



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE FITOSANIDAD

FITOPATOLOGÍA

SENSIBILIDAD A FUNGICIDAS DE LAS ESPECIES DE *Fusarium* RESPONSABLES DE LA PUDRICIÓN DE LA MAZORCA DE MAÍZ

JAIME PÉREZ RODRÍGUEZ

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO.

2014

La presente tesis titulada: **SENSIBILIDAD A FUNGICIDAS DE LAS ESPECIES DE *Fusarium*, RESPONSABLES DE LA PUDRICIÓN DE LA MAZORCA DE MAÍZ**, realizada por el alumno: **JAIME PÉREZ RODRÍGUEZ**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS

FITOSANIDAD

FITOPATOLOGÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO:



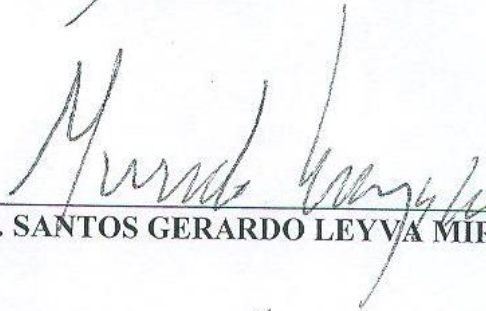
DR. DANIEL NIETO ÁNGEL

DIRECTORA DE TESIS:



DRA. HILDA VICTORIA SILVA ROJAS

ASESOR:



DR. SANTOS GERARDO LEYVA MIR

ASESORA:



M.C. VICTORIA AYALA ESCOBAR

MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO, ABRIL 2014.

AGRADECIMIENTOS

A **Dios**, por darme la fuerza necesaria para terminar esta etapa en mi vida.

Al pueblo de México, a través del **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)** y el **Colegio de Postgraduados**, por darme la oportunidad de realizar mis estudios de maestría.

A la **Dra. Hilda Victoria Silva Rojas** por su amistad y apoyo invaluable en la dirección, planeación, ejecución y culminación de este trabajo.

Al **Dr. Daniel Nieto Ángel**, con todo mi respeto y agradecimiento por sus acertadas sugerencias durante el desarrollo de mi investigación.

A la **Maestra Victoria Ayala Escobar** por su amistad, por sus sabios consejos y porque siempre está dispuesta a apoyar.

Al **Dr. Santos Gerardo Leyva Mir**, por las todas las atenciones y sus valiosas sugerencias en el desarrollo de mi investigación.

A mis compañeros y amigos: **Tovar, Eli, Jafet, Gil, Lety, Silvia, Chino, Miguel, Elvis, Edgar, Chay, Marta, Balta, Dago, Bere, Lupita, Daniel, Oscar Moreno, Arturo Aguilar, José Manuel Montiel, Horacio Vega y Flavio García**, por los momentos de alegría y dificultad, pero sobre todo, gracias por la amistad que encontré en cada uno de ustedes.

A mis compañeros y amigos del laboratorio de Semillas: **Berenice Uribe, Rayo y Ale**, por su valiosa ayuda en la fase de laboratorio y secuenciación de esta investigación.

A mis compañeros de trabajo, de la Empresa **BASF MEXICANA S.A. de C.V.**: **Eduardo, Guillermo, Humberto y Nazario**, gracias por darme todas las facilidades en esta etapa y por la oportunidad de pertenecer a este gran equipo.

DEDICATORIA

A mis queridos padres: **María del Socorro y Paulino.**

A mis hermanos: **Álvaro y Aracely.**

A mi hermano **Paulino Jr.** y su familia: **Vianey, Paola y Samuel.**

A mis Amigos: **Juan Manuel Tovar y Ana María.**

Sinceramente

CONTENIDO

ÍNDICE DE CUADROS	V
ÍNDICE DE FIGURAS	VI
RESUMEN	VII
ABSTRACT	VIII
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1.1 Justificación.....	1
1.2 Planteamiento del problema.....	3
1.3 Objetivos.....	5
1.4 Hipótesis	5
CAPÍTULO II. REVISIÓN DE LITERATURA	6
2.1 Importancia del maíz	6
2.2 Principales enfermedades fungosas	9
2.3 La pudrición de la mazorca.....	10
2.3.1 Importancia económica	11
2.3.2 Descripción del agente causal y síntomas	12
2.3.3 Ciclo de la enfermedad.....	13
2.3.4 Factores que favorecen su desarrollo	13
2.3.5 Conceptos taxonómicos para la identificación de las especies	14
2.3.6 Identificación molecular y estudios sobre diversidad genética.....	17
2.3.7 Manejo integrado de la enfermedad	19
2.3.7.1 Tratamiento químico.....	20
2.4 Literatura citada	23
CAPÍTULO III. IDENTIFICACIÓN FILOGENÉTICA DE HONGOS ASOCIADOS A LA PUDRICIÓN DE MAZORCA EN VALLES ALTOS.....	29
Resumen.....	29
Abstract	30
3.1. Introducción	31
3.2. Materiales y métodos	31
3.2.1. Colecta de materiales	31
3.2.2. Aislamiento de microorganismos cultivados	32
3.2.3. Análisis molecular.....	33

3.2.3.1. Extracción de DNA.....	33
3.2.3.2. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	34
3.2.3.3. Electroforesis horizontal en gel	35
3.2.3.4. Limpieza de producto de PCR.....	35
3.2.3.5. Secuenciación Sanger	35
3.2.3.6. Construcción de árboles filogenéticos	36
3.3. Resultados y discusión.....	36
3.4. Literatura citada	40
CAPÍTULO IV. SENSIBILIDAD A FUNGICIDAS EN ESPECIES DE <i>Fusarium</i> ASOCIADAS A PUDRICIÓN DE MAZORCA DEL MAÍZ EN LOS VALLES ALTOS DE MÉXICO	42
4.1 Introducción	44
4.2 Materiales y métodos	46
4.3 Resultados y discusión.....	48
4.4 Literatura citada	55
CAPITULO V. CONCLUSIONES GENERALES	58

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro Numero		Página
CAPÍTULO II		
2.1	Principales enfermedades de importancia histórica y a futuro en maíz y otros cereales.	10
2.2	Especies de <i>Fusarium</i> pertenecientes al grupo <i>Gibberella fujikuroi</i> y sus hospedantes.	15
2.3	Fungicidas de acción sistémica y de contacto recomendados en el cultivo de maíz para la protección de semillas.	22
CAPÍTULO III		
3.1	Relación de los siete sitios de colecta de las variedades de maíces y su origen en los Valles Altos de México.	32
CAPÍTULO IV		
4.1	Media de CE ₅₀ para cada fungicida probado para inhibición del crecimiento micelial in vitro de aislados de <i>Fusarium</i> spp. obtenidos de mazorcas de maíz con síntomas de pudrición en campos de los valles altos de México.	48
4.2	Efecto de los fungicidas difenoconazol, pyraclostrobin, tiofanato-metil y captan sobre el crecimiento micelial in vitro de aislados de <i>Fusarium</i> spp. obtenidos de mazorcas de maíz con síntomas de pudrición en campos de los valles altos de México.	49

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura Numero		Página
CAPÍTULO III		
3.1	Fragmentos amplificados por PCR para identificar especies de <i>Fusarium</i> en los Valles Altos de México.	37
2.2	Árbol filogenético basado en la región ITS de 81 aislamientos de especies de <i>Fusarium</i> y uno de <i>Sternocarpela maydis</i> obtenidos de mazorcas con síntomas de pudrición de la mazorca utilizando el método de máxima parsimonia. El árbol filogenético fue construido con el algoritmo neighbor-joining usando el software MEGA 5.0.2	38
CAPÍTULO VI		
4.1	Efecto del fungicida difenoconazol sobre el crecimiento micelial <i>in vitro</i> de aislados de <i>Fusarium</i> spp. obtenidos de mazorcas de maíz con síntomas de pudrición en campos de los valles altos de México.	50
4.2	Efecto del fungicida pyraclostrobin + Acido salicilhidroxamico sobre el crecimiento micelial <i>in vitro</i> de aislados de <i>Fusarium</i> spp. obtenidos de mazorcas de maíz con síntomas de pudrición en campos de los valles altos de México.	52
4.3	Efecto del fungicida tiofanato-metil sobre el crecimiento micelial <i>in vitro</i> de aislados de <i>Fusarium</i> spp. obtenidos de mazorcas de maíz con síntomas de pudrición en campos de los valles altos de México.	53
4.4	Efecto del fungicida captan sobre el crecimiento micelial <i>in vitro</i> de aislados de <i>Fusarium</i> spp. obtenidos de mazorcas de maíz con síntomas de pudrición en campos de los valles altos de México.	54

**SENSIBILIDAD A FUNGICIDAS DE LAS ESPECIES DE *Fusarium*,
RESPONSABLES DE LA PUDRICIÓN DE LA MAZORCA EN MAÍZ**

Jaime Pérez Rodríguez, MC.

Colegio de Postgraduados, 2014.

RESUMEN

Una de las enfermedades más importantes en México y en todos los países donde se cultiva maíz, es la pudrición de la mazorca. Además de reducir el rendimiento del cultivo, esta enfermedad afecta las cualidades físicas, fisiológicas y fitosanitarias de las semillas. Los agentes causales reportados responsables de la pudrición de la mazorca, corresponden al género *Fusarium* (hongos transmitidos por semilla). Una forma fácil y accesible de manejar a estos patógenos es con el uso de fungicidas aplicados como tratamiento a la semilla. Sin embargo en México no existe información disponible sobre la eficacia de estos fungicidas contra las especies de *Fusarium*. Los objetivos en este estudio fueron: a) determinar la biodiversidad de las especies de *Fusarium* asociadas a la pudrición de la mazorca en maíces de Valles altos de México, b) evaluar el control *in vitro* de las especies de *Fusarium* asociadas a la pudrición de la mazorca del maíz en valles altos de México con fungicidas especialmente formulados para el tratamiento de semillas. La identificación molecular de todos los aislamientos de *Fusarium* se realizó mediante la amplificación de la secuencia ITS del rDNA, usando los iniciadores ITS5 y NL4. De acuerdo al análisis filogenético, se encontró que *Fusarium verticillioides*, *F. proliferatum*, *F. subglutinans* y *F. poae* son las especies que se encuentran asociadas a la pudrición de mazorcas. Estas especies fueron utilizadas en la prueba *in vitro* de crecimiento micelial con cuatro fungicidas. Difenconazol y pyraclostrobin presentaron los valores de CE₅₀ más bajos, los cuales variaron de 0.019 a 0.155 y de 0.027 a 1.940 µg mL⁻¹, respectivamente. Por otra parte, no se detectó diferencia significativa en cuanto a la sensibilidad que presentó cada una de las cuatro especies de *Fusarium*.

Palabras clave adicionales: *F. verticillioides*, *F. proliferatum*, *F. subglutinans*, *F. poae*, tratamiento de semillas.

SENSITIVITY TO FUNGICIDES FOR *Fusarium* SPECIES ASSOCIATED TO EAR ROT OF MAIZE

Jaime Pérez-Rodríguez, MC.

Colegio de Postgraduados, 2014.

ABSTRACT

One of the most important diseases in Mexico and in all over the world where maize is grown is ear rot. In addition to reduce the grain yield of the crop, this disease also affects physical, physiological and phytosanitary characteristics of the seeds. It has been reported that the agents responsible of ear rot corresponds to fungi from the *Fusarium* genre (which are transmitted by means of the seed). On easy way of dealing with these pathogens includes the use of fungicides, which are applied to the seeds. Never the less, in Mexico there is no information about the efficiency of these fungicides when applied to *Fusarium* species. The goals of this study were: a) Determine the diversity of *Fusarium* species associated to ear rot of maize in highlands in Mexico, b) Evaluate the *in vitro* monitoring of *Fusarium* species which are associated to ear rot of maize in highlands in Mexico with fungicides specially developed for seed care. The molecular identification was done by amplifying the ITS sequences from rDNA, using the initiators ITS5 and NL4. The results from the phylogenetic analysis revealed that the species *Fusarium verticillioides*, *F. proliferatum*, *F. subglutinans* and *F. poae* are associated with ear rot. These species were used for a mycelial growth *in vitro* test with four fungicides. Difenoconazol and pyraclostrobin presented the lowest CE₅₀ values, which range from 0.019 to 0.155 and from 0.027 to 1.940 µg mL⁻¹, respectively. On the other hand no significant differences for sensitivity were detected for the four *Fusarium* species.

Keywords: *F. verticillioides*, *F. proliferatum*, *F. subglutinans*, *F. poae*, seed treatment.

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1 Justificación

El maíz (*Zea mays* L.) es el cultivo más importante de México, desde el punto de vista alimentario, industrial, político y social. Este cereal se utiliza en más formas que cualquier otro, como alimento humano, para ganado, y para propósitos industriales. Cada parte de la planta tiene valor económico, el grano, las hojas, el tallo, las espiguillas y el raquis. De la industrialización del maíz se obtienen importantes subproductos utilizados como materias primas en la elaboración de telas, papel, cosméticos, materiales de lavandería, sazónadores, edulcorantes, saborizantes, aceite, jarabe, almidón, refrescos, pan, botanas, galletas, bebidas y bioetanol. La zeína, una proteína con propiedades termoplásticas, se usa para producir cintas adhesivas y esmaltes. La producción de etanol a partir de maíz ha sido un proceso de rápido desarrollo, debido a la búsqueda de fuentes de energía (Quezada-Salinas, 2010; Sánchez-Aguilar, 2013).

Para el periodo de 2011-2012 la producción de maíz a nivel mundial se estimó en 875.09 millones de toneladas. Los principales países productores de maíz son, en orden de importancia: Estados Unidos de Norteamérica (273.83 millones de t), China (208.13 millones de t), Brasil (71.29 millones de t), Argentina (25.70 millones de t), México (22.06 millones de t), India (21.06 millones de t), Ucrania (20.96 millones de t), Indonesia (19.37 millones de t), Francia (15.61 millones de t) y Sudáfrica (12.50 millones de t), de los cuales se obtienen el 78.90% de la producción mundial (FAOSTAT, 2012).

México es uno de los grandes consumidores de maíz, con una gran tradición en este cultivo y un fuerte arraigo del producto como base de la alimentación de la población. La

producción de maíz se da en todo largo el territorio nacional y se concentra básicamente en la obtención de grano blanco para consumo (Quezada-Salinas, 2010).

En México, la superficie sembrada de maíz es aproximadamente de 7 963 450 ha, de las cuales en el Estado de México se destinan 579 101 ha ubicándose entre los principales productores de este grano, después de Sinaloa y Jalisco. El rendimiento en la entidad es de 2.85 t ha⁻¹, con un volumen de producción anual de 1 549 545 t (SIAP, 2012). Las pérdidas ocasionadas por enfermedades en esta localidad no se ha estimado; sin embargo, se reconocen por su impacto las enfermedades fungosas como las pudriciones de mazorca y tallo, ocasionadas principalmente por especies de *Fusarium* (Rivas-Valencia et al., 2011).

