



**COLEGIO DE POSTGRADUADOS**

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

**CAMPUS MONTECILLO**

**POSTGRADO EN RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD**

**GANADERÍA**

**SANIDAD DE SEMILLA  
COMERCIAL DE *Bouteloua  
curtipendula* (Mixch.) Torr.**

**ALICIA ZÁRATE RAMOS**

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

**MAESTRA EN CIENCIAS**

**MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO**

**2019**

## **CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y DE LAS REGALIAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACION**

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, la que suscribe **Alicia Zárate Ramos** Alumna de esta Institución, estoy de acuerdo en ser partícipe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta institución, bajo la dirección del Profesor **Dra. Leonor Miranda Jiménez**, por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis **Sanidad de semilla comercial de *Bouteloua curtipendula* (Mixch.) Torr**

y de los productos de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos industriales que se puedan derivar serán registrados a nombre del Colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la Institución, el Consejero o Director de Tesis y el que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta Institución.

Montecillo, Mpio. de Texcoco, Edo. de México, a 29 de julio de 2019

Firma



**Alicia Zárate Ramos**

Vo. Bo.

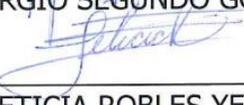


**Dra. Leonor Miranda Jiménez**  
Consejera

La presente tesis titulada: “**Sanidad de semilla comercial de *Bouteloua curtipendula* (Mixch.) Torr.**” realizada por la alumna: **Alicia Zárate Ramos** bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS  
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD  
GANADERÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERA	 _____ DRA. LEONOR MIRANDA JIMÉNEZ
ASESOR	 _____ DR. SERGIO SEGUNDO GONZÁLEZ MUÑOZ
ASESORA	 _____ DRA. LETICIA ROBLES YERENA

Montecillo, Texcoco, Estado de México, agosto de 2019

## SANIDAD DE SEMILLA COMERCIAL DE *Bouteloua curtipendula* (Mixch.) Torr.

Alicia Zárate Ramos, M. en C.  
Colegio de Postgraduados, 2019

### RESUMEN

La condición sanitaria de las semillas influye directamente los parámetros de calidad. Las semillas son el principal medio de diseminación, del inóculo primario de patógenos a nuevas áreas agrícolas y ganaderas. En el presente trabajo se identificaron hongos patógenos asociados a semilla comercial de *Bouteloua curtipendula* (Mixch.) Torr.: NdeM-La Zarca, NdeM-303, NdeM-5, NdeM-Zenith y NdeM-La resolana; cosechadas en otoño 2017 en el Valle del Mezquital, Hidalgo. Los aislamientos fúngicos se obtuvieron de tres tipos de propágulo: espiguillas (cariópside + brácteas accesorias; M<sub>1</sub>), cariópside con lemas (M<sub>2</sub>) y cariópside limpios (M<sub>3</sub>). Se obtuvieron 51 aislamientos que se identificaron cultural, morfológica y molecularmente. Adicionalmente, se realizaron pruebas de sensibilidad con siete fungicidas comerciales: Captan, Mancozeb, Benomilo, Procloraz, Tiabendazol, Tiofanato metílico y *Bacillus subtilis* a diferentes concentraciones contra tres aislamientos que presentaron mayor velocidad de crecimiento.

En la caracterización morfológica y molecular de los aislados se identificó a *Alternaria alternata* y *Alternaria tenuissima* en 67 % de las muestras, *Fusarium srcipi* y *Fusarium incarnatum* en el 24 % y *Bipolaris cynodontis* en el 9 %; a la fecha ninguna de estas especies ha sido reportada en México, para *B. curtipendula*. Se conoce que estas especies son causantes de enfermedades en forrajes y gramíneas; con capacidad de formar complejos entre sí aumentando el potencial de daño. También producen toxinas que enferman al ganado. En la prueba de sensibilidad a fungicidas: la comparación de medias estimó que *Bacillus subtilis* presentó efectividad del 97 %, Tiofanato 96 %, Procloraz 94 %, Captan 93 %, Mancozeb 92 %, los fungicidas de menor efectividad fueron

Benomilo 46 % y Tiabendazol 37% para inhibir el crecimiento micelial de *Alternaria alternata*, *Bipolaris cynodontis* y *Fusarium incarnatum*. La dosis efectiva (DE<sub>50</sub>) que inhibe el del 50 % crecimiento micelial del hongo fue; Captan de 16.48 a 66.15 mg L<sup>-1</sup>, Mancozeb de 4.4 a 36 mg L<sup>-1</sup>, Benomilo de 14.13 a >100 mg L<sup>-1</sup>, Procloraz de 0.004-0.018 mg L<sup>-1</sup>, Tiabendazol de 2.66 a >5 mg L<sup>-1</sup>, Tiofanato metílico de 0.27 a 0.77 mg L<sup>-1</sup> y *Bacillus subtilis* de 0.00014 a 0.00022 mg L<sup>-1</sup>.

**Palabras claves:** *Alternaria alternata*, *Bipolaris cynodontis*, *Fusarium incarnatum*, Identificación, fungicidas.

## SANIDAD DE SEMILLA COMERCIAL DE *Bouteloua curtipendula* (Mixch.) Torr.

Alicia Zárate Ramos, M. en C.  
Colegio de Postgraduados, 2019

### ABSTRACT

The sanitary condition of the seeds directly influences the quality parameters. Seeds are the main means of dissemination, of the primary inoculum of pathogens and new agricultural and livestock areas. In the present work, pathogenic fungi associated with commercial seed of *Bouteloua curtipendula* (Mixch.) Torr. were identified: NdeM-La Zarca, NdeM-303, NdeM-5, NdeM-Zenith and NdeM-La resolana; harvested in autumn 2017 in the Mezquital Valle, Hidalgo. The fungal isolates were obtained from three types of propagules: spikelets (karyotid + accessory bracts; M1), karyotid with slogans (M2) and clean karyotid (M3). 51 isolates were obtained that were identified culturally, morphologically and molecularly. In addition, these are sensitivity tests with seven commercial fungicides: Captan, Mancozeb, Benomilo, Prochloraz, Thiabendazole, Methyl Thiophanate and *Bacillus subtilis* at different differences against three isolates that have a higher growth rate.

In the morphological and molecular characterization of the signs, *Alternaria alternata* and *Alternaria tenuissima* were identified in 67% of the samples, *Fusarium scirpi* and *Fusarium incarnatum* in 24% and *Bipolaris cynodontis* in 9%; to date none of these species has been reported in Mexico, for *B. curtipendula*. It is known that these species are causing diseases in forages and grasses; with the ability to complex each other, the potential for harm. We also produce toxins that make cattle sick. In the fungicide sensitivity test: the comparison of estimated means that *Bacillus subtilis* showed the evolution of 97 %, Thiophanate 96 %, Prochloraz 94 %, Captan 93 %, Mancozeb 92 %, the fungicides with the lowest effectiveness were Benomilo 46 % and

Thiabendazole 37 % to inhibit the mycelial growth of *Alternaria alternata*, *Bipolaris cynodontis* and *Fusarium incarnatum*. The effective dose (IC50) that inhibits the 50% fungal mycelial growth was; Captan from 16.48 to 66.15 mg L<sup>-1</sup>, Mancozeb from 4.4 to 36 mg L<sup>-1</sup>, Benomyl from 14.13 to > 100 mg L<sup>-1</sup>, Prochloraz from 0.004-0.018 mg L<sup>-1</sup>, Thiabendazole from 2.66 to > 5 mg L<sup>-1</sup>, Methyl thiophanate 0.27 to 0.77 mg L<sup>-1</sup> and Bacillus subtilis 0.00014 to 0.00022 mg L<sup>-1</sup>.

**Key words:** *Alternaria alternata*, *Bipolaris cynodontis*, *Fusarium incarnatum*, morphological identification, sensitivity test.

## **DEDICATORIA**

A Dios por todo lo creado, del cual tengo alegría en disfrutar.

A mis hijas María Inés y Diana que fueron en estos dos años mi motivo para iniciar, continuar y concluir este proyecto.

A mi esposo Miguel Fuentes Benhumea por su amor, apoyo incondicional comprensión y palabras de aliento que me animaron siempre para seguir adelante.

A mis padres Conchita y Felipe por inculcar en mí el deseo de aprender, para contribuir a mi desarrollo personal y el de mi nación.

A mi familia, hermanos y suegros que con su labor en el campo contribuyen al sustento alimentario de este país.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y el colegio de Postgraduados, por la beca otorgada y el financiamiento del proyecto de Investigación desarrollado durante mi formación profesional como Maestra en Ciencias.

A los integrantes del Comité Académico: Dra. Leonor Miranda Jiménez, Dr. Adrián Quero Carrillo, Dra. Leticia Robles Yerena y Dr. Sergio González Muñoz por el conocimiento, esfuerzo, dedicación, tiempo y apoyo que me brindaron para el desarrollo y conclusión de esta investigación.

A los Doctores Leonor Miranda Jiménez y Adrián Quero Carrillo por el apoyo, conocimientos consejos, comprensión y amistad brindados incondicionalmente durante mi estancia en el Colegio de Postgraduados y que fueron decisivos para mi formación profesional.

A la Dra. Leticia Robles Yerena por su admirable entusiasmo, disposición y dedicación con la que compartió sus conocimientos mismo que fueron fundamentales para esta investigación.

Al Dr. Cristian Nava Díaz por su disposición en compartir su laboratorio, así como sus conocimientos y experiencia para realizar y desarrollar esta investigación.

A Eridani García y Edith Luna por su amistad apoyo conocimientos, consejos y experiencia compartidos en estos dos años en el Colegio.

A Irais y la señora Anita por su apoyo, paciencia orientación y gran disposición en resolver eficientemente cuestiones administrativas derivadas de mi estancia y formación en el Colegio.

A todos mis profesores de curso que con su conocimiento y experiencia ayudaron a enriquecer esta investigación.

A todos mis compañeros de clase en los diversos cursos, y de todos aquellos con los que coincidí por los laboratorios, salones, oficinas, invernaderos y pasillos del Colegio y que compartimos horas de angustia y alegría, palabras de aliento y experiencias que me enriquecieron profesional y personalmente.

