-22. Disponible en línea: <http://www.westerdijknstitute.nl/images/ResearchGroups/Phytopathology/pdf/PDF%20OP%20NUMMER/203.pdf>
- DISEMINA. Estadísticas del Sector Agroalimentario y Pesquero. 2012. La floricultura en México. Número 89. SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera). Disponible en línea: [http://infosiap.siap.gob.mx/aagricola\\_siap\\_gb/icultivo/](http://infosiap.siap.gob.mx/aagricola_siap_gb/icultivo/)
- Doyle JJ, Doyle JL. 1990. A rapid total DNA preparation procedure for fresh plant tissue. Focus 12:13-15. Disponible en línea: <https://www.scienceopen.com/document?vid=6769c281-ab3f-4e1d-b01e-0414f9915561>
- Samson RA and Frisvad JC. 2004. Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*: a guide to identification of food and air borne terverticillate *Penicillia* and their mycotoxins. Pp: 1-174 p. In: Samson RA, Frisvad JC. (eds.). *Penicillium* subgenus *Penicillium*: new taxonomic schemes, mycotoxins and other extrolites. Studies in Mycology No. 49. Utrecht, The Netherlands. 251 p. Disponible en línea: [www.cbs.knaw.nl/publications/1049/voorwerk.pdf](http://www.cbs.knaw.nl/publications/1049/voorwerk.pdf)
- FUNPROVER. 2008. Cadena productiva de horticultura ornamental en el Estado de Veracruz. Disponible en línea: <http://www.funprover.org/formatos/PLANES%20ESTRATEGICOS/Cadena%20horticultura%20ornamental.pdf>
- González-Pérez E, Yáñez-Morales MJ, Ortega-Escobar HM, Velázquez-Mendoza J. 2009. Comparative analysis among pathogenic fungal species that cause gladiolus (*Gladiolus grandiflorus* Hort.) corm rot in Mexico. Revista Mexicana de Fitopatología 27:45-52. Disponible en línea: <http://scielo.unam.mx/pdf/rmfi/v27n1/v27n1a6.pdf>
- González-Pérez E. 2011. Fenología, propagación *In vitro* y enfermedades del gladiolo en San Martín Texmelucan, Puebla. Tesis de Doctorado. Colegio de Postgraduados. Postgrado de Recursos Genéticos y Productividad, Producción de Semillas. Montecillo, Texcoco, Edo. de México. Disponible en línea: <http://hdl.handle.net/10521/598>
- IFBC. International Flower Bulb Centre. 2012. Gladiolus as cut flowers. Guidelines for cut flower production. Disponible en línea: <http://edepot.wur.nl/167428>
- McCulloch L and Thom C. 1928. A rot of gladiolus corms caused by *Penicillium gladioli*, McC. and Thom. Journal of Agricultural Research 36:217-224. <http://doi.org/10.1126/science.67.1730.216-a>
- Moreno VM, Yáñez MMJ, Rojas MRI, Zavaleta ME, Trinidad SA. 2005. Diversidad de Hongos en Semilla de Amaranto (*Amaranthus hypochondriacus* L.) y su Caracterización molecular. Revista Mexicana de Fitopatología 23: 111-118. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/pdf/612/61223201.pdf>
- Overy DP, Karlshj K and Due MJ. 2005b. Low temperature growth and enzyme production in *Penicillium* ser. *Corymbifera* species, casual agents of blue mold storage rot in bulbs. Journal of Plant Pathology 87: 57- 63. <http://doi.org/10.1139/b05-110>
- Pataky NR. 1983. Gladiolus corm rots. University of Illinois. Extension. Report on plant disease. RPD No. 651. 6 p. Disponible en línea: <https://ipm.illinois.edu/diseases>
- Pitt JI and Hocking AD. 2009. Fungi and Food Spoilage. Third Edition. Springer. Pp. 169-273. [http://doi.org/10.1007/978-0-387-92207-2\\_7](http://doi.org/10.1007/978-0-387-92207-2_7)
- Prince TA, Stephens Ct and Herner RC. 1988. Pathogenicity, fungicide resistance, and ethylene production of *Penicillium* spp. isolated from tulip bulbs. Phytopathology 78: 682-686. <http://doi.org/10.1094/Phyto-78-682>
- Rasband W. 2006. ImageJ for microscopy. Image processing and analysis in Java. Disponible en línea: <http://rsb.info.nih.gov/ij/docs/index.html>
- Singh RN. 1970. *Penicillium* rots of gladiolus in India. Plant and Soil 33: 249-250. <http://doi.org/10.1007/BF01378215>
- Smid EJ, de Witte Y and Gorris LGM. 1995. Secondary plant metabolites as control agents of postharvest *Penicillium* rot on tulip bulbs. Postharvest Biology and Technology 6: 303-312. [https://doi.org/10.1016/0925-5214\(95\)00010-4](https://doi.org/10.1016/0925-5214(95)00010-4)
- Villanueva-Arce, R., A. M. Hernández-Anguiano, M. J. Yáñez-Morales, D. Téliz-Ortiz, A. Mora-Aguilera, E. Cárdenas-Soriano, y A. Castañeda-Vildózola. 2005. Caracterización e identificación de *Colletotrichum fragariae* en frutos de chirimoya. Agrociencia 39: 93-106. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=30239109>
- White TJ, Bruns T, Lee S and Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innes MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ. (eds.). PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications. New York: Academic Press. Pp. 315-322. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1>