Se estima que las pérdidas mundiales por enfermedades en los distintos cereales son de aproximadamente 9.4% de la producción total. Las pérdidas anuales en la faja maicera de los Estados Unidos de América oscilan entre 7 y 17%. Las pudriciones de la mazorca y tallo causadas por especies de *Fusarium* se encuentran entre las especies que causan enfermedades más importantes a nivel mundial, se presentan principalmente en países de África, América y Asia. En México se han reportado en la región de Valles altos, El Bajío y en los estados de Tamaulipas, Jalisco, Veracruz, Chiapas y Sonora (Rivas-Valencia et al., 2011).

La pudrición de la mazorca ha causado reducción del rendimiento en un 30 a 50% (Briones-Reyes, 2007), a la cosecha en las mazorcas se observan granos con pudriciones distribuidos al azar (solos o en grupos) y sobre estos desarrollo de micelio de color rosa-blanquecino a lila. La enfermedad también puede permanecer asintomática (sin síntomas

externos, y sin signos visibles del hongo), y así ser transmitido por semilla, ocasionado que granos y semillas de maíz pierdan calidad y valor comercial; además, la pérdida del valor alimenticio por contaminación con toxinas que estos patógenos producen (Morales-Rodríguez et al., 2007).

Una de las formas más efectivas de tener un manejo adecuado de las enfermedades transmitidas por semillas, es con el uso de fungicidas aplicados a las semillas durante el beneficio o antes de la siembra (Morales-Martínez, 1993). El tratamiento químico a las semillas es uno de los métodos de protección vegetal económicamente más accesible y además compatible con el medio ambiente si se compara con los tratamientos foliares de cobertura total o con el tratamiento en surco con productos granulados. El tratamiento de semillas consiste en aplicar una cantidad pequeña de ingrediente activo directamente, formando una cubierta para proporcionar protección frente al ataque de insectos y enfermedades transmisibles por semillas, así como frente a aquellas que atacan en etapas tempranas del cultivo y que provocan consecuencias devastadoras en la producción de los cultivos cuando no son controlados (FIS, 1999).

1.2 Planteamiento del problema

Una de las enfermedades más importantes en México y en todos los países donde se cultiva el maíz, es la pudrición de la mazorca. Además de reducir el rendimiento del cultivo, esta enfermedad afecta severamente las cualidades físicas, fisiológicas y fitosanitarias de las semillas. Los agentes causales reportados responsables de la pudrición de la mazorca, corresponden al género *Fusarium*.

Los daños y síntomas causados por especies del género *Fusarium* en el cultivo maíz, consisten en marchitamientos vasculares, reducción de la germinación, pudrición de raíces y tallos, tizón de plántulas, pudrición de granos y mazorcas. Una de las principales formas de diseminación de estos patógenos, es en el interior de semillas aparentemente sanas, afectando el embrión y pericarpio sin síntomas visibles.

Una de las formas fácil y accesible de manejar a los agentes causales de la pudrición de la mazorca es con el tratamiento químico de las semillas, esta es una práctica que se está volviendo común entre los productores agrícolas, por los reflejos directos en la salud y calidad fisiológica de las semillas que están destinadas a la siembra. El tratamiento químico de semillas provee a la semilla y a la plántula protección frente al ataque de enfermedades transmisibles por semillas, así como frente a aquellas que atacan en etapas tempranas del cultivo y que provocan consecuencias devastadoras en la producción cuando no son controladas.

Los nuevos ingredientes activos y formulaciones proveen un largo periodo de control, amplio espectro y control sistémico de enfermedades, motivo por el cual en el presente trabajo se evaluarán fungicidas de especialidad, recomendados para el tratamiento de semillas sobre las especies de *Fusarium* asociadas con la pudrición de la mazorca, por lo cual se plantean los siguientes objetivos:

1.3 Objetivos

1. Determinar la biodiversidad de las especies de *Fusarium* asociadas con la pudrición de la mazorca en maíces de Valles Altos de México.
2. Evaluar el control *in vitro* de especies de *Fusarium* asociadas a la pudrición de la mazorca del maíz en Valles Altos de México con fungicidas especialmente formulados para el tratamiento de semillas.

1.4 Hipótesis

1. La pudrición de la mazorca está asociada a varias especies de *Fusarium*.
2. Es posible identificar las especies de *Fusarium* utilizando información y técnicas de biología molecular.
3. Existen diferencias significativas en la efectividad de los fungicidas usados para el control de la pudrición de la mazorca.

CAPÍTULO II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Importancia del maíz

El maíz (*Zea mays* L.) es un pasto gigante domesticado de origen tropical mexicano, la planta es usada para producir grano y forraje (Salvador, 1997). El maíz grano es uno de los alimentos más antiguos que se conocen y debido a sus grandes bondades y multitud de usos se ha convertido en el cultivo más importante entre los cereales a nivel mundial por su producción (872 066 769 t, en la temporada 2011-2012, superando al trigo y al arroz) de las cuales 90% corresponden a maíz amarillo y el 10% restante a maíz blanco. Ocupa el segundo lugar en área de siembra, con alrededor de 177 379 506 ha, se siembra en 165 países y se comercializan en el mercado internacional más de 90 millones de toneladas (FENALCE, 2010; FAOSTAT, 2012).

La diversidad de los ambientes bajo los cuales se siembra es mucho mayor que la de cualquier otro cultivo. Aunque se originó y evolucionó en la zona tropical y subtropical, como una planta de excelentes rendimientos, hoy en día se cultiva desde los 58° de latitud norte, en Canadá y Rusia y hasta los 40° de latitud sur, en Argentina y Chile. La mayor parte del maíz se cultiva a altitudes medias, pero se siembra también por debajo del nivel del mar en las planicies del Caspio y hasta los 3800 msnm, en la cordillera de los Andes, en el Perú y Bolivia (FENALCE, 2010).

Además de constituir la base más importante de la alimentación humana, por la contribución directa a la dieta, el maíz de grano contribuye de manera indirecta a la alimentación del hombre, como alimento del ganado destinado a la producción de carne, leche y huevo (Llanos-Company, 1984).

El maíz es el cultivo agrícola más importante de México, desde el punto de vista alimentario, industrial, político y social. Este grano se produce en dos ciclos productivos: primavera-verano y otoño-invierno, bajo las diversas condiciones agroclimáticas, de humedad, temporal y riego (SIAP, 2012).

Como ya se mencionó antes, El maíz es el cultivo más importante para México, con un consumo diario *per cápita* de 343 gramos, 72% del total de cereales consumidos en el país. La siembra estimada de maíz en México para 2012 fue de 7.37 millones de ha, 33.50 % del área total cultivable del país. De ella 82.7 % se sembró en condiciones de temporal y el volumen de producción total fue de 22.10 millones de t (SIAP, 2012; Damian-Huato et al., 2013).

México es uno de los más importantes países consumidores de maíz. Con una gran tradición en este cultivo y un fuerte arraigo del producto como base de la alimentación de la población (Llanos-Company 1984). Según estimaciones, este extraordinario cereal, vía consumo directo aporta del 32 al 50% de la energía calórica y 35 al 55% de la proteína (Ortega-Corona et al., 2001).

El consumo de maíz en México se ha establecido bajo diversas formas, una de ellas y la más importante es la demanda que se destina al consumo humano. La forma básica del suministro del maíz es la tortilla, producto elaborado bajo el proceso de nixtamalización de masa o harina. Otros productos que se elaboran a partir de maíz que han ganado mercado dentro del país son los cereales, botanas y fécula.

El grano de maíz es utilizado en una gran diversidad de insumos industriales que le han hecho ser un grano sumamente versátil en comparación con los restantes. La industria almidonera se ha establecido como la segunda más importante en el consumo del maíz. Esta industria es significativa porque el almidón sirve como insumo para otras industrias, tales como la farmacéutica, frutuosa y textil.

El maíz también ha sido utilizado como alimento del ganado, ya sea en mezcla con otros forrajes o bajo la elaboración de alimentos balanceados. Existen otros usos que no precisamente son destinados al consumo alimentario, sino son utilizados como medicinas tradicionales o transformadas para la elaboración de artesanías.

Las plagas, enfermedades y malezas son un factor que disminuye la cantidad y calidad de la producción y que está siempre presente en el cultivo debido al crecimiento en las superficies cultivadas y al uso inadecuado de los plaguicidas, los cuales han seleccionado poblaciones de insectos, patógenos y malezas que al incrementarse, en número provocan daños a los cultivos (Mendoza-Zamora, 1996).

Entre los principales agentes causantes de enfermedades en maíz, se encuentran los hongos fitopatógenos, los cuales presentan una gran variación morfológica, patogénica y de adaptación a diversas condiciones climáticas, por lo que tienen la capacidad de atacar al maíz en sus diferentes etapas de desarrollo, reducen la capacidad de la planta de crecer de una manera normal y pueden producir en última instancia la pérdida de la cosecha del grano (Mendoza-Zamora, 1996).

2.2 Principales enfermedades fungosas

Una enfermedad es un mal funcionamiento de las células y tejidos del hospedante debido al efecto continuo sobre estos últimos de un organismo patógeno o factor ambiental y que origina la aparición de los síntomas. La enfermedad es un estado que implica cambios anormales en la forma fisiológica, integridad o comportamiento de la planta. Dichos cambios conducen a la alteración parcial o muerte de la planta o de sus órganos (Agrios, 2011). En maíz, se han reportado aproximadamente 125 enfermedades, para su reconocimiento y manejo se clasifican de acuerdo a la parte de la planta que infectan, como: follaje, espiga, tallo y mazorca (Rodríguez-Montesoro y De León, 2008).

Las principales enfermedades que afectan al maíz en México son de origen fungoso, se encuentran diseminadas en todo el país, y su aparición están sujetas a las condiciones ambientales que favorezcan la infección y multiplicación del patógeno, así como la fuente de inóculo y la susceptibilidad de los genotipos (Varón y Sarria, 2007).

El maíz en México, es afectado principalmente por hongos que causan los llamados carbones, *Sporisorium reilianum*, *Ustilago maydis* (DC), o bien las que causan los tizones y manchas foliares, como *Helminthosporium* spp. (*Dreschlera*), *Fusarium* spp., *Curvularia* spp., *Alternaria* spp., complejo de la mancha de asfalto y el cornezuelo del maíz, *Claviceps gigantea* (Programa de Maíz de CIMMYT, 2004; Morales-Martínez, 1993).

La epidemia más devastadora de maíz que ha tenido lugar en los tiempos modernos fue la marchitez foliar del maíz del sur en 1970, cuando se perdió aproximadamente el 20% de toda la cosecha de maíz. Las pérdidas en algunas áreas fueron del 100%, mientras que en

áreas más secas, donde las condiciones no favorecieron la enfermedad, no hubo ninguna pérdida (White, 2004). En el cuadro 2.1 se muestran algunas enfermedades de importancia histórica y a futuro en maíz.

Cuadro 2.1 Principales enfermedades de importancia histórica y a futuro en maíz y otros cereales (Agrios, 2011).

Enfermedad	Localización	Comentarios
Royas de los cereales	Mundial	Epidemias graves, frecuentes, provocan enormes pérdidas anuales.
Carbón de los cereales	Mundial	Pérdidas continuas de todas las semillas.
Cornezuelo del centeno y del trigo	Mundial	Veneno para el hombre y los animales.
Mancha café del arroz	Asia	Epidémica; ocasiono hambre a los habitantes de bengala en 1943.
Tizón sureño del maíz	Estados unidos	Epidémica; en 1970 causo la pérdida de 1000 millones de dólares.
Mildiu del maíz y del sorgo	Asia	Se disemina a partir del Sureste de Asia.

2.3 La pudrición de la mazorca

La producción de grano de maíz es afectada por diversas enfermedades; entre éstas destaca, por las pérdidas que ocasiona en el rendimiento, cualidades físicas, fisiológicas y fitosanitarias de la semilla, la pudrición de la mazorca causada por diversos géneros de hongos, las especies más frecuentemente reportadas como causantes de estas enfermedades en México corresponden al género *Fusarium* (Rivas-Valencia et al., 2011). Este hongo comprende una diversidad de especies y afecta a una amplia variedad de especies vegetales. Tiene un estado sexual en el género *Giberella* (Ascomycete), por lo tanto *Fusarium* tiene el potencial de presentar amplia variación genética (Coca-Morante, 2011).

2.3.1 Importancia económica

Las pudriciones de la mazorca causadas por hongos del género *Fusarium* causan severas pérdidas de cosecha, afectan la comercialización del grano (5% de daño, máximo aceptable) y constituye un problema de salud pública por las micotoxinas que producen los hongos cuando la incidencia de los patógenos y el daño es alto (Bentazos-Mendoza et al., 2009).

La pudrición de la mazorca, se encuentra entre las enfermedades más importantes a nivel mundial, se presenta principalmente en los países de África, América y Asia. En México se han reportado en la región de Valles Altos, El Bajío y en los estados de Tamaulipas, Jalisco, Veracruz, Chiapas y Sonora (Rivas-Valencia et al., 2011).

En México, específicamente en la región de Chalco, Estado de México, la pudrición de la mazorca provoca pérdidas del 30 al 50% de la producción según estimaciones de los productores de la zona (Briones-Reyes, 2007).

Además de provocar las pudriciones de la mazorca y la producción de micotoxinas, que son responsables de graves enfermedades en animales y seres humanos, las especies de hongos del género *Fusarium* son frecuentemente involucrados en la descomposición de semillas, raíces, pudriciones de tallos y la muerte de plántulas (damping-off); principalmente cuando la siembra se realiza en condiciones de alta humedad y bajas temperaturas (Matos et al., 2013).

2.3.2 Descripción del agente causal y síntomas

La pudrición de la mazorca es causada por *Fusarium moniliforme* (sin. *F. verticillioides*) J. Sheld. (teleomorfo *Gibberella fujikuroi* (Sawada) Ito in Ito & K. kimura población A de apareamiento), *F. proliferatum* (T. Matsushima) Nirenberg (teleomorfo *G. fujikuroi* población D de apareamiento) *F. subglutinans* (Wollenweb & Reinking) P. E. Nelson, T. A. Toussoun y Marasas (teleomorfo *G. fujikuroi* población E de apareamiento), *F. poae*, *F. solani*, *F. chlamydosporum* y *F. pseudonygamai* han sido identificadas en mazorcas con pudrición (White, 2000; Morales-Rodríguez et al., 2007). De las especies anteriores, *F. verticillioides* puede considerarse la especie más frecuente y distribuida afectando al maíz en el mundo (Programa de maíz del CIMMYT, 2004), la cual también puede ocurrir, junto con otras especies que afectan al maíz, dañando cereales de grano pequeño como trigo, cebada, sorgo y triticale (Rivas-Valencia et al., 2011).