## CONTENIDO

	PÁGINA
RESUMEN.....	iv
ABSTRACT.....	vi
DEDICATORIA.....	viii
AGRADECIMIENTOS.....	ix
LISTA DE CUADROS.....	xii
CAPITULO I.....	¡Error! Marcador no definido.
CAPÍTULO II.....	xii
LISTA DE FIGURAS.....	xiii
CAPÍTULO I.....	xiii
CAPITULO II.....	xiii
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	14
OBJETIVOS GENERALES.....	16
OBJETIVOS PARTICULARES.....	16
LITERATURA CITADA.....	17
<b>CAPÍTULO I. CARACTERIZACIÓN DE HONGOS ASOCIADOS EN SEMILLA COMERCIAL DE GENOTIPOS DE <i>Bouteloua curtipendula</i></b> .....	20
<b>1.1 RESUMEN</b> .....	20
<b>1.2 ABSTRACT</b> .....	21
<b>1.3 INTRODUCCIÓN</b> .....	22
<b>1.4 MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	23
1.4.1 Aislamiento y purificación de los hongos.....	23
1.4.2 Identificación morfológica.....	24
1.4.3 Identificación molecular.....	25
<b>1.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	26
1.5.1 Incidencia.....	26
1.5.2 Identificación morfológica.....	27
1.5.3 Identificación y filogenia molecular.....	31
<b>1.6 CONCLUSIONES</b> .....	33
<b>1.7 LITERATURA CITADA</b> .....	33
<b>CAPÍTULO II. PRUEBAS DE SENSIBILIDAD CON FUNGICIDAS COMERCIALES CONTRA PATOGENOS AISLADOS DE LA SEMILLAS DE PASTO BANDERITA</b> .....	39

<b>2.1 RESUMEN</b> .....	39
<b>2.2 ABSTRACT</b> .....	40
<b>2.3 INTRODUCCIÓN</b> .....	41
<b>2.4 MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	43
2.4.1 Aislados utilizados .....	43
2.4.2 Fungicidas .....	44
2.4.3 Preparación del medio de cultivo con fungicidas .....	44
2.4.4 Análisis de datos para la prueba de sensibilidad.....	45
<b>2.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	45
2.5.1. Respuesta a Captán .....	46
2.5.2 Respuesta a Mancozeb.....	46
2.5.3 Respuesta a Benomilo .....	47
2.5.4 Respuesta a Procloraz.....	47
2.5.5 Respuesta al Tiabendazol .....	48
2.5.6 Respuesta al Tiofanato metílico.....	48
2.5.7 Respuesta a <i>Bacillus subtilis</i> .....	49
<b>2.6 CONCLUSIONES</b> .....	53
<b>2.7 LITERATURA CITADA</b> .....	54
<b>CONCLUSIONES GENERALES</b> .....	57

## LISTA DE CUADROS

### CAPÍTULO II

Cuadro 2. 1. Fungicidas y concentración del ingrediente activo para prueba de sensibilidad .....	44
Cuadro 2. 2. Efectividad de los fungicidas, prueba <i>in vitro</i> de sensibilidad de <i>Alternaria alternata</i> , <i>Bipolaris cynodontis</i> y <i>Fusarium incarnatum</i> aislados de semilla comercial de pasto Banderita <i>Bouteloua curtipendula</i> .....	49
Cuadro 2. 3 Comparación de medias de la máxima efectividad por fungicida en la inhibición del crecimiento micelial de <i>Alternaria alternata</i> , <i>Bipolaris cynodontis</i> y <i>Fusarium incarnatum</i> aislados de semilla comercial de pasto Banderita <i>Bouteloua curtipendula</i> .....	50
Cuadro 2. 4. Dosis que inhibe el 50 % del crecimiento micelial .....	51

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO I

- Figura 1.1. Frecuencia de *Alternaria*, *Bipolaris* y *Fusarium* aislados de cinco variedades comerciales de pasto Banderita (*Bouteloua curtipendula*) a partir de espiguillas (M1), cariósides con lemas (M2) y cariósides limpios (M3). ..... 27
- Figura 1.2. Aislamientos obtenidos de semilla comercial de pasto Banderita. Morfología de aislados. A-C) *Alternaria tenuissima*, A) Colonia en PCA, B) Conidios, C) Cadena de conidios. D-F) *Alternaria alternata*, D) Colonia en PCA, E) Conidios, F) Cadena de conidios. G-I) *Bipolaris cynodontis*, G) Colonia en PDA, H) Conidios, I) Conidióforo. Fotografías tomadas con microscopía de contraste con objetivo (40x). ..... 29
- Figura 1. 3 Aislamientos obtenidos de semilla del pasto Banderita procedente del Valle del Mezquital, Hidalgo. Morfología de aislados. A-C) *Fusarium scirpi*, A) Colonia en PDA, B) Macroconidios, C) Esporodoquio. D-F) *Fusarium incarnatum*, D) Colonia en PDA, E) Micro y Mesoconidios, F) Fiálides. Fotografías tomadas con microscopía de contraste con objetivo (40x). ..... 31
- Figura 1. 4 Análisis filogenético de los aislados de *Alternaria*, *Bipolaris* y *Fusarium* de la semilla del pasto Banderita procedentes del Valle del Mezquital, Hidalgo. .... 32

### CAPITULO II

- Figura 2. 1 Gráficas dosis - inhibición de los fungicidas contra *Alternaria alternata*, *Bipolaris cynodontis* y *Fusarium incarnatum* aislados de semilla comercial del pasto Banderita. Graficas obtenidas con el programa Graphad Prism 8.2. .... 52

## INTRODUCCIÓN GENERAL

El 65% de los pastizales nativos de la región centro y norte de México presentan erosión y desaparición de especies forrajeras de importancia ganadera (Gauthier *et al.*, 2003), debido al sobrepastoreo y la invasión de especies exóticas (Valerio *et al.*, 2005). La reproducción y establecimiento de praderas con especies forrajeras nativas, aseguran la alimentación del ganado en épocas críticas (Do Valle, 2001), así como la diversidad de flora y fauna.

El pasto Banderita *Bouteloua curtipendula* (Michx.) Torr., es una especie de regiones áridas y semiáridas, presente en planicies y lomeríos rocosos, se adapta a diversos suelos y adversas condiciones climáticas, tiene resistencia a sequía (Willard y Schuster, 1971). Su distribución en América abarca del centro-norte de México hasta Canadá (Rzedowki y Rzedowki 2001). Es una planta C<sub>4</sub> perenne, amacollada y se reproduce apomícticamente, su centro de origen ésta en México (Quero *et al.*, 2010).

La altura de planta varía de 50 a 80 cm de altura, produce de 30-50 espigas de 1 a 2 cm de largo, pendulosas y arregladas en un solo lado del raquis, de 15 a 25 cm de largo; de 5 a 8 espiguillas de 6 a 10 mm de largo, lemma fértil acutada, mucronulada y lóbulos intermedios subacutados (Gould y Kapadia, 1964). Las anteras son fértiles, de color rojo brillante y estigmas de color blanco y plumosos. El periodo de floración, condicionado por la humedad, ocurre de verano a otoño. Cada lemma fértil tiene un solo grano. El sistema radical tiene raíces fibrosas y rizomas cortos. Esta especie se encuentra en praderas de montaña y pastizales abiertos (Chadwick, 2003). Tiene potencial productivo, alta digestibilidad (Morales *et al.*, 2008, Quero *et al.*, 2017; Quero *et al.*, 2018) tolera frío e inundaciones moderadas.

El establecimiento de praderas y pastizales requiere preparación adecuada del suelo y semillas de buena calidad. Un lote de semilla comercial debe cumplir cuatro aspectos de calidad; genética, física, fisiológica y sanitaria. En México, se observado que semillas importadas y nacionales no cubren los requisitos de calidad que garanticen el establecimiento de praderas y pastizales (Quero *et al.*, 2014).

La utilización de semilla sana, es el principal recurso para limitar la introducción de patógenos en nuevas áreas, evitando el establecimiento temprano de las enfermedades y apoyando el buen desarrollo del cultivo. Los patógenos se asocian a la semilla como una oportunidad de sobrevivencia. El 90 % de los cultivos pueden sufrir enfermedades causadas por patógenos transmitidos por semilla (Neergaad, 1977), de aquí la importancia de su control. Los patógenos establecen dos tipos de relación con la semilla: infección o infestación (contaminación). Infección implica que el patógeno se localiza internamente, es decir, en tejidos y obteniendo nutrientes de la semilla. Infestación; quiere decir, que está asociado de forma pasiva, como contaminación en la superficie de la semilla, sin establecer relación nutricional o bien, en restos de cosecha mezclados con la semilla. (Sanchez y Trapero, 2003). Los principales patógenos transmitidos por semilla incluyen a los hongos; quienes parasitan partes esenciales para la producción de una nueva planta; o como contaminación, con esporas y micelio, contenidos en restos del cultivo o partículas del suelo. (Arriagada, 2012). La inspección de semillas es una acción preliminar para verificar el estado sanitario de la misma, que permite identificar y localizar condiciones físicas y patógeno e implementar un método de control o tratamiento efectivo contra los patógenos. El tratamiento de semillas con fungicidas; está enfocado en proteger y erradicar hongos que la deterioran y atacan en etapas tempranas del cultivo, cuando la planta es más vulnerable (Hopkins, 2016).