Los síntomas varían dependiendo del genotipo, medio ambiente y severidad de la enfermedad. La pudrición de la mazorca, se manifiesta principalmente en granos individuales o grupos de granos infectados que están dispersos al azar en toda la mazorca. Los granos infectados desarrollan un micelio algodonoso de color rosa blancuzco a azul lavanda o lila. Los granos infectados también pueden exhibir un síntoma de “estallido de estrellas”, es decir, rayas blancas en el pericarpio. Estas rayas son canales corroídos dentro del pericarpio por el crecimiento fúngico, el aire en los canales rompe la transparencia del pericarpio de forma que no se puede ver la aleurona amarilla por debajo. El crecimiento fúngico se encuentra frecuentemente en la punta de la mazorca, donde la infección la está asociada con el gusano elotero y otros tipos de daños. Cuando la enfermedad es muy grave, toda la mazorca puede ser blancuzca y parecer como desgastada con crecimiento fúngico sobre los granos (White, 2004).

Otro síntoma característico de las mazorcas infectadas por *Fusarium* spp. es que los granos germinan estando aun en el olote (Programa de maíz del CIMMYT, 2004).

La enfermedad también puede permanecer asintomática, es decir, sin síntomas externos y sin signos visibles del hongo, por lo tanto, puede ser transmitida fácilmente por semilla, ocasionando que granos y semillas de maíz pierdan calidad y valor comercial (Jugenheimer, 1981).

2.3.3 Ciclo de la enfermedad

Las especies de *Fusarium* causantes de la pudrición de la mazorca sobreviven como micelio en el tejido interno de la semilla aparentemente sana, en suelos húmedos y residuos de cosecha donde forman peritecios que liberan ascosporas (resultado de la reproducción sexual); y estas se diseminan e inician la infección primaria. Cuando las condiciones son favorables (clima cálido húmedo), sobre los tejidos infectados se forman conidios (inóculo secundario), que son transportados principalmente por el viento hacia los estigmas de la planta donde germinan y posteriormente infectan las semillas (White, 2000; Morales-Rodríguez et al., 2007).

2.3.4 Factores que favorecen su desarrollo

El desarrollo de la enfermedad y su distribución se ven favorecidos por un tiempo seco y caluroso en la floración y después de esta. La infección sigue generalmente a los daños provocados por las rupturas debidas al crecimiento, gusanos de la espiga del maíz, gusanos eloteros y otros insectos. Determinados híbridos de maíz que poseen un alto

contenido de lisina que pueden ser más susceptibles a la pudrición de la mazorca causada por *Fusarium* (Sociedad Norteamericana Fitopatología, 1980).

2.3.5 Conceptos taxonómicos para la identificación de las especies

Las tres especies de *Fusarium* que intervienen en la enfermedad de pudrición de la mazorca se incluyen en el complejo *Gibberella fujikuroi* (Steenkamp et al., 2002; Morales-Rodríguez et al., 2007).

Taxonomía de *Fusarium* (Kirk et al., 2001)

Dominio	Eucariota
Reino	Fungi
Phylum	Ascomycota
Clase	Ascomicetos
Orden	Hipocreales
Familia	Hipocreaceae
Genero	<i>Gibberella (Fusarium)</i>
Sección	Liseola
Especie	<i>G. fujikuroi (Fusariumspp.)</i> species complex

El género *Fusarium* es polifilético y las especies que pertenecen a este género son anamorfos de diferentes géneros teleomorfos del orden hipocreales (O'Donnell 1996). El complejo *Gibberella fujikuroi* es un taxón monofilético que incluye un conjunto de especies de *Fusarium*, con características morfológicas similares y superpuestas que complican su diferenciación (O'Donnell and Cigelnik, 1997; Kvas et al., 2009). Consta de 11 especies sexualmente fértiles (conocidas como poblaciones de apareamiento, mating populations, MPs) y por lo menos 32 anamorfos pertenecientes al género *Fusarium* sección Liseola (Leslie and Summerell 2006). Las distintas especies del complejo *G. fujikuroi* se asocian

con enfermedades devastadoras y se han aislado de una gran variedad de hospedantes económicamente importantes como maíz, arroz, café, caña de azúcar, pino, entre otras, en las que producen diferentes enfermedades, metabolitos secundarios y micotoxinas (Leslie, 1999; Kvas et al. 2009). Las poblaciones de apareamiento del complejo se designan por letras desde la A a la K. En el cuadro 1.2 se muestran un resumen de algunas especies del grupo *G. fujikuroi* y sus respectivos hospedantes.

Cuadro 2.2 Especies de *Fusarium* pertenecientes al grupo *Gibberella fujikuroi* y sus hospedantes (Leslie and Summerell, 2006).

Especie de <i>Gibberella</i>	Especie de <i>Fusarium</i>	Población de apareamiento <i>G. fujikuroi</i>	Designación de tipo de apareamiento +/-	Designación de tipo de apareamiento MAT-1/2	Planta que infecta
<i>moniliformis</i>	<i>verticillioides</i>	MP-A	- +	MATA-1 MATA-2	Maíz
<i>Sacchari</i>	<i>sacchari</i>	MP-B	- +	MATB-1 MATB-2	Caña de azúcar
<i>fujikuroi</i>	<i>fujikuroi</i>	MP-C	+ -	MATC-1 MATC-2	Arroz
<i>intermedia</i>	<i>proliferatum</i>	MP-D	- +	MATD-1 MATD-2	Arroz, maíz
<i>subglutinans</i>	<i>subglutinans</i>	MP-E	- +	MATE-1 MATE-2	Maíz
<i>thapsina</i>	<i>thapsinum</i>	MP-F	+ -	MATF-1 MATF-2	Cebada, mijo, cacahuete
<i>nygamai</i>	<i>nygami</i>	MP-G	+ -	MATG-1 MATG-2	Cebada
<i>sircinata</i>	<i>sircinatum</i>	MP-H	- +	MATH-1 MATH-2	Coníferas
<i>Konza</i>	<i>konzum</i>	MP-I	n.a. n.a.	MATI-1 MATI-2	Pasto de pradera
<i>gadijirrii</i>	<i>gadijirri</i>	MP-J	n.a. n.a.	MATJ-1 MATJ-2	Pasto tropical
<i>xylarioides</i>	<i>xylarioides</i>	MP-K	n.a. n.a.	MATK-1 MATK-2	Café

n.a. = alelos no funcionales.

Algunas especies del complejo *G. fujikuroi* son capaces de infectar a distintas plantas hospederas y presentan una amplia distribución geográfica mientras que otras especies son específicas con respecto a su hospedero y presentan una distribución

restringida (Desjardins 2003). En el caso de *Fusarium proliferatum* (MP-D) se ha aislado desde maíz, banano, esparrago, mango, tabaco o trigo, pero principalmente es un patógeno del maíz debido a las micotoxinas que produce (Leslie, 1995), en tanto que *F. fujikuroi* (MP-C) es predominantemente un patógeno del arroz debido a las grandes cantidades de giberelinas que sintetiza y solo ocasionalmente se ha aislado de sorgo (Leslie, 1995; Desjardins, 2003).

En general las especies de *Fusarium* responsables de la pudrición de la mazorca pueden formar tres tipos de conidios hialinos con y sin septación transversal; microconidios unicelulares o septados (1-2 septos) mesoconidios fusiformes (1-3 septos), y macroconidios (multiseptados). Conidióforos con y sin ramificaciones, monofialides (en hifa o conidióforo) o polifialides (en conidióforo); micelio hialino septado, y puede formar clamidiosporas, esporodoquios y esclerocios (Booth, 1971; Nelson et al., 1983; Pascoe, 1990; Burgues et al., 1994; Morales-Rodríguez et al., 2007).

Cada especie presenta características específicas como son:

F. proliferatum: microconidios abundantes, formados en cadenas de longitud variable, y en falsas cabezas, comúnmente unicelulares, en forma de bastón con una base aplanada, algunos en forma de pera, macroconidios abundantes con célula basal en forma de pie; conidióforos con o sin ramificaciones, monofialides, y polifialides en forma de “V” y la coloración de la colonia es de púrpura-grisácea a rosa púrpura (Booth, 1971; Nelson et al., 1983; Burgues et al., 1994; Morales-Rodríguez et al., 2007).

F. subglutinans: microconidios abundantes formados en falsas cabezas, ovales, generalmente unicelulares, con uno a tres septos, fusiformes, rectos (mesoconidios); macroconidios abundantes, con la célula basal en forma de pie; conidióforos con o sin ramificaciones, monofialides y polifialides, la coloración de la colonia es de púrpura-blanquecino a rosa-púrpura (Booth, 1971; Nelson et al., 1983; Pascoe, 1990; Burgues et al., 1994; Morales-Rodríguez et al., 2007).

F. verticillioides: microconidios abundantes, formados en cadenas largas y falsas cabezas, principalmente unicelulares, algunos bicelulares, oval a subclavados con una base aplanada; macroconidios abundantes (a veces raros), con la célula basal en forma de pie; conidióforos con y sin ramificaciones; monofialides; la coloración de la colonia es de púrpura-grisácea a rosa-púrpura (Booth, 1971; Nelson et al., 1983; Burgues et al., 1994; Morales-Rodríguez et al., 2007).

El estado sexual de estas tres especies es un ascomiceto del género *Gibberella spp.* que forma peritecios con ascas y ascosporas hialinas a amarillo tenue, amerosporas, elipsoidales, rectas o curvadas. Los cultivos presentan coloración de púrpura-blanquecino o grisáceo a rosa-púrpura, con micelio aéreo difuso y crecimiento rápido (Booth, 1971; Nelson et al., 1983; Burgues et al., 1994; Morales-Rodríguez et al., 2007).

2.3.6 Identificación molecular y estudios sobre diversidad genética

Desde su creación en 1809 por Link, el género *Fusarium* ha recibido mucha atención en la literatura científica. Una parte significativa de estos estudios se trataron de temas taxonómicos, que en su mayor parte han sido denominados por el uso de la

morfología para diferenciar especies y grupos o secciones. En los años noventa, con los métodos basados en DNA, se comprobó de manera rápida que las clasificaciones basadas en la morfología subestiman en gran medida la verdadera diversidad del género (Leslie and Summerell, 2006; Kvas et al., 2009).

El uso de la información de la secuencia de DNA para la separación de las especies ha revolucionado la taxonomía de *Fusarium* y ahora es ampliamente aceptado para separar taxones que anteriormente se pensaba que eran especies o secciones individuales, en realidad son complejos de especies que constan de numerosos taxones distintos (O'Donnell et al., 2000). En la actualidad, uno de los complejos de especies más estudiados es el complejo de *Gibberella fujikuroi*, que incluye numerosas especies micotoxigénicas y fitopatógenas (Kvas et al., 2009).

Los resultados de cruces sexuales, integradas con las observaciones morfológicas y moleculares, de datos mediante el uso de RAPD, AFLP, RFLP y secuenciación de DNA, han demostrado que los resultados de los tres métodos de clasificación (biológica, morfológica y filogenética) son en gran medida congruentes. Sin embargo, los análisis filogenéticos realizados por O'Donnell utilizando varios genes, entre ellos β -tubulina y calmodulina, reveló 46 especies en el complejo *G. fujikuroi*, de las cuales 23 son nuevas para la ciencia. Entre las 46, las 11 especies identificadas utilizando el concepto de especie biológica, se han reportado idénticas a las especies filogenéticas, lo que indica que el enfoque filogenético puede proporcionar la misma información que el enfoque biológico y que otros MPs aún tienen que ser identificados (Moretti, 2009).

El análisis filogenético de las distintas especies de *Fusarium* mediante secuencias de las regiones ITS del DNA ribosomal o de los genes marcadores como el de β -tubulina, factor de elongación TEF o de histonas demostró que las especies del complejo *G. fujikuroi* tienen un origen monofilético y están cercanamente relacionadas (O'Donnell y Cigelnik 1997; O'Donnell et al., 2000; Proctor et al., 2004). Los miembros del complejo acuerdo a esto pueden agruparse en tres linajes denominados clado Asiático, clado Africano y clado Americano (O'Donnell et al., 1998; Troncoso-Vilches, 2013).

2.3.7 Manejo integrado de la enfermedad

El control de los agentes causales de la pudriciones de la mazorca se efectúa mediante prácticas agronómicas, cambio de fechas de siembra, control de insectos plaga, el uso de variedades resistentes y tratamiento químico; cualquiera de ellas, para que sea eficaz, debe alterar o interrumpir el ciclo biológico del patógeno (Bentazos-Mendoza et al., 2009).

Entre las prácticas agronómicas recomendadas para reducir los daños causados por las pudriciones de la mazorca, se encuentra la incorporación del rastrojo al suelo, rotación de cultivos, una fertilización balanceada en nitrógeno y potasio, así como una baja densidad de plantas (Dickson, 1963; Bentazos-Mendoza, 2001).

El uso de variedades resistentes a las pudriciones de la mazorca es el mejor método de control para reducir la pérdida de la cosecha y el riesgo de problemas de salud pública; además es un componente fácil de transferir (Dickson, 1963; Reid, 2003; Bentazos-Mendoza et al., 2009).

La resistencia a las pudriciones de la mazorca tiene dos componentes: en primer término la resistencia fisiológica y en segundo, una buena cobertura y decumbencia de la mazorca (Koehler, 1959), se sabe que la herencia de la resistencia fisiológica es poligenica, y que la acción génica involucrada es aditiva, semidominante y epistática, de modo que los métodos de mejoramiento por retrocruza y selección recurrente recíproca, pueden ser eficaces en el mejoramiento de esta característica (Boling y Grogan, 1965; Hooker, 1978; Bentazos-Mendoza, 2001).

La acción génica de la resistencia a la pudriciones de la mazorca causada por *F. moniliforme* y *F. graminearum*, está gobernada predominantemente por genes de efecto aditivo (Chungu et al., 1996; Reid, 2003) por lo tanto la mejor opción para reducir en forma significativa el daño causado por *Fusarium* es el uso de variedades resistentes.

2.3.7.1 Tratamiento químico

El tratamiento químico de semillas es uno de los métodos de protección vegetal económicamente más accesible y ampliamente recomendado para combatir la pudrición de la mazorca en sus primeras etapas. Este método consiste en aplicar una cantidad pequeña de ingrediente activo directamente, formando una cubierta para proporcionar protección ante la presencia de enfermedades, para asegurar el establecimiento de plantas sanas y vigorosas (Moechnig et al., 2013).

El tratamiento de semillas con fungicidas es un método fácil y económico de protección de plantas jóvenes vulnerables y semillas que han sido dañadas durante la recolección (Aveling et al., 2012). Los tratamientos de semillas también pueden ayudar a

preservar el potencial de rendimiento, evitar pérdidas de granos y semillas al impedir el desarrollo de las enfermedades transmitidas por el suelo (Moechnig et al., 2013).