## **OBJETIVOS GENERALES**

- Evaluar la calidad fitosanitaria de cinco variedades comerciales de *Bouteloua curtipendula*: NDM-La Zarca, NDM-303, NDM-5, NDM-Zenith, NDM-La resolana, provenientes de Hidalgo.
- Determinar la(s) especie(s) de patógenos asociados a la semilla comercial de cinco variedades de *Bouteloua curtipendula* mediante identificación morfológica y molecular.
- Determinar la sensibilidad de los patógenos a fungicidas comerciales utilizados para el tratamiento de semillas.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

- 
- Identificar patógenos presentes en el cariósido y brácteas accesorias, mediante características morfológicas, culturales y morfométricas de cultivos monospóricos aislados de las cinco variedades de pasto Banderita.
- Identificar mediante análisis molecular y filogenético los patógenos aislados.
- Estimar valores de sensibilidad de los aislados obtenidos de semilla comercial con los fungicidas comerciales Captan, Mancozeb, Benomilo, Procloraz, Tiofanato metílico y *Bacillus subtilis*.
-

## LITERATURA CITADA

- Arriagada RV. 2012. Semillas. Inspección, análisis, tratamiento y legislación. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA-O.E.A.) 115p. <http://repiica.iica.int/d.cs/bv/agrin/b/f03/XL2000600205.pdf> (consultada, diciembre 2018).
- Chadwick AC. 2003. *Bouteloua cur.* In: Fire Effects Information System. U. S. Department of Agriculture, Forest Service, Rocky Mountain Research Station, Fire Sciences Laboratory. (consulta, agosto 2019) Disponible: <http://www.fs.fed.us/database/feis/plants/graminoid/boucur/all.html>.
- Do Valle CB. 2001. Genetic resources for tropical areas: achievements and perspectives. Proc XIX Int Grassland Cong. São Pedro, São Paulo, Brazil. Brazilian. Soc Bras Zoot 477-482.
- Gauthier DA, Lafon A, Toombs TP, Hoth J y Wiken E. 2003. Grasslands: Toward a North American Conservation Strategy. Canadian Plains Research Center. Montreal, Quebec, Canadá. Commission for Environmental Cooperation. Science Base-Catalog. (consultada, agosto 2019) [https://www.researchgate.net/publication/235663836\\_Grasslands\\_Toward\\_a\\_North\\_American\\_Conservation\\_Strategy\\_English\\_French\\_and\\_Spanish\\_publication](https://www.researchgate.net/publication/235663836_Grasslands_Toward_a_North_American_Conservation_Strategy_English_French_and_Spanish_publication).
- Gould GW y Kapadia ZJ. 1964. Biosystematic studies in the *Bouteloua curtipendula* complex. III. Pollen size as Related to Chromosome Numbers. American Journal of Botany, 51(2): 166-172. Doi: 10.2307/2440101. <https://www.jstor.org/stable/2440101>.
- Hopkins M. 2016. Consideraciones para comenzar bien con tratamiento de semillas. Revista Hortalizas, Publicación mensual-marzo (on line). (consultada, junio 2019) <https://www.hortalizas.com/proteccion-decultivos/tratamiento-de-semillas/>.
- Morales NC, Quero CA, Pérez PJ, Hernández GA y Le BO. 2008. Caracterización morfológica de poblaciones nativas de pasto Banderita [*Bouteloua curtipendula* (Mixch.) Torr.] en México. Agrociencia, 42: 767-775. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1405-31952008000700003&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-31952008000700003&lng=es&tlng=es).

Neergard P. 1977. Seed pathology. Vol. I. The MacMillan Press LTD. Printed in Great Britain by Unwin Brothers Limited, The Gresham Press, Old Working, Surrey. England. 839 p.

Quero CA, Enriquez QC, Nieto NL y Miranda JL. 2010. Apomixis y su importancia en la selección y mejoramiento de gramíneas forrajeras tropicales. Revisión. Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias, 1: 25-42. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2007-11242010000100003&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-11242010000100003&lng=es&tlng=es).

Quero CA, Hernández GF, Enríquez QE, Bolaños AF y Villanueva A. 2018. Forrajes y pastoreo en México tropical. *In*: E González Padilla y JL Dávalos Flores (coordinadores) Estado del Arte sobre Investigación e Innovación Tecnológica en Ganadería Bovina Tropical. Libro Técnico. 2ª Ed. REDGATRO, UNAM, INIFAP, CONACyT. pp: 66-91.

Quero CA, Miranda J. L., Villanueva, Á. J. F. 2017. Recursos genéticos de gramíneas para el pastoreo extensivo. Condición actual y urgencia de su conservación ante el cambio climático. Avances en Investigación Agropecuaria. 3: 63-85.

Quero CA, Miranda JL, Hernández GF y Rubio AF. 2014. Mejora del establecimiento de praderas. Folleto Técnico. Colegio de Postgraduados 31p. ISBN: 978-607-715-213-2.

Rzedowski CG y Rzedowky, 2001. Flora fanerogámica del Valle de México. Segunda ed. Instituto de Ecología y comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Pátzcuaro, Michoacán, México. 504 p.

Sánchez LS.y Trapero CA 2003. Material vegetal y de reproducción: Manejo, conservación y tratamiento. Consejería de Medio Ambiente-Dirección General de Gestión del Medio Natural. Sevilla, España. 230 p. [http://www.juntadeandalucia.es/medioambiente/consolidado/publicacionesdigitales/80-402\\_material\\_vegetal\\_de\\_reproduccion\\_\\_manejo\\_conservacion\\_y\\_tratamiento/80-402/6\\_estado\\_fitosanitario\\_etiologia.pdf](http://www.juntadeandalucia.es/medioambiente/consolidado/publicacionesdigitales/80-402_material_vegetal_de_reproduccion__manejo_conservacion_y_tratamiento/80-402/6_estado_fitosanitario_etiologia.pdf).

Valerio AE, Carreón A, Lafon JM, Ochoa P, Calderón DM, Soto VC y Chacón EF. 2005. Distribución, extensión espacial y condición de los pastizales en el estado de Chihuahua. Protección de la Fauna Mexicana, A.C. en colaboración con The Nature Conservancy. Chihuahua, Mexico. 55 p.

Willard EE y Schuster JL. 1971. An evaluation of an interseeded sideoats gramma stand four years after establishment. *Journal of Range Management*. 24(3): 223–226. Doi: 10.2307/3896777.

# CAPÍTULO I. CARACTERIZACIÓN DE HONGOS ASOCIADOS EN SEMILLA

## COMERCIAL DE GENOTIPOS DE *Bouteloua curtipendula*

### 1.1 RESUMEN

Una de las principales formas de diseminación de patógenos es a través de la semilla. Con el objetivo de determinar los patógenos asociados a propágulo de cinco variedades (NDM-La Zarca, NDM-303, NDM-5, NDM-Zenith, NDM-La resolana) del pasto Banderita (*Bouteloua curtipendula*) se analizaron tres tipos de propágulo: espiguillas (cariópside + brácteas accesorias; M<sub>1</sub>), cariópside con lemas (M<sub>2</sub>) y cariópside limpios (M<sub>3</sub>) proveniente del Valle del Mezquital, Hidalgo, cosechada en otoño 2017. Para inducir el crecimiento de los hongos las espiguillas (M<sub>1</sub>) fueron sembradas en cámara de humedad, mientras que M<sub>2</sub> y M<sub>3</sub> en medio de cultivo PDA, posteriormente los crecimientos se aislaron en medios específicos para su identificación. Los aislados obtenidos fueron identificados por características de desarrollo del cultivo, morfológicas y moleculares. Se observó a *Alternaria alternata* y *Alternaria tenuissima* en 67 % de las muestras, *Fusarium srcipi* y *Fusarium incarnatum* en el 24 % y *Bipolaris cynodontis* en el 9 %. A la fecha ninguna de estas especies ha sido reportada en México para esta especie de pasto.

**Palabras clave:** *Bouteloua curtipendula*, patógenos de la semilla, sanidad de semilla.

**PHYTOPATHOGENIC FUNGUS ON SEED DIAGNOSIS OF FIVE NATIVE TO  
MÉXICO GENOTYPES OF SIDEOATS GRAMA *Bouteloua curtipendula***

**1.2 ABSTRACT**

Plant seeds represent an important source for pathogen dissemination. In order to determine associated pathogens to propagules of five varieties of sideoats gramma (*Bouteloua curtipendula*): NdeM-La Zarca, NdeM-303, NdeM-5, NdeM-Zenith, NdeM-La resolana, three different propagules were analyzed for each, as these were available from commercial seed production fields: spikelets (caryopsis + accessory bracts; M<sub>1</sub>), caryopsis with lemma (M<sub>2</sub>) and pure caryopsis (M<sub>3</sub>), produced at the Valle del Mezquital, Hidalgo, during 2017. In order to promote fungus growth, spikelets (M<sub>1</sub>) were sown within a humidity chamber; while M<sub>2</sub> and M<sub>3</sub>, were sown on PDA culture media; growth material was later sown on specific media for identification. Isolated results were identified through culture traits, morphology and molecular markers. *Alternaria alternata* y *A. tenuissima* was observed for 67 % of the samples, *Fusarium scirpi* and *F. incarnatum*, at 24 %, and *Bipolaris cynodontis*, in 9 %. To date, none of these pathogenic species have been reported in Mexico for commercial seed of *B. curtipendula*. These findings open a wide spectrum for sanitary management of produced seed for this plant species.

**Key words:** *Bouteloua curtipendula*, sideoats gramma seed, seed pathogens, sanitary seed quality

### 1.3 INTRODUCCIÓN

Aunque existen otros tipos de propágulo asexuales, las semillas son el vehículo (sexual y asexual) por excelencia para la propagación vegetal en cultivos. Como portadoras de características genéticas, agronómicas y morfológicas, pueden también transportar organismos patógenos, ya que ofrecen condiciones favorables para la sobrevivencia del embrión (Arriagada, 2012). El efecto negativo de la asociación patógeno-semilla puede limitar la disponibilidad de plantas, materia prima, alimentos y afectar seriamente tanto la salud humana como la animal (Ridao, 2003). La inspección y análisis de semilla permite la detección oportuna de patógenos asociados y con ello, la oportunidad de tomar medidas de manejo. De los patógenos asociados a semillas forrajeras; los hongos, poseen la mayor importancia, porque además de afectar el rendimiento (“damping off”, achaparramiento, pudriciones y marchitez), y provocar alteraciones en parámetros de calidad de la cosecha: lignificación de tallos, menor digestibilidad del forraje y, contenido de aminoácidos libres en raíz y hojas de las plantas afectadas, micotoxinas causantes de enfermedades en humanos y ganado, entre otras. La fitosanidad junto con otras variables (viabilidad, germinación, pureza y vigor) determina la calidad de un lote de semilla. La mayor parte de la literatura especializada indica que hongos como: *Alternaria*, *Aspergillus*, *Botrytis*, *Cladosporium*, *Curvularia*, *Doratomyces*, *Fusarium*, *Helminthosporium*, *Macrophomina*, *Nigrospora*, *Penicillium*, *Chaetomium*, *Pestalotia* y *Rhizopus*, son géneros asociados a semilla en campo y almacenamiento (Lezcano *et al.*, 2007).

En México cerca del 90 % de las semillas forrajeras son importadas (Ramos y Espinoza, 1999; Quero *et al.*, 2017). La necesidad de recursos genéticos forrajeros nacionales que garanticen calidad, alta persistencia y adaptación a condiciones regionales específicas (Morales y Melgoza, 2010) hace necesarios estudios de calidad de las semillas que se producen en el país. El pasto

Banderita *Bouteloua curtipendula* (Michx.) Torr., es una especie nativa de gran preferencia para ganado, alto contenido nutricional y ampliamente utilizado en resiembras (Morales *et al.*, 2009) de praderas y pastizales de zonas áridas y semiáridas. El objetivo del presente trabajo fue identificar y caracterizar hongos patógenos asociados a semilla de pasto Banderita *B. curtipendula*, producida comercialmente en el Valle del Mezquital, Hidalgo.

## **1.4 MATERIALES Y MÉTODOS**

La semilla proviene de parcelas para la producción comercial, localizadas en Valle del Mezquital, Hidalgo y cosechada en otoño de 2017. Este valle se localiza a 2000 msnm delimitado por sierras al norte y noreste, que impiden el paso de masas de aire húmedo provenientes del Golfo de México. El clima es seco con lluvias en verano clasificado como tipo BSkwg y BShwg. Precipitación anual  $\leq 600$  mm. Temperatura mínima de  $-10$  °C en invierno y máxima de  $39.5$  °C en verano. Las muestras evaluadas son de cinco materiales genéticos (ecotipos y variedades) de pasto Banderita disponibles para investigación en el área de Forrajes del Programa de Ganadería: 1) “NdeM-La Zarca”, 2) “NdeM-303”, 3) “NdeM-5”, 4) “NdeM-Zenith”, 5) “NdeM-La Resolana”.

### **1.4.1 Aislamiento y purificación de los hongos.**

El trabajo fue realizado en el área de Fitosanidad-Fitopatología del Colegio de Postgraduados *Campus* Montecillo-Texcoco, Estado de México. Las muestras se separaron en tres tipos de propágulo: M<sub>1</sub>-espiguillas (brácteas accesorias + cariósides), M<sub>2</sub>-cariósides con lemas y M<sub>3</sub>-cariósides limpios (sin brácteas accesorias). De cada variedad se tomaron 60 espiguillas, 60 cariósides con lemas y 60 cariósides limpios. Los aislamientos se obtuvieron: M<sub>1</sub>-espiguilla sin desinfestar por el método de papel secante y congelación (Warham *et al.*, 1998). M<sub>2</sub>-cariósides con lemas y M<sub>3</sub>-cariósides limpios, ambos tipos, fueron desinfestados en solución de hipoclorito

de sodio a 1.5 % por dos minutos y se enjuagaron tres ocasiones con agua destilada estéril, se secaron con papel absorbente estéril y se procedió a sembrar cinco semillas por caja Petri en medio de cultivo PDA (Papa-dextrosa-Agar) (Crous *et al.*, 2009) marca Bioxon®. Las cajas se incubaron a  $24 \pm 2$  °C por ocho días o hasta el desarrollo de estructuras. Posteriormente se verificó la aparición de microorganismos fungosos y se realizaron los sub-cultivos necesarios en medio de cultivo PDA, con el fin de iniciar el proceso de purificación con la técnica de punta de hifa y monospóricos (Gilchrist *et al.*, 2005). Para calcular la frecuencia de aislamiento por género y tipo de muestra se utilizó la siguiente ecuación: Frecuencia (%) = (No. de aislados del género identificado / total de aislados analizados por tipo de muestra) \*100 (Mariscal *et al.*, 2017).

#### **1.4.2 Identificación morfológica**

Los aislamientos del género *Alternaria* se sembraron en cajas Petri con medio de cultivo PDA, V8 (Agar-jugo de verduras®) y PCA (Papa-Zanahoria-Agar); los de *Fusarium* en PDA, CLA (Agar-clavel) y SNA (Spezieller Nährstoffarmer-Agar); y *Bipolaris* en PDA. Las cajas se incubaron a una temperatura de  $24 \pm 2$  °C con 12 horas luz/oscuridad. La identificación morfológica se realizó con base a color de la colonia, forma y tamaño de conidióforos y conidios. Para estas dos últimas se llevaron a cabo preparaciones semipermanentes en glicerol al 50 %. El tamaño de muestras para las mediciones fue de 50 ejemplares (Crous *et al.*, 2009), que fueron documentadas con ayuda de microscopio compuesto con cámara Motic Images Plus 2.0, (Software Motic 580 ver.5.0.) y microscopio marca Carl Zeiss ® Imager D2 con cámara (Axioncam503 color; la identificación se hizo basados en las claves taxonómicas de Warham *et al.*, (1998), Barnett y Hunter (1972), Gilchrist *et al.*, (2005), Leslie y Summerell (2006) y Manamgoda *et al.*, (2014).

### 1.4.3 Identificación molecular

Para confirmar la identificación morfológica se realizó la extracción de ADN por el método de la Fosfatasa Alcalina (AP) (Sambrook y Russell, 2012), las muestras obtenidas se enviaron a Macrogen® (Corea) para su purificación y amplificar el genoma por PCR, con iniciadores universales ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') de los genes ribosomales (White *et al.*, 1990) para *Alternaria* y *Bipolaris*; y para *Fusarium* con el iniciador ITS4 y la amplificación parcial del gen factor de elongación 1- $\alpha$  (*EF1- $\alpha$* ), con el primer EF1-983F (5'- GCYCCYGGHCAYCG TGAYTTYAT-3'). Las secuencias se editaron y alinearon manualmente mediante el Software BioEdit 7.2.5 (Hall, 1999), y se comparados individualmente en la base de datos del Banco de Genes del National Center for Biotechnology (NCBI) USA, mediante el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) con los parámetros preestablecidos. Para el alineamiento y análisis filogenético de secuencias múltiples se utilizó el software Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA 7); y las secuencias de referencia reportadas por Woudenberg *et al.*, (2013) para el género *Alternaria*, O'Donnell *et al.*, (2009) para el género *Fusarium* y Manamgoda *et al.*, (2014) para el género *Bipolaris*. Todas las secuencias fueron alineadas con el algoritmo CLUSTAL-W, y se analizaron con el método Neighbor-joining (NJ) (Saitou y Nei, 1987). Se utilizaron 1000 réplicas de valores soporte (Bootstrap) para obtener un árbol consenso con una regla de mayoría del 70 % (Tamura *et al.*, 2004). Se utilizó al basidiomiceto *Phakopsora vitis* como nodo raíz externo al grupo.

## 1.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 1.5.1 Incidencia

Los géneros *Alternaria*, *Bipolaris* y *Fusarium* fueron los principales patógenos aislados de la semilla del pasto Banderita y se presentaron con porcentajes de incidencia variados dependiendo del tipo de muestra y variedad.

El género *Alternaria* con 67 % fue el de mayor número de aislados en las cinco variedades y los tres tipos de muestra, con excepción de la M<sub>3</sub> (cariópside limpios) de la variedad NDM-5 donde no se aisló. Este género que posee tan amplia distribución y presencia en el ambiente puede infestar a las semillas antes y después de la cosecha (Pavón *et al.*, 2012) y está constituido por especies saprofitas y patógenas. El género *Fusarium* con 24 %, estuvo presente en las cinco variedades siendo en las M<sub>2</sub> y M<sub>3</sub>, donde se aisló con mayor frecuencia; lo cual, puede deberse al ciclo de *Fusarium* ya que, en zonas con baja humedad la infección la causa, casi de manera exclusiva el inóculo presente en el suelo, invadiendo y penetrando la base de los tallos y raíces (Cook, 2010) llegando a infectar así toda la planta. El género *Bipolaris* con 9 % fue el de menor número de aislados en las cinco variedades, siendo en la M<sub>3</sub> de la variedad NdeM-La Zarca donde presentó mayor frecuencia (Figura 1.1).

Los géneros *Alternaria*, *Bipolaris* y *Fusarium* están asociados con enfermedades de hoja, tallo y raíz en gramíneas, así como con la producción de micotoxinas con efectos negativos en la salud animal (Sainz *et al.*, 2012). Enfermedades como Damping-off y Punta negra del grano pueden ser causadas por el complejo *Alternaria* spp.; *Fusarium* spp.; *Bipolaris* spp.; (Rodríguez *et al.*, 2009)

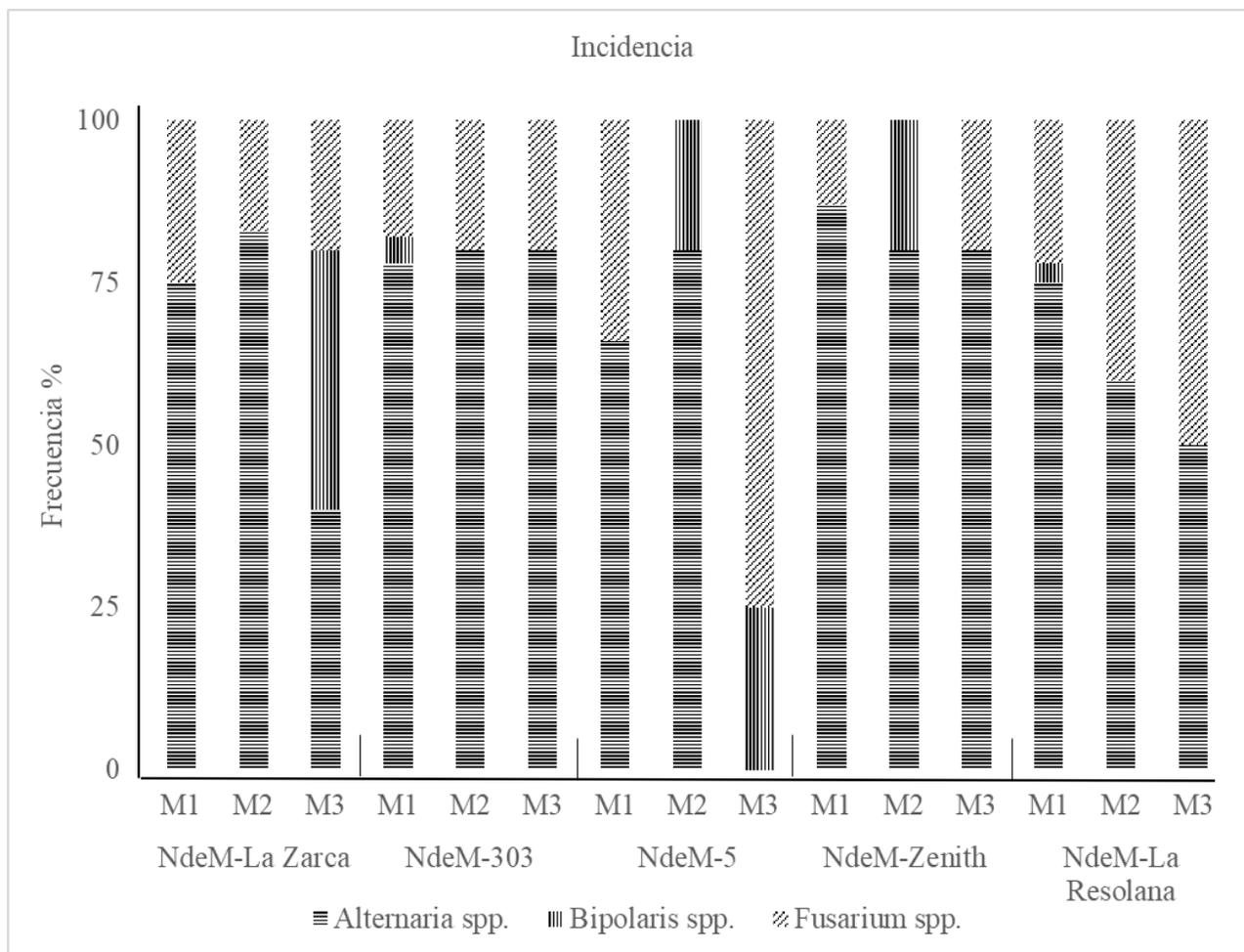


Figura 1.1. Frecuencia de *Alternaria*, *Bipolaris* y *Fusarium* aislados de cinco variedades comerciales de pasto Banderita (*Bouteloua curtipendula*) a partir de espiguillas (M1), cariósides con lemas (M2) y cariósides limpios (M3).