En general el tratamiento químico de semillas se utiliza por tres razones: para el control de hongos transmitidos por el suelo, para controlar patógenos transmitidos en la superficie de las semillas y para el control de enfermedades que se encuentran en el interior de las semillas (Moechnig et al., 2013).

El tratamiento de semillas de maíz tradicionalmente se ha logrado con algunos fungicidas, siendo captan y tiabendazol los productos más utilizados. Recientemente otros productos han sido comercializados, tales como el fludioxonil, metalaxil, tiofanato metílico, pyraclostrobin y tilifluanida, con un espectro más amplio de ingrediente activos (Cuadro 2.3). El uso de mezclas de productos con modo de acción complementario para el tratamiento de semillas ha sido una estrategia, que además de ampliar la gama de patógenos que controlan, impide la generación de resistencia de la población objetivo de microorganismos de estos productos (Matos et al., 2013).

Cuadro 2.3 Fungicidas de acción sistémica y de contacto recomendados en el cultivo de maíz para la protección de semillas.

Ingrediente activo	Grupo químico	Modo de acción	Producto comercial
Captan	Pftalamida	Contacto	Captan 50 WP
Tiabendazol	Bencimidazol	Sistémico	Tecto 60 PH
Fludioxinil	Fenilpirrol	Contacto	Celest Formula M
Metalaxil	Fenilamida	Sistémico	Ridomil
Tiofanato Metílico	Benzimidazol	Sistémico	Cercobin M
Pyraclostrobin	Estrobirulina	Sistémico	Headline
Carboxin	Carboxamida	Sistémico	Vitavax 34FF
Thiram	Ditiocarbamato	Contacto	Flowsan FS
Iponazole	Triazoles	Sistémico	Rancona 450 FS
Pyraclostrobin + Tiofanato metílico	Estrobirulina + benzimidazol	Sistémico + Sistémico	Acronis
Carboxin + Captan	Carboxamida + Pftalamida	Sistémico + Contacto	Terravax 300PH
Fludioxinil + Mefenoxam	Fenilpirrol + Fenilamida	Contacto + Sistémico	Celest XL

La protección de semillas no debe de ir en detrimento de la calidad, por lo que es necesario que los fungicidas que se elijan para tratar semilla, no interfieran con la viabilidad o el vigor, no importa bajo qué condiciones de estrés las plantas se cultiven (Aveling et al., 2012).

2.4 Literatura citada

- Agrios, G. N. 2011. Fitopatología. 2a. ed. México: Limusa. 856 p.
- Aveling, T. A. S., Govender V., Kandolo D. S., and Kritzing Q. 2012. The effects of treatments with selected pesticides on viability and vigour of maize (*Zea mays*) seeds and seedling emergence in the presence of *fusarium graminearum*. Journal of Agricultural Science 1–8.
- Bentazos-Mendoza, E. 2001. Variedades de maíz resistentes, una opción para reducir la pudrición de la mazorca en Chiapas, México. Agricultura Técnica En México 27 (1): 57–67.
- Bentazos-Mendoza, E., Ramírez-Fonseca A. L., Coutiño-Estrada B., Espinoza-Paz N., Sierra-Macías M., Zambada-Martínez A., and Grajales-Solís M. 2009. Híbridos de maíz resistentes a la pudrición de mazorca en Chiapas y Veracruz. Agricultura Técnica En México 4 (35): 391–400.
- Boling, M. B., and Grogan C. O. 1965. Gene action affecting host resistance to *Fusarium* ear rot maize. Crop Science 5 (4): 305–7.
- Booth, C. 1971. The genus *Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute. CAB International. Kew, Surrey, England. 237 p.
- Briones-Reyes, D. 2007. Resistencia a pudrición de mazorca en poblaciones de maíz bajo mejoramiento participativo en el altiplano de México. Tesis de maestría. Colegio de Posgraduados, Montecillo, Edo. de México. México. 66 p.
- Burgues, L. W., Summerell B. A., Bullock S., Gott K. P., and Backhouse D. 1994. Laboratory manual for *Fusarium* research. Third edition. Department of Crop Science. University of Sidney, Australia. 133 p.

- Chungu, C., Mather D. E., Reid L. M., and Hamilton R. I. 1996. Inheritance of kernel resistance to *Fusarium graminearum* in maize. *The Journal of Heredity* 87 (5): 382–85.
- Coca-Morante, M. 2011. Fusariosis del maíz. Boletín técnico. Facultad de ciencias agrícolas, pecuarias, forestales y veterinarias “Dr. Martín Cárdenas”, Universidad Mayor de San Simón. Cochabamba, Bolivia. 5 (1): 1-4.
- Damian-Huato, M. A., Cruz-León A., Ramírez-Valverde B., Romero-Arenas O., Moreno-Limón S. and Reyes-Muro L. 2013. Maíz, alimentación y productividad: modelo tecnológico para productores de temporal en México. *Agricultura, Sociedad y Desarrollo* 10 (2): 157–76.
- Desjardins, A. E. 2003. *Gibberella* from A (venaceae) to Z (eae). *Annual Review Phytopathology* 41: 177–98.
- Dickson, J. G. 1963. Enfermedades de las plantas de gran cultivo. Barcelona, España: Salvat Editores. 107 p.
- FAOSTAT. 2012. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Consultada en <http://faostat.fao.org>. el día 20 de febrero de 2014.
- FENALCE (Federación Nacional de Cultivadores de Cereales y Leguminosas). 2010. El cultivo del maíz, historia e importancia. Palmira, Colombia. 19 p.
- FIS (Federación Internacional de Semillas). 1999. El tratamiento de semillas: una herramienta para la agricultura sostenible. Suiza. 8 p.
- Hooker, A. L. 1978. Genetics of disease resistance in maize. in Waden. D. B. (ed.). *Maize Breeding and Genetics* John Wiley and Sons. New York, U. S. A., 319–332 p.
- Jugenheimer, R. W. 1981. Maíz, variedades mejoradas. Métodos de cultivo y producción de semillas. México, D.F., México.: Limusa. 841 p.

- Kirk, P. M., Cannon, P. F., David, J. C., and Stalpers, J. A. 2001. Dictionary of the F. 9^o ed. CAB international. Wallingford. UK. 655 p.
- Koehler, B. 1959. Corn ear rots in Illinois, Illinois Agricultural Experimental Station. Bulletin 639.
- Kvas, M., Marasas W. F. O., Wingfield B. D., Wingfield M. J., and Steenkamp E. T. 2009. Diversity and evolution of *Fusarium* species in the *Gibberella fujikuroi* complex. Fungal Diversity 34: 1–21.
- Leslie, J. F., and Summerell B. A. 2006. The *Fusarium* laboratory manual. Blackwell Publishing. Aiowa, USA. 388 p.
- Leslie, J. F. 1995. *Gibberella fujikuroi*: available populations and variable traits. Canadian Journal of Botany 73: S282–S291.
- Leslie, J. F. 1999. Genetics status of the *Gibberella fujikuroi* species complex. Plant Pathology Journal 15: 259–69.
- Llanos-Company, M. 1984. Maíz; su cultivo y aprovechamiento. Madrid, España. Mundi-Prensa. 318 p.
- Matos, C. S. M., Barrocas E. N., Machado J. C., and Cardoso-Alves F. 2013. Health and physiological quality of corn seeds treated with fungicides and assessed during storage. Journal of Seed Science 35 (1): 10–16.
- Mendoza-Zamora, C. 1996. Enfermedades fungosas de hortalizas. Universidad Autónoma Chapingo. Departamento de Parasitología Agrícola. Chapingo, México. 85 p.
- Moechnig, M., Deneke D. L., Wrage L. J., Alms J., Vos D., Rosenberg M., Szczepaniec A., Hadi B., and Ruden K. 2013. Corn crop protection guide: seed treatments. South Dakota State University: iGrow.
- Morales-Martínez, E. 1993. Tratamiento químico de las semillas para el combate de los hongos. México, D.F.: UNAM. 68 p.

- Morales-Rodríguez, I., Yañez-Morales M. de J., Silva-Rojas H. V., García-de-los-Santos G., and Guzmán-de-Peña D. A. 2007. Biodiversity of *Fusarium* species in Mexico associated with ear rot in maize, and their identification using a phylogenetic approach. *Mycopathologia* 163: 31–39.
- Moretti, A. N. 2009. Taxonomy of *Fusarium* genus, a continuous fight between lumpers and splitters. *Proc. Nat. Sci.* 117: 7–14.
- Nelson, P. E., Toussoun T. A. and Marasas W. F. O. 1983. *Fusarium* species. An illustrated manual for identification. The Pennsylvania State University. University Park and London. USA.
- O'Donnell, K. 1996. Progress towards a phylogenetic classification of *Fusarium*. *Sydowia* 48: 57–70.
- O'Donnell, K., and Cigelnik E. 1997. Two divergent intragenomic DNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are non-orthologous. *Molecular Phylogenetics & Evolution* 7 (1): 103–16.
- O'Donnell, K., Cigelnik E. and Nirenberg H. I. 1998. Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia* 90 (3): 465–93.
- O'Donnell, K., Helgard I., Nirenberg H. I., Aoki T., and Cigelnik E. 2000. A multigene phylogeny of the *Gibberella fujikuroi* species complex: Detection of Additional Phylogenetically Distinct Species. *Mycoscience* 41: 61–78.
- Ortega-Corona, A., Cota-Agramont O., Surinder K. Vasal, Villegas-M. E., Córdoba-Orellana H., Barreras-Soto M. A. and Wong-Pérez J. de J. H-441C, H-442C y H-469C, híbridos de maíz de calidad proteínica mejorada para el noroeste y subtrópico de México. Instituto Nacional de Investigaciones, Agrícolas y

- Pecuarías. Centro de Investigación Regional Del Yaqui. Cd. Obregón, Sonora, México. 44 p.
- Pascoe, I. G. 1990. *Fusarium* Morphology I: Identification and characterization of a third conidia type, the mesoconidium. *Mycotaxon* 37: 150–60.
- Proctor, R. H., Plattner R. D., Brown D. W., Seo J. A. and Lee Y. W. 2004. Discontinuous distribution of fumonisin biosynthetic genes in the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycological Research* 108: 815–22.
- Programa de maíz del CIMMYT. 2004. Enfermedades del maíz: una guía para su identificación en el campo. Cuarta edición. México, D.F: Cimmyt. 114 p.
- Quezada-Salinas, A. 2010. Selección de germoplasma de maíz resistente al carbón de la espiga del maíz (*Sporisorium reilianum* f. sp. *zeae*), en los valles altos de México. Tesis doctoral. Colegio de Postgraduados, Montecillo, Edo. de Méx. México. 62 p.
- Reid, L. 2003. Breeding corn with improvement resistance. *Corn Breeding, Agricultural and Agri-Food Canada*. Central Experimental Farm, Ottawa.
- Rivas-Valencia, P., Virgen-Vargas J., Rojas-Martínez I., Cano-Salgado A. and Ayala-Escobar V. 2011. Evaluación de pudrición de mazorca de híbridos de maíz en valles altos. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 2 (6): 845–54.
- Rodríguez-Montesoro, R. and De León C. 2008. El cultivo del maíz: temas selectos. México, D.F.: COLPOS: Mundi-Prensa México. 127 p.
- Salvador, R. J. 1997. Maíz. *The encyclopedia of México: History, culture and society*. 14 p.
- Sánchez-Aguilar, P. 2013. La Agricultura sustentable. *Ganar-Ganar* 49: 26–28.
- SIAP. 2012. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Consultada en www.siap.gob.mx. el día 25 febrero de 2014.

- Sociedad Norteamericana Fitopatología. 1980. Compendio de enfermedades del maíz. Buenos Aires: Hemisferio Sur. 104 p.
- Steenkamp, E. T., Wingfield B. D., Desjardins A. E., Marasas W. F. O. and Wingfield M. J. 2002. Cryptic speciation in *Fusarium subglutinans*. Mycologia 94: 1032–1043.
- Troncoso-Vilches, C. M. 2013. Caracterización de la biosíntesis en hongos del género *Fusarium* pertenecientes al complejo taxonómico *Gibberella fujikuroi*. Tesis doctoral. Universidad de Chile, Santiago. Chile. 91 p.
- Varon-De-Agudelo, F and Sarria-Villa C. A. 2007. Enfermedades del maíz y su manejo: compendio ilustrado. Palmira, Colombia. 55 p.
- White, Donald G. 2004. Plagas y enfermedades del maíz. The American Phytopathological Society. 78 p.

CAPÍTULO III. IDENTIFICACIÓN FILOGENÉTICA DE HONGOS ASOCIADOS A LA PUDRICIÓN DE MAZORCA EN VALLES ALTOS

Jaime Pérez Rodríguez, Daniel Nieto Ángel, Hilda Victoria Silva Rojas, Victoria Ayala Escobar, Colegio de Postgraduados, Km. 36.5 Carr. México-Texcoco, Montecillo, Edo. de México, CP 56230, México; **Santos Gerardo Leyva Mir**, Universidad Autónoma Chapingo, Departamento de Parasitología Agrícola, Carr. México-Texcoco, Km. 38.5, Chapingo, Edo. de México, CP 56230.

Resumen

Este estudio tuvo como objetivo determinar diversidad de especies de *Fusarium* asociadas con la pudrición de la mazorca en maíces de Valles Altos de México mediante análisis filogenético. Durante el ciclo 2013 se recolectaron semillas de maíz provenientes de seis sitios distribuidos en los Valles Altos de México. A través del método de papel secante-congelación se obtuvieron 81 aislamientos de *Fusarium*, los cuales se purificaron mediante la técnica de cultivos monospóricos. La identificación molecular de todos los aislamientos de *Fusarium* se realizó mediante la amplificación de la secuencia ITS del rDNA, usando los iniciadores ITS5 y NL4. De acuerdo al análisis filogenético, se encontró que *Fusarium verticillioides*, *F. proliferatum*, *F. subglutinans* y *F. poae* son las especies que se encuentran asociadas a la pudrición de mazorcas de maíz en los Valles Altos de México. *Fusarium proliferatum* y *F. subglutinans* fueron las especies que presentaron el mayor porcentaje de frecuencia con un 26 y 14 %, respectivamente.

Palabras clave adicionales: *F. verticillioides*, *F. proliferatum*, *F. subglutinans*, *F. poae*.

CAPÍTULO III. IDENTIFICACIÓN FILOGENÉTICA DE HONGOS ASOCIADOS A LA PUDRICIÓN DE MAZORCA EN VALLES ALTOS

Jaime Pérez Rodríguez, Daniel Nieto Ángel, Hilda Victoria Silva Rojas, Victoria Ayala Escobar, Colegio de Postgraduados, Km. 36.5 Carr. México-Texcoco, Montecillo, Edo. de México, CP 56230, México; **Santos Gerardo Leyva Mir**, Universidad Autónoma Chapingo, Departamento de Parasitología Agrícola, Carr. México-Texcoco, Km. 38.5, Chapingo, Edo. de México, CP 56230.