### 1.5.2 Identificación morfológica

Se obtuvieron 51 aislamientos de los tres tipos de muestra (M1, M2, M3) del cual se identificaron 16 morfoespecies: *Alternaria* spp., (11) dividido en dos grupos A-cf (9) y A-cl (2), *Bipolaris* B-os (1), *Fusarium* spp., (4) dividido en F1(2) y F2 (2). Siguiendo las claves taxonómicas para cada género, se identificaron cinco especies.

1) *Alternaria* cl: la colonia presentó coloración gris en PCA, conidios obclavados, muriformes con ornamentación rugosa-punteada, septación transversal de 1-6 y longitudinal de 0-3, tamaño de conidios de 15-34 x 6.3-13.5  $\mu\text{m}$ , conidioforós primarios de 12-46 x 3.8-5.4  $\mu\text{m}$ . La catenulación puede poseer de 5-15 conidios, presenta ramificación secundaria, correspondiendo estas características a la especie de *Alternaria tenuissima* de acuerdo con las claves Simmons (1995) (Figura 1.2).

2) *Alternaria* F: presentó una colonia grisáceo-olivo en PCA, presenta conidios obclavados, muriformes con ornamentación rugosa-punteada, septación transversal de 1-6 y longitudinal de 0-3, tamaño variable de conidios de 10.5-42 x 6.4-12.7  $\mu\text{m}$ , conidioforós primarios de 34.1-44.8 x 3.1-4.6  $\mu\text{m}$ . La catenulación puede poseer de 5-10 conidios presenta abundante ramificación secundaria, correspondiendo estas características a la especie de *Alternaria alternata* de acuerdo con las claves Simmons (1995) (Figura 1.2). Las esporas sobreviven sobre la semilla o el micelio dentro de esta, la alta humedad y temperaturas de 20-25 °C favorecen su desarrollo. *A. alternata* ha sido aislada de semillas de trigo (Bautista *et al.*, 2011) y Leucaena (Lezcano *et al.*, 2010), causa tizón foliar en avena (García *et al.*, 2013) pudriciones en frutales (Mariscal *et al.*, 2017; Ruiz *et al.*, 2017) y hortalizas (Fraire *et al.*, 2010). *A. tenuissima* presente en cultivos de trigo (Perello *et al.*, 2015). Estas especies producen micotoxinas que pueden estar presentes en productos como harinas, concentrados y alimentos procesados, afectando seriamente la salud humana y animal (Pavón *et al.*, 2012).

3) *Bipolaris*-os: presentó, en PDA, coloración olivo-oscura con micelio aéreo, conidióforos individuales sin ramificación de 43-160 x 4-6  $\mu\text{m}$  septado y geniculado en la parte superior, de color marrón; conidios de 21.5-49 x 10.5-15.8  $\mu\text{m}$  lisos ligeramente curvado, cilíndrico, de color marrón de 2-6 septos características que corresponden a *Bipolaris cynodontis* Marignoni, descritas por Manamgoda *et al.*, (2014) (Figura 1.2). Esta especie fue reportada por primera vez en *Cynodon dactylon* en 1909 y es considerada como patógeno saprofito secundario, puede invadir amplia gama de hospedantes dentro de las gramíneas (Poaceae). Es considerada de

baja importancia económica, reportado como patógeno en varias especies de pastos (González *et al.*, 2006), en *Chloris gayana* (Rodríguez, 2011) y *Cynodon. dactylon* (Hagan, 2005) induce manchas foliares.

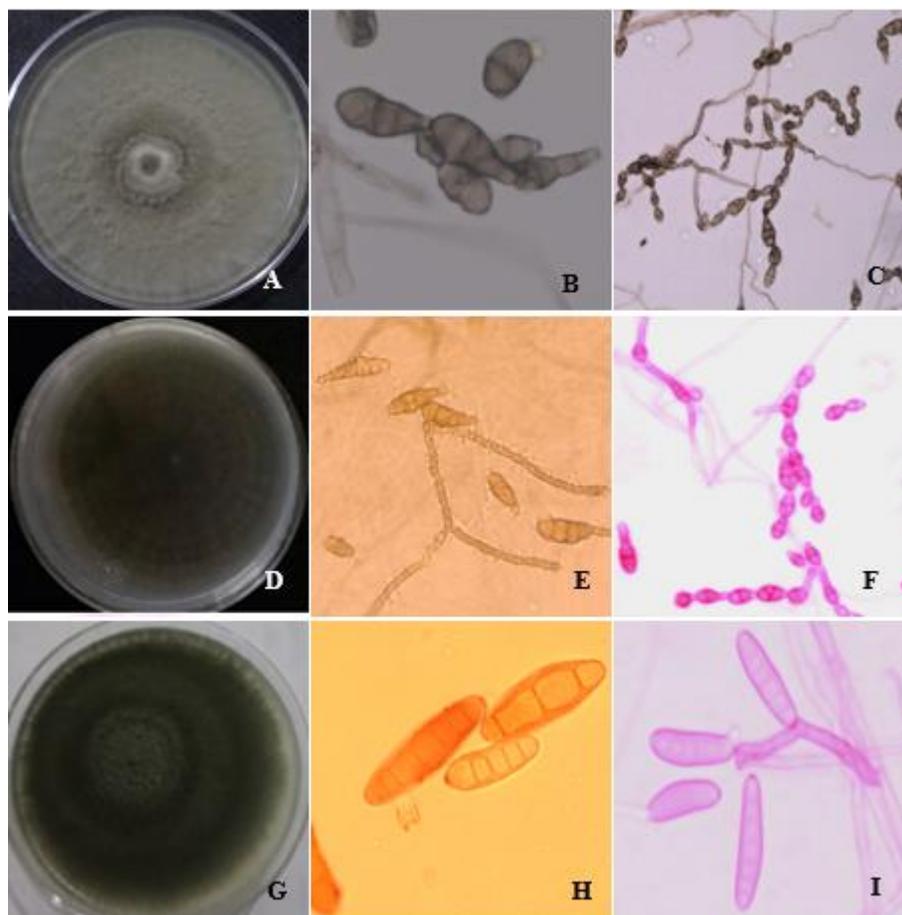


Figura 1.2. Aislamientos obtenidos de semilla comercial de pasto Banderita. Morfología de aislados. A-C) *Alternaria tenuissima*, A) Colonia en PCA, B) Conidios, C) Cadena de conidios. D-F) *Alternaria alternata*, D) Colonia en PCA, E) Conidios, F) Cadena de conidios. G-I) *Bipolaris cyndontis*, G) Colonia en PDA, H) Conidios, I) Conidióforo. Fotografías tomadas con microscopía de contraste con objetivo (40x).

4) *Fusarium* 1: la colonia presentó una coloración beige con micelio blanco que se tornó marrón al envejecer y, similarmente, formación de masas de esporas. Los esporodocios color

salmón-naranja. Macroconidios delgados y curva dorsiventral de 26-38.5 x 3-4.9  $\mu\text{m}$  con 5-6 septos, célula apical ahusada, célula basal en forma de pie. Microconidios elipsoidales de 8.9-17.5 x 2.5-4.2  $\mu\text{m}$  0-3 septos. Polifialídes cortas características correspondientes a *Fusarium scirpi*, descritas por Leslie & Sumerell, (2006) (Figura 1.3). Esta especie es común en regiones templadas, pero también en áreas áridas y semiáridas (Burgess *et al.*, 1992) en pastizales y tierras de cultivo. Se considera patógeno secundario, pero puede causar pudriciones en raíces de leguminosas. 5)

*Fusarium 2*: presentó coloración naranja pálido a salmón, abundante micelio algodonoso. Macroconidios semirectos y ligeramente curvados de 27-36 x 3-4.5  $\mu\text{m}$  con 3-5 septos, célula basal en forma de pie, célula apical afilada y curva. Presenta abundantes mesoconidios de 1-3 septos. Estas características coinciden con *Fusarium incarnatum* (Roberge) Sacc, descritas por Leslie & Sumerell, (2006) (Figura 1.3). Presente en suelo y en amplia gama de ambientes tropical-desérticos, considerados de baja importancia económica. Asociado a semillas del mijo perla (Wilson, 2002), soya (Chiotta *et al.*, 2015) y sorgo. Especies pertenecientes al complejo *incarnatum-equiseti* asociado a enfermedades en gramíneas y la producción de micotoxinas (Salvat *et al.*, 2013).

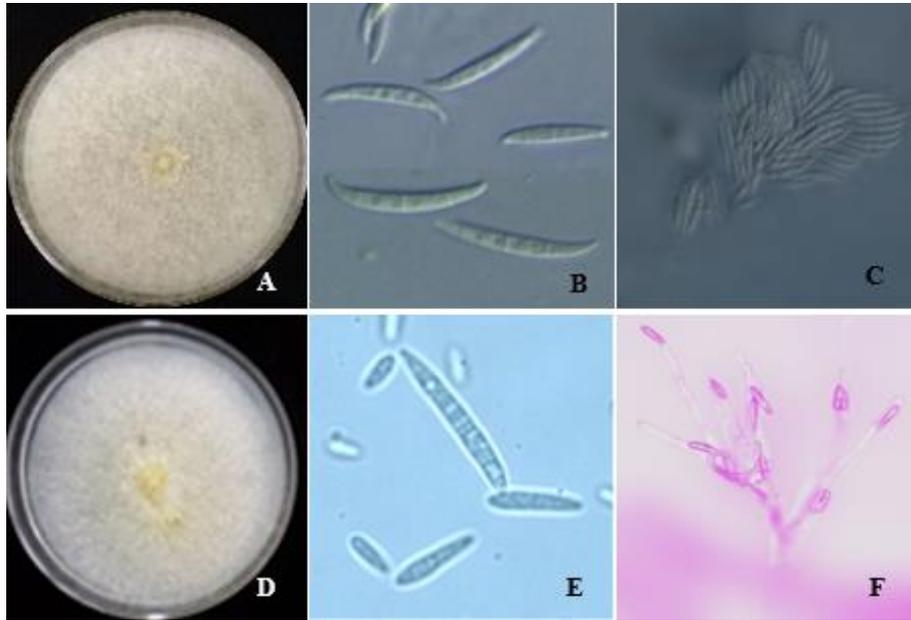


Figura 1. 3 Aislamientos obtenidos de semilla del pasto Banderita procedente del Valle del Mezquital, Hidalgo. Morfología de aislados. A-C) *Fusarium scirpi*, A) Colonia en PDA, B) Macroconidios, C) Esporodocio. D-F) *Fusarium incarnatum*, D) Colonia en PDA, E) Micro y Mesoconidios, F) Fiálides. Fotografías tomadas con microscopía de contraste con objetivo (40x).

### 1.5.3 Identificación y filogenia molecular

Las secuencias de ADN obtenidas de los aislamientos tuvieron porcentaje de cobertura e identidad  $\geq 99\%$  para distintas especies de cada uno de los géneros (*Alternaria*, *Bipolaris* y *Fusarium*) lo cual confirmó la identificación previa del género basada en caracteres morfológicos. Para determinar la identidad de cada aislamiento, se realizó filogenia molecular (Figura 1.4). Las secuencias correspondientes al género *Alternaria*, se agruparon en el clado que comprende a diez especies que conforman el complejo *Alternata* de acuerdo con Woudenberg *et al.*, (2013); existe escasa variación molecular y para determinar los morfotipos específicos es necesario secuenciar tres o más genes (Woudenberg *et al.*, 2015). Sin embargo, por la morfología presentada se corrobora que A-cf es *Alternaria alternata* y A-cl es *Alternaria tenuissima*. La secuenciación de

*Bipolaris*-os se alineo con el clado que comprende a *Bipolaris coffeana* y *Bipolaris cynodontis* de acuerdo Manamgoda *et al.*, (2014), ambas especies están filogenéticamente relacionadas. Según con la morfología presentada se tomó como *Bipolaris cynodontis* Manamgoda *et al.*, (2014). Las secuencias del género *Fusarium* se alinearon dentro del complejo *incarnatum-equiseti* que incluye a cuatro especies: *Fusarium incarnatum*, *F. equiseti*, *F. lacertarum* y *F. scirpi*. La región ITS del rDNA y EF1 no presentó suficiente polimorfismo para separar entre estas cuatro especies filogenéticamente relacionadas, lo cual es acorde a lo reportado por O'Donnell *et al.*, (2009). De acuerdo con la morfología presentada se identificó a F1 como *Fusarium scirpi* y F2 como *Fusarium incarnatum*.

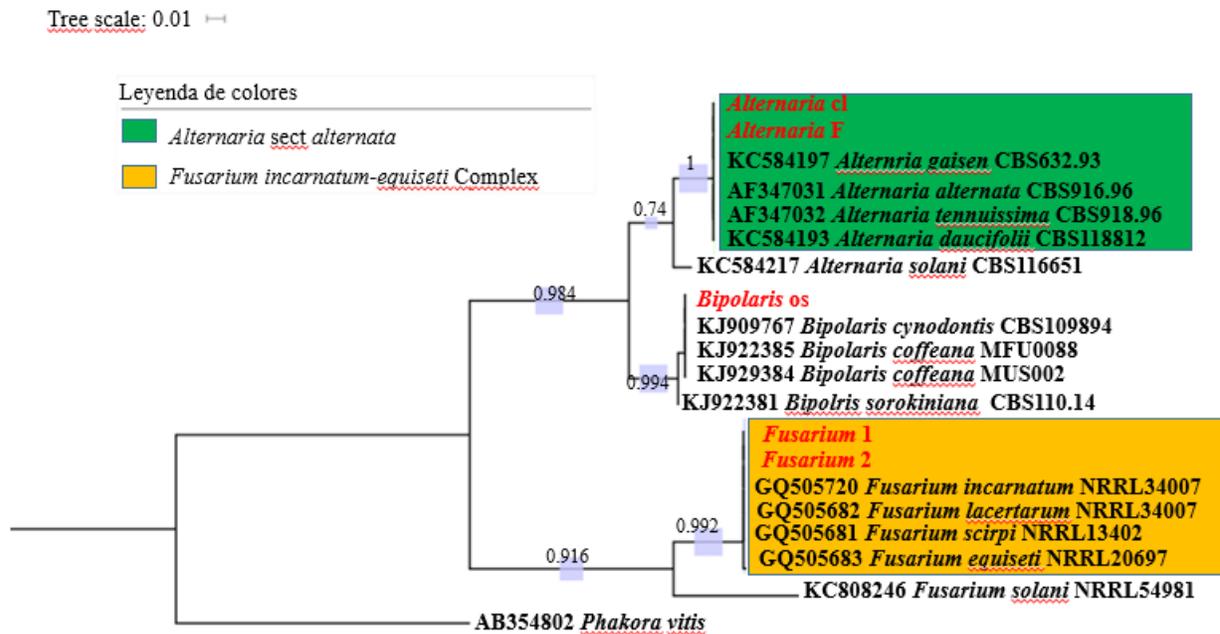


Figura 1. 4. Análisis filogenético de los aislados de *Alternaria*, *Bipolaris* y *Fusarium* de la semilla del pasto Banderita procedentes del Valle del Mezquital, Hidalgo.

## 1.6 CONCLUSIONES

Las semillas evaluadas tienen baja calidad fitosanitaria, se encontró a *Alternaria* spp. con un 67 %, *Fusarium* spp. con 24 %, y para *Bipolaris* spp. con 9 % de las cinco variedades y los tres tipos de propágulo. Las especies *Alternaria alternata*, *A. tenuissinna*, *Fusarium incarnatum*, *F. scirpi* y *Bipolaris cynodontis* fueron identificados por caracterización morfológica, molecular y filogenia, como los principales hongos asociados en semilla comercial del pasto Banderita (*Bouteloua curtipendula*) proveniente del Valle del Mezquital, Hidalgo.

## 1.7 LITERATURA CITADA

- Arriagada RV. 2012. Semillas. Inspección, análisis, tratamiento y legislación. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA-O.E.A.) 115p. <http://repiica.iica.int/docs/bv/agrin/b/f03/XL2000600205.pdf> (consultada, diciembre 2018).
- Barnett HL y Hunter BB. 1972. Ilustred Genera of Imperfect Fungi. Burgess Publishing Company. Minnesota, USA. 241p.
- Bautista EE, Leyva MG, Villaseñor ME, Huerta EJ y Mariscal AA. 2011. Hongos Asociados al Grano de Trigo Sembrado en Áreas del Centro de México. Revista Mexicana de Fitopatología, 29(2), 175-177. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0185-33092011000200011&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33092011000200011&lng=es&tlng=es).
- Burgess LW y Sumerell BA. 1992. Mycogeography of *Fusarium*: survey of *Fusarium* species in subtropical and semi-arid grassland soil from Queensland, Australia. Mycological Research, 96(9): 780-784. [https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(09\)80448-6](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(09)80448-6)
- Chiotta ML, Chulze S y Barros G. 2015. Fuentes de inóculo de especies de *Fusarium* potenciales productoras de micotoxinas en el agroecosistema soja. Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Cuyo, 47(2):171-184. <https://doi.org/10.19137/qs.v7i0.687>

- Cook RJ. 2010. *Fusarium* root, crown, and foot rots and associated seedling diseases. *In*: Compendium of wheat diseases and pests. 3er. Ed. In: W.W. Bockus, R. Bowden, R. Hunger, W. Morrill, T. Murray, and R. Smiley (Eds.). The Pennsylvania State University Press, University Park, USA. p. 37-39. <https://doi.org/10.1080/10496505.2011.564100>
- Crous PW, Verkley GJ, Groenewald JZ, y Samson RA. 2009. Fungal Biodiversity. CBS Laboratory Manual Series. Centraalbureau voor Schimmecultures, Utrecht, Netherlands. 269p.
- Fraire CL, Nieto AD, Cárdenas SE, Gutiérrez AG, Bujanos MR, y Vaquera HH. 2010. *Alternaria tenuissima*, *A. alternata* y *Fusarium oxysporum* Hongos Causantes de la Pudrición del Florete de Brócoli. *Revista mexicana de fitopatología*, 28(1), 25-33. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0185-33092010000100003&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33092010000100003&lng=es&tlng=es).
- García LE, Leyva MG, Villaseñor ME, Rodríguez GF y Tovar PM. (2013). Identificación e incidencia de tres hongos fitopatógenos, de reporte nuevo, en avena (*Avena sativa* L.) en la meseta central de México. *Agrociencia*, 47(8): 815-827. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1405-31952013000800006&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-31952013000800006&lng=es&tlng=es).
- Gilchrist SL, Fuentes GC, Martínez CA, López RE, Duveiller PS, Henry MI y García A. 2005. Guía práctica para la identificación de algunas enfermedades de trigo y cebada. Segunda Ed. 68 pág. México. CIMMYT. (consultada, mayo 2018). <https://repository.cimmyt.org/xmlui/handle/10883/1272>
- González AG, López MM, Novo A, Estrada ZV, López GM, Bernal DA, Granda BA, Rodríguez AG, Figueredo GG, Pupo LZ, Ramos AD, González M, Ruiz MG, Pérez MG, Nápoles IA, García CR, Sánchez GC, Buchillón R, y López CM. 2006. Fitopatógenos en los cultivos de pastos y forrajes en Cuba. *Fitosanidad*, 10(1): 11-18. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=20911615002>
- Hagan A. 2005. Leaf spot and rust diseases of turf grasses. Alabama Cooperative. Extension System. (consultada, diciembre 2018). [www.aces.edu](http://www.aces.edu)