Abstract

The goal of this study was to determine species diversity of *Fusarium* which are associated to ear rot in corn which is cropped in Highlands of Mexico by using phylogenetic analysis. Seeds of corn were collected from 6 sites in Highlands of Mexico during 2013. About 81 samples of *Fusarium* were obtained by using the method of freeze-blotter and purified by using the technique for monosporic crops. The molecular identification was done by amplifying the ITS sequences from rDNA, using the initiators ITS5 and NL4. The results from the phylogenetic analysis revealed that the species *Fusarium verticillioides*, *F. proliferatum*, *F. subglutinans* and *F. poae* are associated with ear rot for corn which is cropped in Highlands of Mexico. On the other hand *Fusarium proliferatum* and *F. subglutinans* were the species more affected with 26% and 14% respectively.

Keywords: *F. verticillioides*, *F. proliferatum*, *F. subglutinans*, *F. poae*.

3.1. Introducción

Los Valles Altos de la meseta central de México se localizan en Puebla, Hidalgo, Tlaxcala, Querétaro, Michoacán, Morelos, Estado de México y el Distrito Federal, con una altitud superior a 2 200 msnm; se cultiva cerca de 1.5 millones de hectáreas con maíz, la cual representa 20% de la superficie nacional establecida con este cultivo. En esta región, 700 000 hectáreas se ubican en zonas de riego y buen temporal (Turrent, 1994; Arellano-Vázquez et al., 2010).

Una de las principales limitantes para la producción de maíz en los Valles Altos de México son las enfermedades, entre estas destaca las pudriciones de tallo y mazorca ocasionadas principalmente por especies de *Fusarium* (Rivas-Valencia et al., 2011).

La pudrición de la mazorca ha causado reducción del rendimiento hasta 50%, mientras que la pudrición del tallo puede ocurrir con una incidencia (plantas dañadas) hasta 75% y causar pérdidas de 57%. Aunque la pudrición de la mazorca y del tallo de maíz, es causada por diversos géneros de hongo, las especies más frecuentemente reportadas corresponden al género *Fusarium*, al igual que en otras regiones del mundo (Rivas-Valencia et al. 2011).

3.2. Materiales y métodos

3.2.1. Colecta de materiales

Se colectaron mazorcas de maíz con síntomas de pudrición en siete sitios diferentes de los Valles Altos de México (Cuadro 3.1). Las mazorcas de cada sitio se desgranaron y se seleccionó un lote de 400 semillas¹. Las semillas se desinfestaron con una solución al

¹Se usarán 100 semillas con cuatro repeticiones.

1.5% de hipoclorito de sodio y 25% de alcohol durante 5 min. Posteriormente se enjuagaron con agua destilada estéril tres veces. Las semillas se colocarán en cajas de patología de acuerdo a la prueba de papel secante y congelamiento y se sellaron con parafilm (ISTA, 2013). Las cajas se incubaron a temperatura ambiente durante 24 h, después las cajas se congelaron a una temperatura de -20°C durante 48 h, después de este tiempo se colocaron las cajas a temperatura ambiente con luz blanca durante 12 h y 12 h con luz UV (366 nm de longitud de onda) durante 10 días con alternancia de luz/oscuridad.

Cuadro 3.1 Relación de los siete sitios de colecta de las variedades de maíces y su origen en los Valles Altos de México.

Lugar de colecta	Estado	Variedad	Año de colecta
Chapingo	Estado de México	H-52	2013
Montecillo	Estado de México	H-52	2013
Almoloya	Estado de México	Aspros-AS722	2013
Mixquiahuala	Hidalgo	Pioneer-P3368W	2013
Calpulalpan	Tlaxcala	Criollo morado	2013
Rafael Lara Grajales	Puebla	Asgrow-Faisan	2013
Chalco	Estado de México	Chalqueño	2008

Se examinaron las colonias fúngicas desarrolladas bajo un microscopio compuesto y se identificó la microflora por sus características de color, textura de la colonia, forma y longitud de conidióforos, forma, color y septación de conidios, y presencia de cuerpos de fructificación, entre otros.

3.2.2. Aislamiento de microorganismos cultivados

Se tomó una porción de micelio con conidios de todas las colonias crecidas sobre la superficie de las semillas y se colocaron en un tubo de ensayo con 10 mL de agua destilada estéril, se agitaron en un vortex para separar los conidios, se realizaron diluciones seriadas de 10^{-1} a 10^{-8} . De las diluciones 10^{-5} y 10^{-6} se vertieron 100 μ L a cajas de Petri con Agar-

Agua (17 g de agar, 1 000 mL de agua destilada estéril) y se esparcieron con una espátula L Drigalsky. Las cajas de Petri se incubaron a temperatura ambiente por 24 h, los conidios germinados se transfirieron a nuevas cajas de con PDA, las que se mantuvieron a temperatura ambiente y luz blanca por 7 días. Los conidios se transfirieron a tubos Eppendorf con glicerol estéril al 25% y se almacenaron a -80 °C en un ultracongelador (Thermo Scientific, USA).

3.2.3. Análisis molecular

3.2.3.1. Extracción de DNA

Los cultivos monoconidiales de cada uno de los aislamientos se colocaron en un mortero estéril y enfriado a -20°C, se maceraron con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino, los que se colocaron en tubos Eppendorf de 2 mL y se agregaron 1 mL de la solución de buffer CTAB 2% (Tris- HCl 100mM pH 8.0; EDTA 2H₂O mM, CTAB 2%; NaCl 1.4 M) (Doyle and Doyle, 1990) previamente precalentado a 60 °C, los tubos se incubaron a 60 °C por 1 h, mezclando con vortex cada 10 min. Posteriormente se agregó a cada tubo 500 µL de cloroformo – alcohol isoamílico (24:1 v/v) y se mezcló por inversión durante 10 min a temperatura ambiente. Para formar la fase acuosa y la fase orgánica los tubos se centrifugaron a 10 000 x g por 10 min, posteriormente se recuperó aproximadamente 600 µL de la fase acuosa y se colocaron en un tubo Eppendorf estéril de 1.5 mL. A continuación se añadieron 500 µL de isopropanol absoluto frío, se mezclaron suavemente para favorecer la precipitación y se colocaron a -20 °C por toda la noche. Después se centrifugaron a 10 000 x g por 30 min, se procedió a eliminar el alcohol y se agregó a cada tubo 500 µL de etanol al 70% para lavar la pastilla; se centrifugó nuevamente a 10 000 x g por 10 min. Se eliminó nuevamente el sobrenadante y los tubos

se secaron a temperatura ambiente por 2 h, finalmente se resuspendió la pastilla en 50 μL de agua libre de nucleasas.

La calidad y la concentración del DNA se verificaron mediante espectrofotometría con un NanoDrop 2000 UV-Vis (Thermo Scientific, USA), en el cual los valores de las relaciones 260/280 y 230/260 variaron entre 1.8 y 2.

3.2.3.2. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Amplificación del Espacio Transcrito Interno (ITS): Para la amplificación del loci ribosomal de la región correspondiente al Espacio Transcrito Interno (ITS) del rDNA se utilizaron los iniciadores ITS 5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') (White et al., 1990) y NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') (O'Donnell, 1992) que amplifica un fragmento de aproximadamente 1100 pares de bases (bp). La mezcla de reacción de PCR se preparó en un volumen final de 25 μL conteniendo 13.1 μL de agua ultrapura esterilizada, 5 μL of 10 \times PCR buffer (con 20 mM MgCl_2), 1 μL of dNTPs (each 20 μM), 0.3 μL de cada iniciador (10 μM), 5 μL de DNA genómico y 0.3 μL (2 U) de *Taq* DNA (Promega, USA).

La reacción de PCR se llevó a cabo en un termociclador C1000 Touch (BIO-RAD, USA). Las condiciones de amplificación fue de un ciclo inicial de desnaturalización a 95 $^{\circ}\text{C}$ por 4 min, seguido de 30 ciclos de 1 min a 95 $^{\circ}\text{C}$, 1 min a 58 $^{\circ}\text{C}$ y 2 min a 72 $^{\circ}\text{C}$ y un ciclo final de extensión a 72 $^{\circ}\text{C}$ por 10 min.

3.2.3.3. Electroforesis horizontal en gel

Las amplificaciones de la región del ITS se verificaron por electroforesis cargando 5 μL del producto de la PCR en un gel de agarosa al 1.5 % preparado con 1x TAE buffer (Tris Acetate-EDTA). El gel se tiñó con el reactivo GelRedTM (3 mg L⁻¹) (Biotium, USA) y las bandas se visualizaron en un transiluminador X-PRESS (Vilber Lourmat, Alemania) con el software Infinity-3026 desarrollado en UK.

3.2.3.4. Limpieza de producto de PCR

Los productos de PCR se limpiaron mediante una reacción enzimática con ExoSAP-ITTM (Affymetrix, USA). Se mezclaron 5 μL del producto de PCR con 2 μL de ExoSAP, obteniendo un volumen final de 7 μL ; para posteriormente incubarlo en un termociclador (Biorad, México) a 37 °C por 15 min para que las enzimas de ExoSAP degraden el remanente de iniciadores y nucleótidos no utilizados en la reacción de PCR. Finalmente se inactivaron las enzimas de ExoSAP a 80 °C por 15 min y se determinó la concentración final de DNA en el producto de PCR por espectrofotometría.

3.2.3.5. Secuenciación Sanger

A partir de la concentración del producto de PCR se calculó la cantidad del templado a usar en una reacción de secuenciación. Para cada una de las reacciones (Forward y Reverse), se colocaron 18 μL del buffer BigDye [®] Terminator v3.1 (1X) (Applied Biosystems, USA) más 2 μL de cada una de las muestras en los pozos de la placa de secuenciación. Posteriormente se colocó la placa en el termociclador (Biorad, México) con un programa que consistió en: un ciclo a 96°C por 1 min seguido de 25 ciclos a 96 °C por 10 s, 50 °C por 50 s, 60 °C por 4 min, finalmente a 4 °C.

Los productos de secuenciación se lavaron por el método de precipitación con etanol/EDTA, la placase colocó en el 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA).

3.2.3.6. Construcción de árboles filogenéticos

Se obtuvieron secuencias de las dos hebras de DNA por aislamiento, las que se ensamblaron y editaron usando BioEdit versión 7.0.5 (Hall, 1999), para crear las secuencias consenso, las que se compararon con la base de datos de GenBank del National Center for Biotechnology Information (NCBI) con la opción BLASTN (Zhang et al., 2000). Las secuencias consenso se compilaron en un archivo fasta y se alinearon con el profile mode del Clustal W 1.8.1 (Thompson, 1994), incluido en el programa MEGA6 (Tamura, 2013). La reconstrucción filogenética de los diferentes aislamientos se llevó a cabo con el método de Máxima Parsimonia utilizando la opción Close Neighbour Interchange (CNI) search (nivel=1), con un Initial tree por adición al azar (10 reps), los gap/missing se consideraron como completas deleciones.

Para determinar los valores de confianza de los agrupamientos dentro del árbol resultante se realizó un análisis de bootstrap con 1000 repeticiones (Felsestein, 1985). Secuencias de *Sternocarpella maydis* número de acceso ET165602.1 se asignó como fuera de grupo para la construcción del árbol filogenético.

3.3. Resultados y discusión

Obtención de aislamientos. A partir de mazorcas de maíz con síntomas de pudrición de la mazorca se obtuvieron 81 aislamientos de *Fusarium* spp (los cuales fueron identificados como F1 a F81). Las estructuras típicas de *Fusarium* fueron observadas en los

aislamientos, en general se observó micelio hialino septado, microconidios globulares a fusiformes con cero a tres septos; macrconidios falcados hasta siete septos de acuerdo a las especies y mesoconidios fusiformes, los cuales corresponden al tercer tipo de conidios de *Fusarium* con uno a tres septos, algunas especies tuvieron clamidosporas de color café (Nirenberg and O'Donnell, 1998)

Análisis filogenético. Con la realización de la PCR se obtuvieron fragmentos aproximados de 550 pares de bases (bp) (Figura 3.1). Cada secuencia fue comparada con secuencias de las mismas especies depositadas en el Gen Bank del NCBI. Los porcentajes de similitud variaron de 96.6 al 100%.

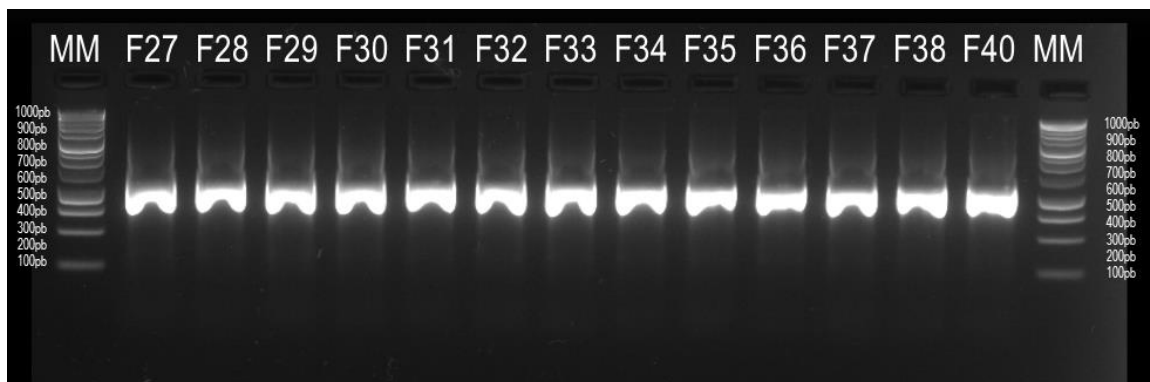


Figura 3.1 Fragmentos amplificados por PCR para identificar especies de *Fusarium* en los Valles Altos de México.

Las especies identificadas por análisis filogenético asociadas a la pudrición de la mazorca en valles altos de México fueron: *Fusarium verticillioides* (sin. *F. moniliforme*) J. Sheld. (teleomorfo *Gibberella fujikuroi* (Sawada) Ito in Ito & K. kimura población A de apareamiento), *F. proliferatum* (T. Matsushima) Nirenberg (teleomorfo *G. fujikuroi* población D de apareamiento) *F. subglutinans* (Wollenweb & Reinking) P. E. Nelson, T. A. Toussoun y Marasas (teleomorfo *G. fujikuroi* población E de apareamiento), (White,

2004; Morales-Rodríguez et al., 2007). De las especies anteriores, *F. proliferatum* puede considerarse la especie más frecuente y distribuida en la zona de estudio. En la Figura 3.2 se muestra el árbol filogenético construido con las secuencias ITS5-NL4 obtenidas de los 81 aislamientos.