- Hall TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Oxford University Press. Nucleic Acids Symposium Series 41: 95-98. [http:// brownlab.mbio.ncsu.edu/JWB/papers/1999Hall1 .pdf](http://brownlab.mbio.ncsu.edu/JWB/papers/1999Hall1.pdf)
- Leslie JF y Summerell BA. 2006. The *Fusarium* Laboratory Manual. Black well Publishing. United States of America. 388p. ISBN/ISSN: 978-0-8138-1919-8
- Lezcano JC, Martínez B y Alonso O. 2010. Caracterización cultural y morfológica e identificación de 12 aislamientos fungosos de semillas de *Leucaena leucocephala* cv. Perú. Pastos y Forrajes, 33(1):1. [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S08640394201000100004&lng= es&tlng](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S08640394201000100004&lng= es&tlng)
- Lezcano JC, Navarro M, González y, Alonso O. 2007. Determinación de la calidad de las semillas de *Leucaena leucocephala* cv. Perú almacenadas al ambiente. Pastos y Forrajes. 30(1):107-118. [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0864-03942007000100006 &lng=es&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03942007000100006&lng=es&tlng=es).
- Manamgoda DS, Rossman A, Castlebury LA, Crous PW, Madrid H, Chukeatirote E, y Hyde KD. 2014. The genus *Bipolaris*. *Studies in Micology* 79:221-228. <http://dx.doi.org/10.1016/j.simyco.2014.10.002>.
- Mariscal AL, Rivera YA, Dávalos GP, y Ávila MD. 2017. Situación actual de hongos asociados a la secadera de la fresa (*FrAgaria x Ananassa* Duch.) en Guanajuato, México. *Agrociencia*, 51(6):673-681. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1405-31952017000600673&lng =es&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-31952017000600673&lng =es&tlng=es).
- Morales NC y Melgoza AC. 2010. Características productivas de zacates forrajeros importantes en el norte de México. INIFAP-SAGARPA. Folleto Técnico 28. 51p.
- Morales NC, Quero CA, Melgoza AC, Martínez SM y Jurado GP. 2009. Diversidad forrajera del pasto Banderita [*Bouteloua curtipendula* (Michx.) Torr.], en poblaciones de zonas áridas y semiáridas de México. *Técnica Pecuaria México*, 47(3):231-244. <http://www.realiyc.org/articulo.oa?id=61312111001>
- O'Donnell K, Sutton DA, Rinaldi MG, Gueidan C, Crous PW, Geiser DM. 2009. Novel multilocus sequence typing scheme reveals high genetic diversity of human pathogenic members of

the *Fusarium incarnatum-F. equiseti* and *F. chlamyosporum* species complexes within the United States. *Journal Clinical Microbiology*, 47 (12): 3851-3861. <https://doi.org/10.1128/jcm.01616-09>

Pavón MM, González AI, Martín SR and García LT. 2012. Importancia del género *Alternaria* como productor de micotoxinas y agente causal de enfermedades humanas. *Nutrición Hospitalaria*, 27(6): 1772-1781. <http://dx.doi.org/10.3305/nh.2012.27.6.6017>

Perello AE, Aulicino MB, Martinelli C, Regueira M, Moreno MV y Stenglein S. 2015. Caracterización morfo-cultural de nuevos grupos taxonómicos de *Alternaria* asociados a enfermedades del trigo en Argentina. *Revista Ciencias Morfológicas*, 17(1):1-15. <https://revistas.unlp.edu.ar/Morfologia/article/view/2213>

Quero CA, Miranda J. L., Villanueva, Á. J. F. 2017. Recursos genéticos de gramíneas para el pastoreo extensivo. Condición actual y urgencia de su conservación ante el cambio climático. *Avances en Investigación Agropecuaria*. 3: 63-85.

Ramos JL y Espinoza JM. 1999. Proyecto nacional de producción de semillas forrajeras. Campo Experimental Pabellón. INIFAP-IRNOC. Desplegable Informativo. 7.

Ridao AC. 2003. Patología e importancia epidemiológica de las semillas en el desarrollo de enfermedades de soja. *In: Jornada de Act. Profesional en Cultivos de Cosecha Gruesa: Maíz, Girasol y Soja*. INTA (consultada, septiembre 2018) <http://www.inta.gov.ar/balcarce/info/documentos/agric/oleag/soja/ridao.htm>

Rodríguez G. 2011. Patógenos fúngicos que afectan a gramíneas procedentes de la Estación Experimental de pastos y Forrajes “Las Tunas”. Unidad Experimental “Indio Hatuey”, Universidad de Matanzas “Camilo Cienfuegos” Cuba. (consultado, septiembre 2018). <https://biblioteca.ihatuey.cu/link/tesis/tesism/gisellerodriguez.pdf>

Rodríguez, CG, Iglesias C, Nieto TM y Palmero D. 2009. La enfermedad de la Punta Negra del trigo. *Agricultura*. *Revista Agropecuaria* 195:118-121. ISSN 0002-1334. (consultada, mayo 2019). <http://oa.upm.es/15517/>

Ruiz CF, Rios VC, Berlanga RD, Ornelas PJ, Acosta MC, Romo CA, Zamudio FP, Pérez CD, Salas MM, Ibarra RJ y Fernández PS. 2017. Incidencia y agentes causales de enfermedades de

raíz y sus antagonistas en manzanos de Chihuahua, México. *Revista mexicana de fitopatología*, 35(3):437-462. <https://dx.doi.org/10.18781/r.mex.fit.1704-3>

Sainz MJ, Aguin O, Bande MJ, Pintos C y Mansilla JP. 2012. Biodiversidad de Especies de *Fusarium* en tallos de Maíz Forrajero en Galicia. *Pastos*, 42(1):51-56. [polired.upn.es/index.php/pastos/article/download/2034/2083](http://polired.upn.es/index.php/pastos/article/download/2034/2083)

Saitou N, Nei M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4(4): 406-425. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>

Salvat A, Balbuena O, Ricca A, Comerio R, Rosello BJ, Rojas D, Berretta M, Delssin E, Bedascarrasbure E, Salerno J. 2013. Presencia de zearalenona en pasturas del Este de Chaco. *Revista de investigaciones Agropecuarias*, 39(1): 31-36. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=86426063015>.

Sambrook J y Russel DW. 2012. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Third edition. 1.1.32-1.34. New York. Cold Spring Harbour Laboratory Press.

Simmons EG. 1995. *Alternaria* themes and variations (112-144). *Journal: Mycotaxon*. 5555-163.

Tamura K, Nei M y Kumar S. 2004. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101: 11030-11035. <https://doi.org/10.1073/pnas.0404206101>.

Warham, E.J., Butler L. y Sutton B. 1998. *Ensayos para la Semilla de Maíz y de Trigo*. Manual de Laboratorio. Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo. México. 64 p.

Wilson JP. 2002. Fungi associated with the stalk rot complex of pearl millet. *Plant Disease*, 86: 833-839. <https://apsjournals.apsnet.org/doi/pdf/10.1094/PDIS.2002.86.8.833>.

White TJ, Bruns T, Lee S y Taylor J. 1990. Amplification and Direct sequencing of fugal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DA, Sninsky JJ, White TJ. (eds.). *PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, CA, USA p. 315-322. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-372180-8.5002-1>.

Woudenberg JH, Groenewald JZ, Binder M, Crous PW. 2013. *Alternaria* redefined. *Studies in Mycology* 75(1): 171–212. <https://doi.org/10.3114/sim0015>.

Woudenberg JH, Seidl MF, Groenewald JZ, Vries M, Stielow JB, Thomma BP y Crous PW. 2015. *Alternaria* section *Alternaria*: Species, formae speciales or pathotypes? *Studies in Mycology* 82: 1–21. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2015.07.001>.

## CAPÍTULO II. PRUEBAS DE SENSIBILIDAD CON FUNGICIDAS COMERCIALES CONTRA PATOGENOS AISLADOS DE LA SEMILLAS DE PASTO BANDERITA

### 2.1 RESUMEN

La introducción de hongos patógeno a nuevas áreas de cultivo, ocurre principalmente a través de semillas, bulbos, tubérculos, esquejes, así como cariósides en el caso del pasto Banderita. Estos patógenos pueden causar daños a la misma semilla o limitar el desarrollo del cultivo. Se ha probado que el tratamiento de semillas con fungicidas controla y disminuye el daño causado por hongos. En el mercado, existen diversos fungicidas comerciales autorizados para el tratamiento de semillas con amplio espectro de acción o dirigidos un grupo específicos de hongos. En el presente trabajo se evaluaron siete fungicidas comerciales con acción preventiva-contacto y curativa-sistémica. Los fungicidas incluyeron Captan, Mancozeb, Benomilo, Procloraz, Tiabendazol, Tiofanato metílico y *Bacillus subtilis*, a diferentes concentraciones, contra *Alternaria alternata*, *Bipolaris cynodontis*, *Fusarium incarnatum*, aislados previamente de semilla comercial de pasto Banderita. *Bouteloua curtipendula*. La prueba de sensibilidad a fungicidas *in vitro* se desarrolló mediante la técnica de envenenamiento del medio de cultivo. La dosis efectiva del 50 % (DE<sub>50</sub>) se estimó mediante análisis de regresión no lineal en el programa Graphad Prism 8.2, en relación al porcentaje de inhibición del crecimiento micelial. La comparación de medias estimó que *Bacillus subtilis* presentó efectividad del 97 %, Tiofanato 96 %, Procloraz 94 %, Captan 93 %, Mancozeb 92 %, los fungicidas de menor efectividad fueron Benomilo 46 % y Tiabendazol 37%.

**Palabras claves:** *Bouteloua curtipendula*, tratamiento biológico, tratamiento químico, *Bacillus subtilis*, DE<sub>50</sub>.

## CHAPTER II. SENSITIVITY TESTS WITH COMMERCIAL FUNGICIDES AGAINST ISOLATED PATHOGENS FROM BANDERITA SEEDS

### 2.2 ABSTRACT

The introduction of pathogenic fungi to new cultivation areas occurs mainly through seeds, such as bulbs, tubers, cuttings, as well as caryopsis in the case of sideoats grama grass. These pathogens can cause damage both to the seed or limit crop development. It has been proven that fungicide seed treatment controls and decreases fungal damage. In the market, several authorized commercial fungicides do exist for the treatment of seeds with a broad spectrum of action or directed a specific group of fungi. In this work, seven commercial fungicides were evaluated with preventive-contact and curative-systemic action. The fungicides included Captan, Mancozeb, Benomilo, Procloraz, Thiabendazole, Methyl Thiophanate and *Bacillus subtilis* at different concentrations. These were selected against *Alternaria alternata*, *Bipolaris cynodontis*, *Fusarium incarnatum*, pathogens isolated from commercial seed of sideoats grama grass. The fungicide sensitivity test was performed under *in vitro* conditions through the culture medium poisoning technique. The 50% effective dose (IC<sub>50</sub>) was estimated by nonlinear regression analysis in the Graphad Prism 8.2 program of the percentage of mycelial growth inhibition. The comparison of means estimated that *Bacillus subtilis* showed effectiveness of 97%, Thiophanate 96%, Procloraz 94%, Captan 93%, Mancozeb 92%. Fungicides with low effectiveness included Benomilo 46% and Thiabendazole 37%. Preventive treatments are available to support sanitary quality and seedling growth for commercial seed of sideoats grama.