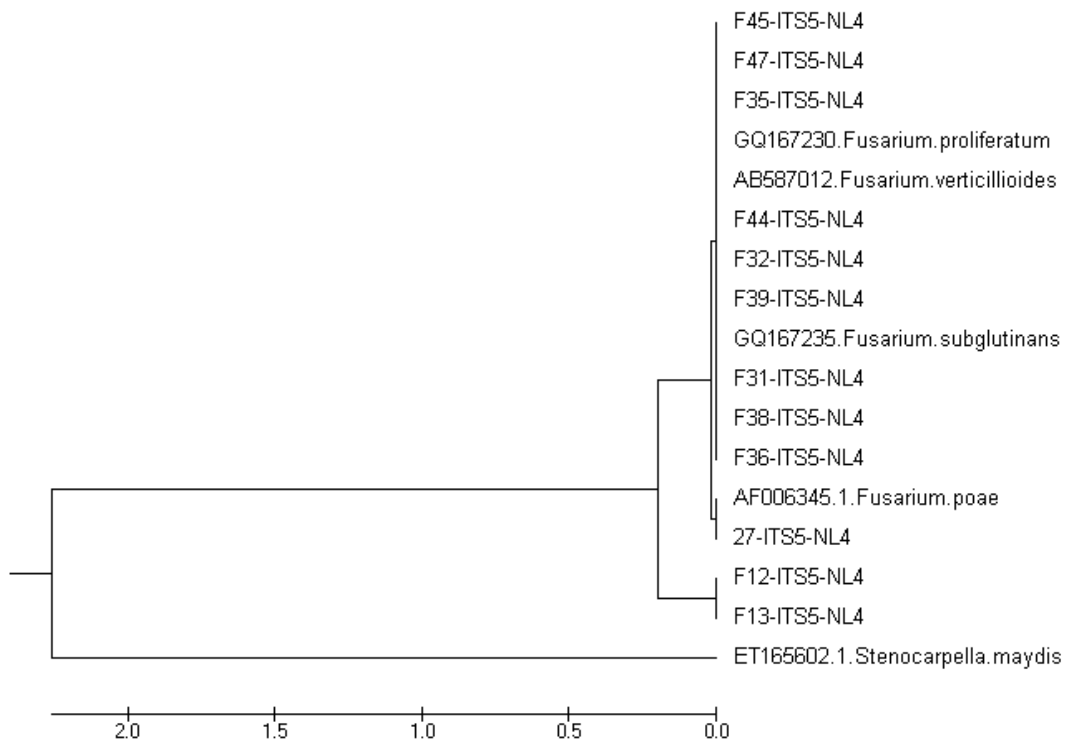


Figura 3.2 Árbol filogenético basado en la región ITS de 81 aislamientos de especies de *Fusarium* y uno de *Stenocarpella maydis*, obtenidos de mazorcas con síntomas de pudrición de la mazorca utilizando el método de máxima parsimonia. El árbol filogenético fue construido con el algoritmo neighbor-joining usando el software MEGA 5.0.2

F. proliferatum fue la especie con el mayor porcentaje de frecuencia con un 26%, seguido de *F. subglutinans* con 14.75%, *F. verticillioides* 11.4%, *F. oxysporum* 3.27% respectivamente. Las tres especies encontradas con mayor frecuencia en el presente estudio, responsables de la pudrición de la mazorca, pertenecen al complejo *Gibberella fujikuroi* (Steenkamp et al., 2002).

El desarrollo y distribución de las distintas especies de *Fusarium* depende de las condiciones climáticas, la capacidad de producción de conidios y la virulencia de la especie, los resultados en este estudio nos indican que *F. proliferatum* es la especie dentro del grupo *Gibberella fujikuroi* a la región de Valles Altos de México.

F. proliferatum además de infectar la mazorca, también provoca: marchitez de plántulas, pudrición de raíces, tallos y espigas de maíz. Este patógeno penetra a través de los estigmas, con infección y crecimiento de las hifas hasta los granos o por heridas de insectos, pájaros y granizo. Produce gran cantidad de conidios en rastrojos infectados, también afecta la calidad de los granos por acumulación de micotoxinas. *F. proliferatum* produce, entre otros, fumonisinas, que están asociadas a enfermedades en animales y humanos. Por ello, la importancia de una correcta identificación, ya que con esto se pueden tomar decisiones importante para el control de estas enfermedades.

3.4. Literatura citada

- Arellano-Vázquez, J. L., J. Virgen-Vargas, and M. A. Barreras-Soto. 2010. H-66 Híbrido de Maíz Para Los Estados de México y Tlaxcala. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 1 (2): 252–57.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783–791.
- Doyle, J. J. and Doyle, J. L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13–15.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41:95–98.
- ISTA. 2013. International Seed Testing Association. Rules for seed testing.
- Morales-Rodríguez, I., M. de J. Yañez-Morales, H. V. Silva-Rojas, G. García-de-los-Santos, and D. A. Guzmán-de-Peña. 2007. Biodiversity of *Fusarium* species in Mexico associated with ear rot in maize, and their identification using a phylogenetic approach. *Mycopathologia* 163: 31–39.
- Nirenberg, H. L. and O'Donnell, K. 1998. New *Fusarium* species and combination within the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia* 90:434-458.
- O'Donnell, K. 1992. Ribosomal DNA internal transcribed spacer are highly divergent in the phytopathogenic ascomycete *Fusarium sambucinum* (*Gibberella pulicaries*). *Current Genetics* 22:213–220.
- Rivas-Valencia, P., J. Virgen-Vargas, I. Rojas-Martínez, A. Cano-Salgado, and V. Ayala-Escobar. 2011. Evaluación de Pudrición de Mazorca de Híbridos de Maíz En Valles Altos. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 2 (6): 845–54.
- Steenkamp, E. T., B. D. Wingfield, A. E. Desjardins, W. F. O. Marasas, and M. J. Wingfield. 2002. Cryptic Speciation in *Fusarium* Subglutinans. *Mycologia* 94: 1032–43.

- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipiński, A., and Kumar, S. 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30:2725-2729.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., and Gibson, T. J. 1994. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22:4673-4680.
- Turrent, F. A. 1994. Plan de Investigación del Sistema Maíz-tortilla En La Región Centro. 45 p.
- White, Donald G. 2004. *Plagas y Enfermedades Del Maíz*. The American Phytopathological Society. 78p
- White, T. J., Bruns, T. J., Lee, S., and Taylor, J (eds.). 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 Amplifications*. Academic Press. San Diego, California, USA. 355 p.
- Zhang, Z., Schwartz, S., Wagner, L., and Miller, W. 2000. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *Journal of Computational Biology* 7:203-214.

CAPÍTULO IV. SENSIBILIDAD A FUNGICIDAS EN ESPECIES DE *Fusarium* ASOCIADAS A PUDRICIÓN DE MAZORCA DEL MAÍZ EN LOS VALLES ALTOS DE MÉXICO

Jaime Pérez Rodríguez, Juan Manuel Tovar Pedraza, Daniel Nieto Ángel, Hilda Victoria Silva Rojas, Victoria Ayala Escobar, Colegio de Postgraduados, Km. 36.5 Carr. México-Texcoco, Montecillo, Edo. de México, CP 56230, México; **Santos Gerardo Leyva Mir**, Universidad Autónoma Chapingo, Departamento de Parasitología Agrícola, Carr. México-Texcoco, Km. 38.5, Chapingo, Edo. de México, CP 56230, México.

RESUMEN

La pudrición de plántulas y mazorcas de maíz, causada por especies de *Fusarium*, es una enfermedad importante que se ha encontrado causando pérdidas en la producción en campos de maíz de los valles altos de México. Para el control de esta enfermedad se han usado varios fungicidas como tratamiento a la semilla. Sin embargo, en México no hay datos disponibles sobre la eficacia de estos fungicidas contra las especies de *Fusarium* asociadas a pudrición de mazorcas de maíz. El objetivo de este estudio fue determinar la sensibilidad a los fungicidas difenoconazol, pyraclostrobin, tiofanato-metil y captan en tres aislados de *F. verticillioides*, tres aislados de *F. subglutinans*, tres aislados de *F. proliferatum* y un aislado de *F. poae* asociados a síntomas de pudrición de semillas de maíz provenientes de los valles altos de México. La sensibilidad de los aislados se evaluó usando una prueba *in vitro* de crecimiento micelial y se determinó la concentración efectiva (CE₅₀) del fungicida en la cual el 50% del crecimiento micelial se inhibió para cada combinación aislado-fungicida. Difenoconazol y pyraclostrobin presentaron los valores de CE₅₀ más bajos, los cuales variaron de 0.019 a 0.155 y de 0.027 a 1.940 µg mL⁻¹, respectivamente. Para tiofanato-metil los valores de CE₅₀ variaron de 4.221 a 10.437 µg mL⁻¹. Mientras que, el fungicida de contacto captan mostró los valores de CE₅₀ más altos, los cuales variaron de 53.253 a 155.743 µg mL⁻¹. Por otra parte, no se detectó diferencia significativa en cuanto a la sensibilidad que presentó cada una de las cuatro especies de *Fusarium*.

Palabras clave adicionales: *Fusarium verticillioides*, *F. subglutinans*, *F. proliferatum*, *F. poae*.

**SENSITIVITY TO FUNGICIDES IN *Fusarium* SPECIES ASSOCIATED TO EAR
ROT OF MAIZE IN THE HIGHLANDS FROM MEXICO**

Jaime Pérez Rodríguez, Juan Manuel Tovar Pedraza, Daniel Nieto Ángel, Hilda Victoria Silva Rojas, Victoria Ayala Escobar, Colegio de Postgraduados, Km. 36.5 Carr. México-Texcoco, Montecillo, Edo. de México, CP 56230, México; **Santos Gerardo Leyva Mir**, Universidad Autónoma Chapingo, Departamento de Parasitología Agrícola, Carr. México-Texcoco, Km. 38.5, Chapingo, Edo. de México, CP 56230, México.

ABSTRACT

Ear and seedling rot of maize, caused by *Fusarium* spp., are important diseases causing severe yield loss in the highlands from Mexico. To control these diseases, several fungicides have been used as seed treatment. However, there are not data about the efficacy of these fungicides versus the *Fusarium* species associated to ear rot in Mexico. The aim of this study was to determinate the sensitivity to difenoconazole, pyraclostrobin, thiophanate-methyl and captan in three *F. verticillioides* isolates, three *F. subglutinans* isolates, three *F. proliferatum* isolates and one *F. poae* isolate. Isolates were tested using an *in vitro* mycelial growth assay to determine the effective fungicide concentration at which 50% of mycelial growth was inhibited (EC₅₀) for each isolate-fungicide combination. Among fungicides tested, difenoconazole, pyraclostrobin and thiophanate-methyl shown to be the most effective in growth inhibition of *Fusarium* species with EC₅₀ values ranged from 0.019 to 0.155, 0.027 to 1.940 and 4.221 to 10.437 µg mL⁻¹, respectively. Whereas, the contact fungicide captan exhibited the lowest effectiveness with EC₅₀ values ranged from 53.253 to 155.743 µg mL⁻¹. No significant difference was detected on the sensitivity of each evaluated *Fusarium* species.

Keywords: *Fusarium verticillioides*, *F. subglutinans*, *F. proliferatum*, *F. poae*.

4.1 Introducción

En México, la superficie sembrada de maíz (*Zea mays* L.) es aproximadamente de 7 963 450 ha, de las cuales en el Estado de México se destinan 579 101 ha ubicándose entre los principales productores de este grano, después de Sinaloa y Jalisco. El rendimiento en la entidad es de 2.85 t ha⁻¹, con un volumen de producción anual de 1 549 545 t (SIAP, 2012).

Las semillas y plántulas de maíz pueden ser infectadas por varias especies patógenas pertenecientes al género *Fusarium*, particularmente *F. verticillioides*, *F. proliferatum*, *F. subglutinans* y *F. graminearum*. Estas especies tienen origen en la semilla, sobreviven en el suelo o en residuos de cosecha y atacan semillas y plántulas (Cotten and Munkvold, 1998; Dodd and White, 1999). Mientras que, otras especies como *F. oxysporum* y *F. solani* no se presentan en semilla, pero si sobreviven en los suelos y frecuentemente infectan raíces de plántulas de maíz (Dodd and White, 1999).

Los daños recurrentes por la acción de patógenos en semillas de maíz, considerados económicamente significativos, han sido reducidos por las empresas productoras de semillas con el uso de tratamientos con fungicidas (Ramos et al., 2008). El tratamiento realizado directamente sobre la superficie de la semilla es una práctica rápida, eficiente y de bajo costo para el control de patógenos, ya que los productos aplicados causan un bajo impacto ambiental y los resultados se reflejan directamente sobre la calidad sanitaria y fisiológica de las semillas que son destinadas a la siembra (Agarwal and Sinclair, 1997; Machado et al., 2006; Machado de Matos et al., 2013).

Algunos de los fungicidas que se han usado como tratamiento a semilla de maíz para el control de *Fusarium* spp. incluyen a fungicidas metil-benzimidazol-carbamatos (MBC), inhibidores de la demetilación (DMI), inhibidores de la quinona (QoI) y fenilpirroles (Munkvold and Shriver, 2000; Munkvold and O'Mara, 2002; Aveling et al., 2012; Machado de Matos et al., 2013). Además, de otros fungicidas multisitio como es el caso del captan (Munkvold and O'Mara, 2002; Lasca et al., 2005).

Una alternativa para determinar la eficacia de fungicidas para tratamiento a la semilla es la evaluación del producto bajo condiciones controladas y contra hongos patógenos específicos. Las empresas que se dedican a la producción ingredientes activos para tratamientos a la semilla, típicamente llevan a cabo evaluaciones de este tipo durante el proceso de desarrollo del producto, pero los resultados son publicados raramente (McGee, 1995). Las etiquetas de los productos generalmente indican la actividad de acuerdo al género del hongo; sin embargo hay poca información sobre la eficacia a nivel de especie en géneros complejos como es el caso de *Fusarium*. Dentro de este género, la distribución y la patogenicidad de especies individuales varía significativamente, además, es importante evaluar la eficacia de fungicidas contra especies fungosas individuales. Adicionalmente, existe la necesidad de generar información sobre la eficacia relativa de los fungicidas disponibles para tratamientos a la semilla o potencialmente disponibles para su uso en maíz (Munkvold and O'Mara, 2002).

Por lo anterior, el objetivo de este estudio fue determinar la sensibilidad *in vitro* a los fungicidas sistémicos difenoconazol, pyraclostrobin y tiofanato-metil, así como la del fungicida de contacto captan en tres aislados de *Fusarium verticillioides*, *F. proliferatum*,

F. subglutinans y un aislado de *F. poae* asociados a síntomas de pudrición de mazorca en los valles altos de México.

4.2 Materiales y métodos

Aislados

Los 10 aislados de *Fusarium* spp. (*Fusarium verticillioides*: F32, F39, F44; *F. subglutinans*: F31, F36, F38; *F. proliferatum* F35, F45, F47; *Fusarium poae* F27) usados en este estudio se eligieron al azar a partir de una población de 81 aislados monospóricos recolectados de mazorcas con síntomas de pudrición en seis sitios de los valles altos de México. Dichos aislados se caracterizaron previamente a través de un análisis filogenético multilocus. Cada aislado se preservó por largo tiempo en tubos criogénicos conteniendo una solución de glicerina al 15 % almacenados a -80 °C.

Fungicidas

Los fungicidas usados en la prueba de sensibilidad se obtuvieron a partir de formulaciones comerciales de pyraclostrobin (Headline[®], BASF), tiofanato-metil (Cercobin[®], BASF), difenoconazole (Score[®] 250 CE, SYNGENTA) y captan (Captan 50 PH, BAYER).

Para la prueba de sensibilidad a pyraclostrobin, se agregó ácido salicilhidroxámico 99 % (SHAM; Sigma-Aldrich, EE.UU.) a una concentración de 100 µg mL⁻¹ con la finalidad de minimizar los efectos de la ruta oxidativa alterna (Olaya et al., 1998; Chen et al., 2012)

Prueba de inhibición del crecimiento micelial

La inhibición del crecimiento micelial de 10 aislados de *Fusarium* spp. se evaluó en medio papa dextrosa agar (PDA; Bioxon, EE.UU.) amenizado con fungicida. Para ello, se prepararon soluciones madre de cada uno de los fungicidas y la cantidad adecuada se agregó a medio PDA derretido para obtener las siguientes concentraciones: 0, 0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (pyraclostrobin); 0, 1, 2.5, 5, 7.5, 10, 25, 50, 75 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (tiofanato-metil); 0, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5, 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (difenoconazol); 0, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (captan). Discos de PDA (5 mm de diámetro) obtenidos del borde de colonias de 6 días de edad se transfirieron al centro de cada una de las cajas de PDA amenizada con fungicida. Todas las cajas se colocaron en una incubadora a 28 °C y en oscuridad continua durante 7 días. Tres repeticiones de cada aislado se usaron para evaluar cada fungicida y el control. El crecimiento radial medio de cada una de las colonias se determinó mediante la obtención de dos medidas perpendiculares. La prueba completa de sensibilidad para cada fungicida se realizó dos veces.

Análisis estadístico

La CE_{50} (concentración efectiva que inhibe el 50 % del crecimiento micelial) se calculó siguiendo la metodología reportada por Wong and Wilcox (2001). Para lo cual, el porcentaje del crecimiento relativo (CR) se determinó como (crecimiento radial en la concentración del fungicida / crecimiento radial en la caja sin fungicida) x 100. Para cada fungicida, se usó una regresión lineal para determinar la relación entre el crecimiento micelial radial y la concentración del fungicida usando PROC REG (SAS 9.1; SAS Institute, Cary, NC). Las concentraciones evaluadas para cada fungicida se transformaron a log. La CE_{50} se calculó para aislados individuales mediante una regresión lineal del crecimiento micelial radial versus la transformación \log_{10} de las concentraciones del

fungicida. Los valores de CE_{50} se analizaron usando el procedimiento del modelo lineal general (PROC GLM) en SAS. Las medias se compararon usando la prueba de Tukey ($P > 0.05$).

4.3 Resultados y discusión

El análisis de varianza indicó diferencia significativa ($P \leq 0.05$) entre sensibilidad a fungicidas, mostrando que los fungicidas sistémicos difenoconazol, pyraclostrobin y tiofanato-metil presentaron los valores de CE_{50} más bajos en comparación con el fungicida captan (Cuadro 1). Sin embargo, no hubo diferencia significativa ($P > 0.05$) en cuanto a los valores de CE_{50} de los 10 aislados de *Fusarium* spp. evaluados (Cuadro 2).

Cuadro 4.1. Media de CE_{50} para cada fungicida probado para inhibición del crecimiento micelial in vitro de aislados de *Fusarium* spp. obtenidos de mazorcas de maíz con síntomas de pudrición en campos de los valles altos de México.

Fungicida	CE_{50}
Captan	89.123 a*
Tiofanato-metil	7.058 b
Pyraclostrobin	0.524 b
Difenoconazol	0.083 b

*Medias seguidas por la misma letra, no difieren significativamente según la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

Cuadro 4.2. Efecto de los fungicidas difenoconazol, pyraclostrobin, tiofanato-metil y captan sobre el crecimiento micelial *in vitro* de aislados de *Fusarium* spp. obtenidos de mazorcas de maíz con síntomas de pudrición en campos de los valles altos de México.

Aislado	Especie	CE ₅₀ (µg i.a. mL ⁻¹)			
		Difenoconazol	Pyraclostrobin	Tiofanato-metil	Captan
F31	<i>F. subglutinans</i>	0.125	0.573	7.598	105.294
F36	<i>F. subglutinans</i>	0.077	0.405	7.957	99.534
F38	<i>F. subglutinans</i>	0.073	0.113	4.221	56.867
F32	<i>F. verticillioides</i>	0.068	0.940	6.744	81.296
F39	<i>F. verticillioides</i>	0.023	0.230	5.560	60.751
F44	<i>F. verticillioides</i>	0.082	0.208	6.989	82.971
F35	<i>F. proliferatum</i>	0.019	0.027	10.437	53.253
F45	<i>F. proliferatum</i>	0.155	2.028	7.006	88.615
F47	<i>F. proliferatum</i>	0.085	0.435	7.359	155.743
F27	<i>F. poae</i>	0.121	0.279	6.699	106.905

CE₅₀ = concentración efectiva que inhibe el 50 % del crecimiento micelial.

Sensibilidad a difenoconazol

En este estudio, difenoconazol (fungicida DMI) mostró ser el ingrediente activo más efectivo en inhibir el crecimiento micelial de los 10 aislados de *Fusarium* spp. (Figura 1), ya que los valores de CE₅₀ variaron entre 0.0196 a 0.1553 µg mL⁻¹ (media = 0.083 µg mL⁻¹, desviación estándar = 0.42). Nuestros valores de CE₅₀ fueron más bajos en comparación con los valores registrados por Rekanović et al. (2010) para el caso del efecto de este mismo fungicida en aislados de *F. graminearum* obtenidos de trigo, en donde los valores de CE₅₀ variaron de 0.49 a 1.44 µg mL⁻¹. Por su parte, Chen et al. (2012) también reportaron valores más altos de CE₅₀ comparados con este estudio para el caso de inhibición del crecimiento micelial por epoxiconazol (fungicida DMI) en aislados *F. asiaticum* y *F. graminearum*, con valores de CE₅₀ de 0.12 a 0.95 y de 0.16 a 0.93 µg mL⁻¹, respectivamente.

Los resultados de sensibilidad de este estudio indicaron que los aislados de *Fusarium* spp. asociados a pudrición de mazorca de maíz en los valles altos presentan alta sensibilidad al fungicida difenoconazol, por lo que este fungicida puede ser una opción muy viable para el tratamiento de semillas de maíz, tal y como lo indicaron Munkvold and O'Mara (2002), quienes reportaron que el difenoconazol es un fungicida de acción sistémica muy efectivo para prevenir la colonización de *F. verticillioides*, *F. subglutinans* y *F. proliferatum* en semillas de maíz, además de que este fungicida mejora la emergencia, longitud de raíz y peso seco en comparación con semillas infestadas que no son tratadas con este ingrediente activo.

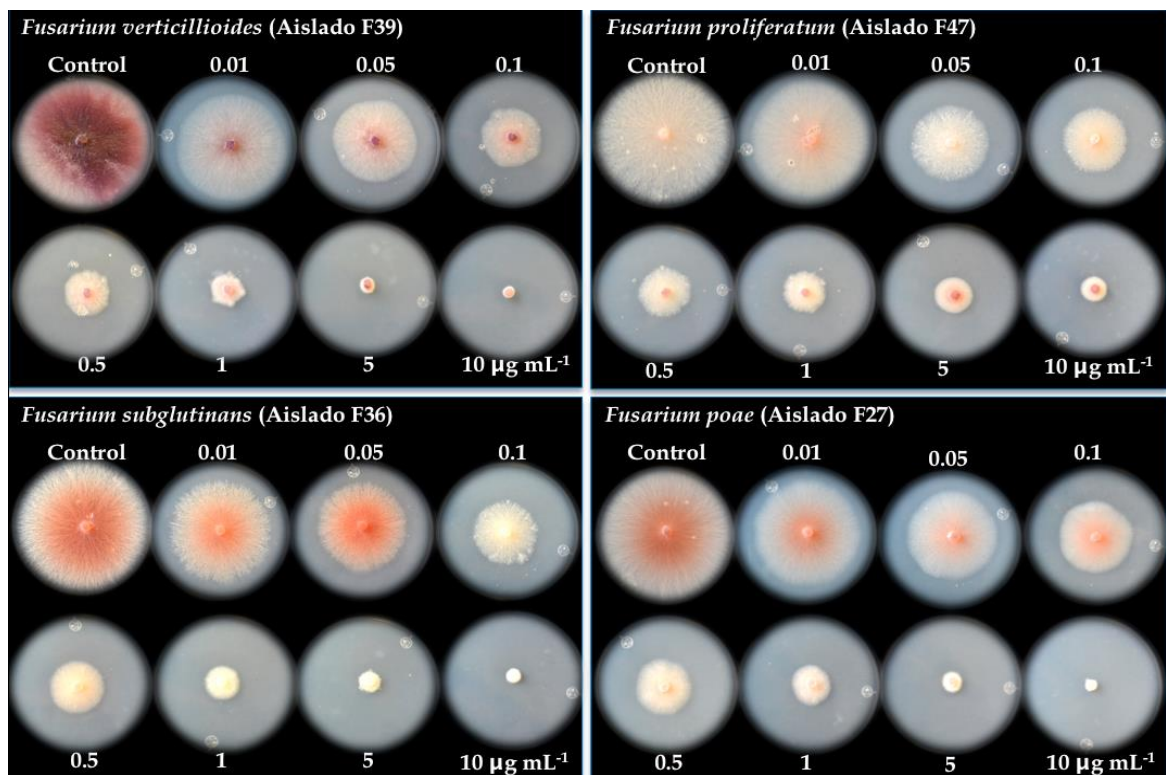


Figura 4.1. Efecto del fungicida difenoconazol sobre el crecimiento micelial *in vitro* de aislados de *Fusarium* spp. obtenidos de mazorcas de maíz con síntomas de pudrición en campos de los valles altos de México.

Sensibilidad a pyraclostrobin

En el caso del pyraclostrobin (fungicida QoI), los valores de CE_{50} calculados de la prueba de sensibilidad *in vitro* (Figura 2) variaron entre 0.027 a 1.940 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (media = 0.524 $\mu\text{g mL}^{-1}$, desviación estándar = 0.589). Estos resultados fueron más altos en comparación con los resultados reportados por Chen et al. (2012) para el caso de 126 aislados de *F. asiaticum* y 63 aislados de *F. graminearum* obtenidos de trigo y sometidos a prueba de inhibición de crecimiento micelial con este mismo fungicida, en donde reportaron valores de $CE_{50} = 0.012$ a 0.135 y 0.010 a 0.105 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente.

El uso de tratamientos a semillas con productos pertenecientes al grupo de las strobirulinas (fungicidas QoI) representa un gran avance, no solo para el control de hongos fitopatógenos presentes en semillas, sino además este tipo de fungicidas proveen condiciones favorables para que las semillas expresen su potencial fisiológico tal y como ha sido mencionado por Machado de Matos et al. (2013). De acuerdo con Köhle et al. (2001) y Venancio et al. (2003), estos fungicidas mejoran la absorción de nitrógeno y carbono por la planta, retrasa la senescencia y aumentan la actividad fotosintética.

Por otra parte, Dubos et al. (2011) reportaron que 55 aislados de *F. graminearum* provenientes campos de trigo de Canadá, Bélgica, Alemania, Luxemburgo y EE.UU. presentaron resistencia natural al fungicida trifloxystrobin en ensayos *in vitro* realizados usando la prueba de cultivo líquido. Sin embargo, estos autores utilizaron una diferente técnica de evaluación de la sensibilidad, además de que no utilizaron SHAM para minimizar los efectos de la ruta oxidativa alterna, lo cual puede explicar los niveles de sensibilidad reportados.

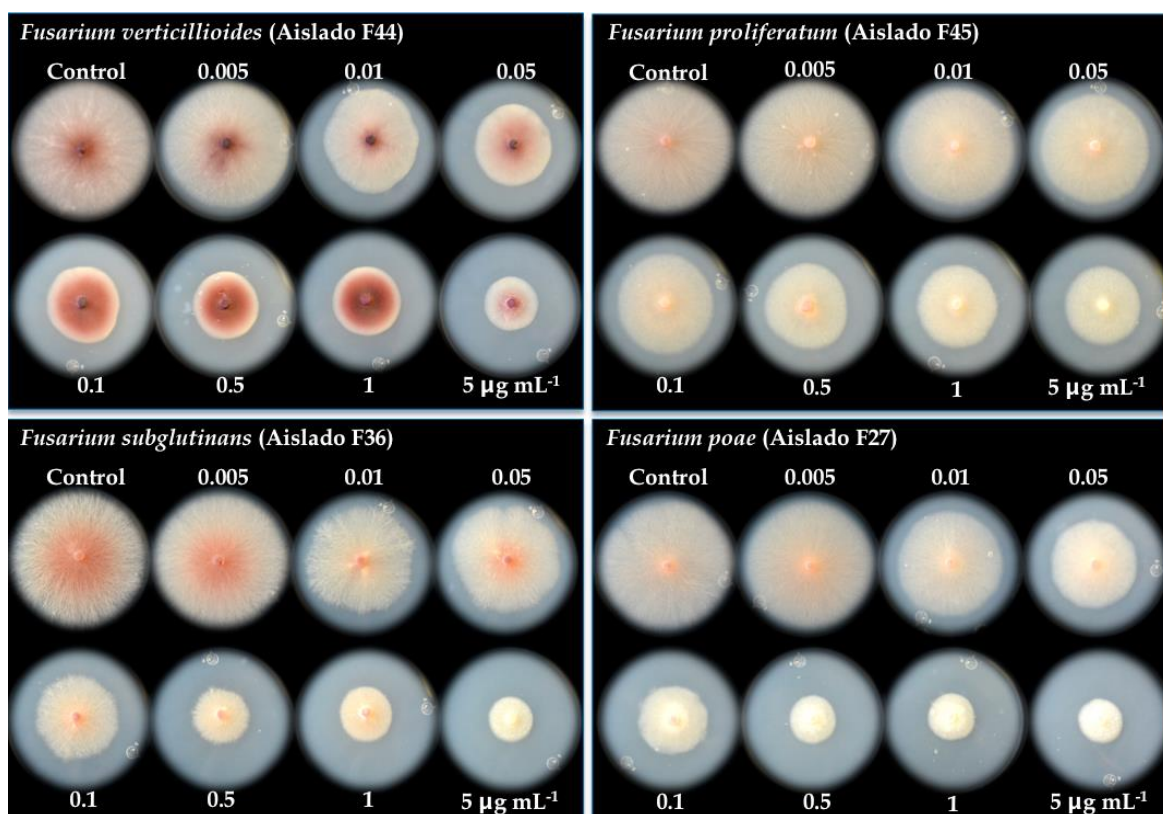


Figura 4.2. Efecto del fungicida pyraclostrobin + Acido salicilhidroxamico sobre el crecimiento micelial *in vitro* de aislados de *Fusarium* spp. obtenidos de mazorcas de maíz con síntomas de pudrición en campos de los valles altos de México.

Sensibilidad a tiofanato-metil

Los valores de CE_{50} para tiofanato-metil (fungicida MBC) que se determinaron en este estudio variaron de 4.221 a 10.437 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (media = 7.057 $\mu\text{g mL}^{-1}$, desviación estándar = 1.603). Lo cual fue un rango de valores más bajo en comparación con los reportados por Rekanović et al. (2010), quienes calcularon valores de CE_{50} de 12.1 a 64.03 $\mu\text{g mL}^{-1}$ en ocho aislados de *F. graminearum* sometidos a prueba de inhibición del crecimiento micelial para este mismo fungicida. Sin embargo, en un estudio de sensibilidad a carbendazim (fungicida MBC) realizado por Ivić et al. (2011), se obtuvieron valores de CE_{50} más bajos, los cuales variaron entre 0.47 a 1.41 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para el caso de aislados de *F. verticillioides*, *F. graminearum* y *F. avenaceum* colectados en campos de trigo.

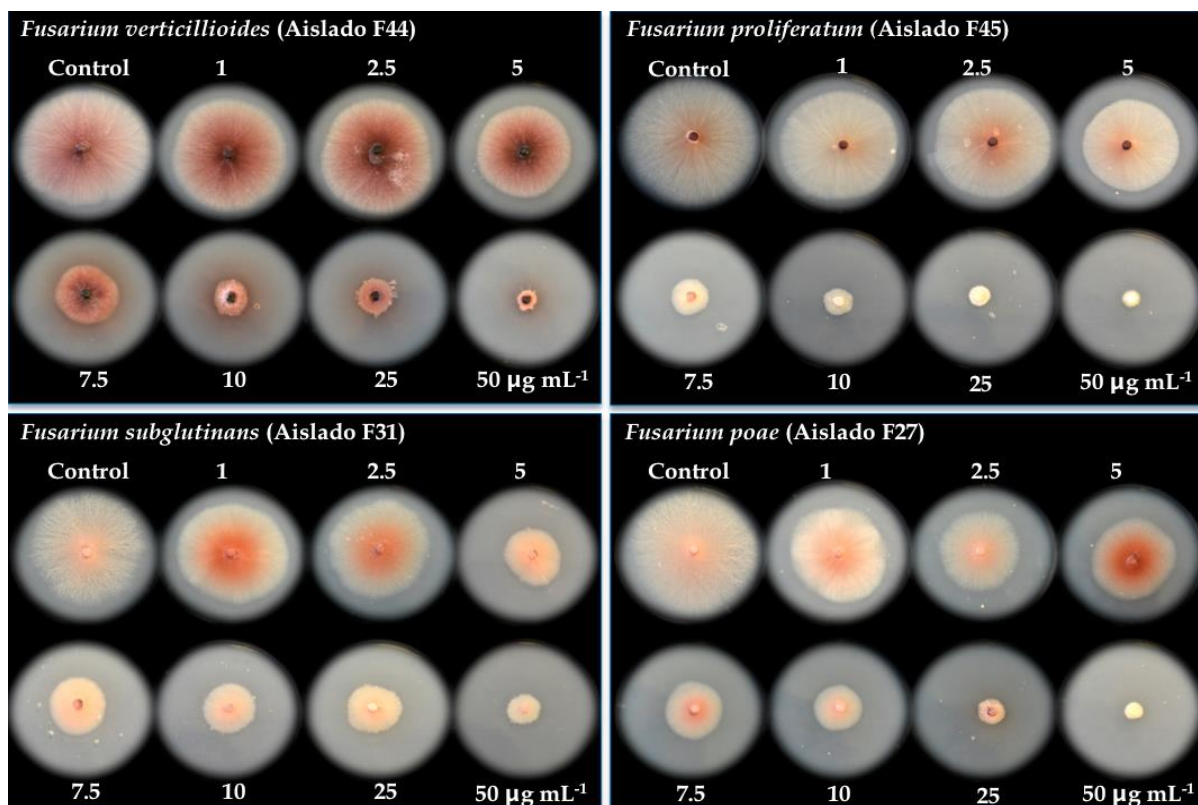


Figura 4.3. Efecto del fungicida tiofanato-metil sobre el crecimiento micelial *in vitro* de aislados de *Fusarium* spp. obtenidos de mazorcas de maíz con síntomas de pudrición en campos de los valles altos de México.

Sensibilidad a captan

Nuestros resultados de EC_{50} para el fungicida captan, señalaron valores entre 53.253-155.743 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (media = 89.123 $\mu\text{g mL}^{-1}$, desviación estándar = 30.470), los cuales fueron significativamente más altos en comparación con los tres fungicidas sistémicos evaluados. Lo anterior coincide con Munkvold and O'Mara, (2002) quienes documentaron que el captan presentó menor eficacia de acuerdo a diversas variables como % de germinación, longitud de raíz y peso seco de raíz en comparación con tratamientos a semillas de maíz con fungicidas MBC, DMI y Fenilpirroles.

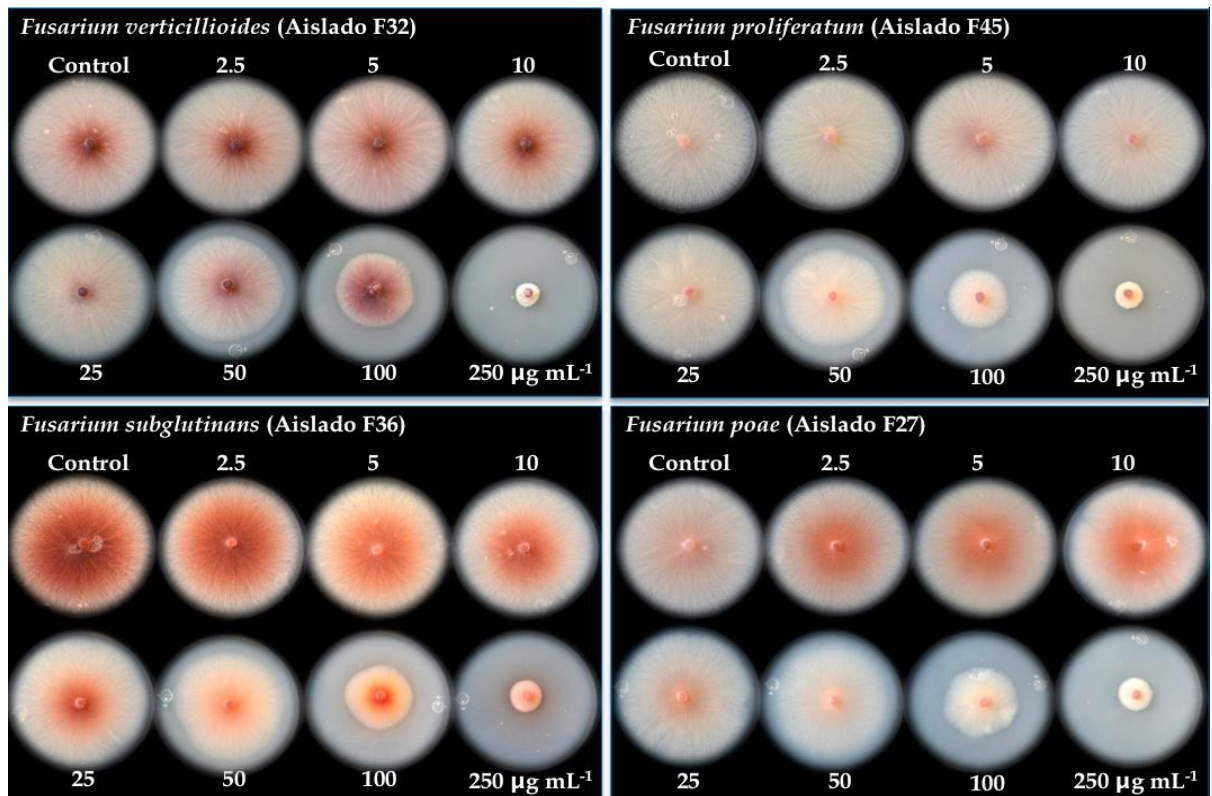


Figura 4.4. Efecto del fungicida captan sobre el crecimiento micelial *in vitro* de aislados de *Fusarium* spp. obtenidos de mazorcas de maíz con síntomas de pudrición en campos de los valles altos de México.

4.4 Literatura citada

- Agarwal, V. K., and Sinclair, J. B. 1997. Principles of Seed Pathology, 2nd ed. CRC Press, Inc., Lewis Publishers, Boca Ratón, FL. USA.
- Aveling, T. A. S., Govender, V., Kandolo, D. S. and Q. Kritzing. 2012. The effects of treatments with selected pesticides on viability and vigour of maize (*Zea mays*) seeds and seedling emergence in the presence of *Fusarium graminearum*. Journal of Agricultural Science 1-8.
- Chen, Y., Zhang, A. F., Gao, T. C., Zhang, Y., Wang, W. X., Ding, K. J., Chen, L., Sun, Z., Fang, X. Z., and Zhou, M. G. 2012. Integrated use of pyraclostrobin and epoxiconazole for the control of Fusarium head blight of wheat in Anhui Province of China. Plant Disease 96:1495-1500.
- Cotten, T. K., and Munkvold, G. P. 1998. Survival of *Fusarium moniliforme*, *F. proliferatum*, and *F. subglutinans* in maize stalk residue. Phytopathology 88:550-555.
- Dodd, J. L., and White, D. G. 1999. Seed rot, seedling blight, and damping-off. Pages 10-11 in: Compendium of Corn Diseases, 3rd ed. D. G. White, ed. The American Phytopathological Society, St. Paul, MN.
- Dubos, T., Pasquali, M., Pogoda, F., Hoffmann, L. and Beyer, M. 2011. Evidence for natural resistance towards trifloxystrobin in *Fusarium graminearum*. European Journal of Plant Pathology 130: 239–248.
- Ivić, D., Sever, Z. and Kuzmanovska, B. 2011. *In vitro* sensitivity of *Fusarium graminearum*, *F. avenaceum* and *F. verticillioides* to carbendazim, tebuconazole, flutriafol, metconazole and prochloraz. Pestic. Phytomed. 26(1): 35-42.

- Köhle, H., Grossmann, K., Jabs, T., Gerhard, M., Kaiser, W., Glaab, J., Conrath, U., Seehaus, K. and Herms, S. 2001. Physiological effects of the strobilurin fungicide F 500 on plants.
- Denhe, H. W., Gisi, U., Kuck. K. H., Russel, P. E. and Lyr, H. (eds.) *In: Modern Fungicides and Antifungal Compounds III: Thuringia, Germany.*
- Lasca, C. C., Vechiato, M. H., Fantin, G. M. and E.Y. Kohara. 2005. Efeito do tratamento químico de sementes de milho sobre a emergência e a produção. *Arq. Inst. Biol.* 72(4): 461-468.
- Machado, J. C., Walqui, J. M., Santos, J. P., Reichenbach, J. W. 2006. Tratamento de sementes no controle de fitopatógenos e pragas. *Informe Agropecuário* 27(232): 76-87.
- Machado de Matos, C. S., Barrocas, E. N., Machado, J. C., Alves, F.C. 2013. Health and physiological quality of corn seeds treated with fungicides and assessed during storage. *Journal of Seed Science* 35(1): 10-16.
- McGee, D. C. 1995. Epidemiological approach to disease management through seed technology. *Annual Review of Phytopathology* 33: 445-466.
- Munkvold, G. P., and Shriver, J. M. 2000. Evaluation of seed treatment fungicides for corn, 1999. *Fungicide and Nematicide Tests* 55:432.
- Munkvold, G. P., and O'Mara, J. K. 2002. Laboratory and growth chamber evaluation of fungicidal seed treatments for maize seedling blight caused by *Fusarium* species. *Plant Disease* 86:143- 150.
- Olaya, G., and Köller, W. 1999. Diversity of kresoxim-methyl sensitivities in baseline populations of *Venturia inaequalis*. *Pesticide Science* 55:1083-1088.

- Ramos, N. P., Filho, J. M. and Galli, J. A. 2008. Fungicide treatment of super sweet corn seeds. *Revista Brasileira de Sementes* 30(1): 24-31.
- Rekanović, E., Mihajlović, M. and I. Potočnik. 2010. In vitro sensitivity of *Fusarium graminearum* (Schwabe) to difenoconazole, prothioconazole and thiophanate-methyl. *Pestic. Phytomed* 25(4): 325–333.
- SIAP. 2012. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Consultada en www.siap.gob.mx. el 25 febrero de 2014.
- Venancio, W. S., Rodrigues, M. A. T., Begliomini, E. and Souza, N. L. 2003. Physiological effects of strobilurin fungicides on plants. *Ciência Agrícola Engenharia* 9(3): 59-68.
- Wong, F. P. and Wilcox, W. F. 2001. Comparative physical modes of action of azoxystrobin, mancozeb, and methalaxyl against *Plasmopara viticola* (grapevine downy mildew). *Plant Disease* 85: 649-656.

CAPITULO V. CONCLUSIONES GENERALES

1. De acuerdo al análisis filogenético, se encontró que *Fusarium verticillioides*, *F. proliferatum*, *F. subglutinans* y *F. poae* son las especies que se encuentran asociadas a la pudrición de mazorcas de maíz en los Valles Altos de México.
2. *Fusarium proliferatum* y *F. subglutinans* fueron las especies que presentaron el mayor porcentaje de frecuencia con un 26 y 14 %, respectivamente.
3. *F. proliferatum* es la especie que se encontró con más frecuencia en los 81 aislamientos, esto nos indica que dentro del complejo *Gibberella fujikuro*, es la especie que más se ha adaptado a las condiciones climáticas de la región de Valles Altos de México.
4. Difenconazol y pyraclostrobin presentaron los valores de CE₅₀ más bajos, los cuales variaron de 0.019 a 0.155 y de 0.027 a 1.940 µg mL⁻¹, respectivamente. Para tiofanato-metil los valores de CE₅₀ variaron de 4.221 a 10.437 µg mL⁻¹. Mientras que, el fungicida de contacto captan mostró los valores de CE₅₀ más altos, los cuales variaron de 53.253 a 155.743 µg mL⁻¹.
5. Por otra parte, no se detectó diferencia significativa en cuanto a la sensibilidad a fungicidas que presentó cada una de las cuatro especies de *Fusarium*.