**Keys words:** *Bouteloua curtipendula*, biological treatment, chemical treatment, *Bacillus subtilis*, IC<sub>50</sub>.

## 2.3 INTRODUCCIÓN

Las enfermedades en las plantas a menudo producen impacto económico significativo en el rendimiento y calidad del desarrollo del cultivo y del producto esperado (pradera, forrajes, granos y semillas), de aquí la importancia del manejo de enfermedades como componente esencial en la producción. En un sentido general, existen tres razones principales por las cuales se utilizan los fungicidas: a) Controlar enfermedades al establecimiento y desarrollo de cultivos. b) Incrementar la productividad y reducir daños al cultivo. c) Mejorar el período de almacenamiento, calidad de plantas y productos cosechados. Las mayores pérdidas por enfermedades ocurren después de la cosecha, durante el almacenamiento del grano para consumo o semilla para siembras futuras.

La resistencia a fungicidas es un carácter heredable y estable que da como resultado una reducción en la sensibilidad al fungicida por parte de un hongo en particular. Esta capacidad se obtiene a través de un proceso evolutivo. Los fungicidas con un solo sitio de acción presentan alto riesgo para el desarrollo de resistencia si se les compara con los fungicidas de múltiples sitios de acción. La mayoría desarrollados a la fecha, tienen un solo modo de acción porque este se asocia con bajo potencial de impacto negativo al ambiente, incluido aquellos organismos para los cuales no está dirigida la acción del fungicida (McGrath, 2004).

Los tratamientos de semillas han demostrado ser un método práctico para controlar patógenos causantes de enfermedades; sin embargo, un fungicida no ofrece la solución a todo tipo de problemas. Por ejemplo, este puede resultar poco efectivo por no ser el ideal, estar dirigido al problema equivocado, o por aplicación incorrecta del tratamiento; lo cual, genera costos en tiempo y dinero. El tratamiento puede ser efectivo, pero tal vez sea más costoso que las utilidades obtenidas (Hopkis, 2016).

Los fungicidas para el tratamiento de semillas pueden ser biológicos o químicos divididos en: preventivos (contacto) o de erradicación (sistémico), lo anterior es importante similarmente, considerando que los patógenos se asocian externa (acompañando o en su superficie) e internamente (incluidos en sus tejidos) con las semillas. Fungicidas biológicos; basados en el antagonismo que los microorganismos puedan presentar entre sí, su modo de acción es preventivo, protegiendo a semillas sanas contra patógenos del suelo. En casos de semillas infectadas el control de patógenos es difícil. El control biológico de patógenos transmitidos por semilla utiliza principalmente tres mecanismos: eliminación por competencia, producción de antibióticos e inducción o promoción de resistencia al patógeno. Microorganismos factibles para el tratamiento a semillas incluyen a *Trichoderma* sp., *Bacillus subtilis* y *Streptomyces griseoviridis* reportados como efectivos en el control de *Alternaria*, *Fusarium* y *Phomopsis*.

Tratamientos químicos. Constituyen un método seguro, efectivo y económico debido a que el ingrediente activo generalmente, se aplica en dosis pequeñas comparado con la aplicación al cultivo en crecimiento, produciendo menor impacto ecológico. Además, pueden ser efectivos contra avanzados grados de infección, debido a la acción sistémica de algunos fungicidas. El tratamiento debe efectuarse conociendo previamente a los patógenos involucrados y su localización en la semilla. Fungicidas químicos preventivos o de contacto: su efecto es fungistático, ya que protegen a los tejidos vegetales inhibiendo la germinación de las esporas del patógeno y, por lo tanto, el subsecuente desarrollo de la enfermedad. Su acción se limita a áreas tratadas, es decir, no tiene movilidad a otras zonas. Algunos fungicidas comerciales de contacto, usados en el tratamiento a semillas incluyen a: Zineb, Maneb, Mancozeb, Thiram, Captan, Folpet, Quintozano y Clorotalonil

Los fungicidas sistémicos son móviles debido a sus características químicas que le permiten penetrar los tejidos de la semilla y actuar selectivamente contra ciertos patógenos sin causar fitotoxicidad; sin embargo, la selectividad es su desventaja comparado con el amplio espectro de acción de los fungicidas de contacto. Ejemplo de fungicidas sistémicos para el tratamiento de semillas incluyen actualmente a Procloraz, Tebuconazole, Benomilo, Carbendazin, Tiabendazol, Metalaxil y Propamocarb, que han probado su efectividad contra patógenos Ascomycetes, Deuteromicetes y Oomicetes en semilla de varias especies (Arriagada, 2012). Conocer la sensibilidad o resistencia del patógeno frente a un fungicida es vital para determinar el tipo de fungicida y concentración que deberá usarse en el tratamiento de la semilla. La sensibilidad puede determinarse por varios métodos, siendo el más usado el método de envenenamiento del medio de cultivo bajo condiciones de laboratorio. El objetivo de esta prueba es determinar el efecto *in vitro* de seis fungicidas químicos: Mancozeb, Captan, Benomilo, Procloraz, Tiabendazol y Tiofanato metílico y el fungicida biológico *Bacillus subtilis* contra los patógenos *Alternaria alternata*, *Bipolaris cynodontis* y *Fusarium incarnatum* aislados de semilla comercial del pasto Banderita *Bouteloua curtipendula*.

## **2.4 MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.4.1 Aislados utilizados**

Para esta prueba se emplearon colonias de *Alternaria alternata*, *Bipolaris cynodontis* y *Fusarium incarnatum* especies aisladas de semilla comercial de *Bouteloua curtipendula* (Mixch.) Torr., proveniente del Valle del Mezquital, Hidalgo, cosechada durante el otoño 2017. Los patógenos predominantes es esta especie fueron identificados tanto morfológica como molecularmente, por secuenciación de ITS. Las colonias fueron incubadas en medio de cultivo PDA (papa-dextrosa-agar) por ocho días a una temperatura de  $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ .

## 2.4.2 Fungicidas

Se evaluaron siete productos comerciales: fungicidas de contacto (Captan y Mancozeb), fungicidas sistémicos: Benomilo, Procloraz, Tiabendazol y Tiofanato metílico y un fungicida biológico: *Bacillus subtilis*. Las concentraciones finales de los fungicidas fueron calculadas basados en la concentración del ingrediente activo de cada producto y el volumen total a preparar de medio PDA.

Cuadro 2. 1. Fungicidas y concentración del ingrediente activo para prueba de sensibilidad

Fungicida	Ingrediente Activo	Concentración ( mg L <sup>-1</sup> )
Captan 50 WP®	Captan	0.1, 0.5, 1, 5, 10, 100, 200
Manzate 200®	Mancozeb	1, 150, 250, 300
Promyl 50 PH®	Benomilo	1, 5, 10, 100
Sportak® 45 CE	Procloraz	0.001, 0.01, 0.1, 1
Tecto 60®	Tiabendazol	0.1, 0.5, 1, 5
Prontius®	Tiofanato metílico	0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5, 10
Serenade Soil®	<i>Bacillus subtilis</i>	0.005, 0.01, 0.05, 1

## 2.4.3 Preparación del medio de cultivo con fungicidas

Método de envenenamiento del cultivo. Se utilizó medio de cultivo PDA ®Bioxon preparado en matraces de 250 ml y esterilizado a 15 psi durante 15 minutos. Posteriormente, los fungicidas fueron adicionados cuando la temperatura del medio esterilizado bajó a 50 °C, para no afectar la composición del producto (Cuadro 2.1) y el tratamiento testigo fue constituido por la nula aplicación de fungicida. Posteriormente, el medio fue vaciado en cajas Petri de 15 x 90 mm dejándose en oscuridad y bajo condiciones estériles de laboratorio; después de 24 horas las cajas

fueron etiquetadas e inoculadas colocando en el centro un disco (cortado con sacabocado), de 5 mm de diámetro de, PDA con micelio del hongo respectivo.

#### **2.4.4 Análisis de datos para la prueba de sensibilidad**

La efectividad de los fungicidas se evaluó mediante un diseño Completamente al Azar con tres repeticiones por concentración. El diámetro de la colonia fue medido en dos sentidos perpendiculares cada 48 horas hasta que el testigo llenó el medio de la caja Petri. El porcentaje de inhibición del crecimiento micelial se evaluó con la fórmula:  $(\varnothing\text{Testigo} - \varnothing\text{Tratamiento} / \varnothing\text{Testigo}) * 100$ . Con los datos obtenidos se realizó un análisis de varianza previa transformación de los datos con la función arcoseno  $y = a \sin \sqrt{\frac{y}{100}}$  y la comparación de medias se realizó con la prueba de Tukey  $p \leq 0.05$  usando el programa estadístico R. La  $DE_{50}$  (dosis efectiva que inhibe el 50% del crecimiento micelial) se obtuvo al transformar previamente con función logarítmica cada concentración  $[\log(x)]$  y sometidos al análisis de regresión no lineal contra el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial (y), empleando el programa Graphad Prism 8.2.

### **2.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Tanto la sensibilidad de *Alternaria alternata*, *Bipolaris cynodontis* y *Fusarium incarnatum* a Mancozeb, Captan, Benomilo, Procloraz, Tiabendazol, Tiofanato metílico y *Bacillus subtilis* (Cuadro 2.2; Cuadro 2.3), como el cálculo de la dosis efectiva que inhibe el 50 % del crecimiento micelial del hongo ( $DE_{50}$ ), fueron determinadas en el presente experimento.(Cuadro 2.4.)

### 2.5.1. Respuesta a Captán

*Alternaria alternata*: la DE<sub>50</sub> fue 61.90 mg L<sup>-1</sup>. El crecimiento micelial se inhibió en 83 % con la máxima concentración evaluada (200 mg L<sup>-1</sup>). *Bipolaris cynodontis*: la DE<sub>50</sub> fue 37.44 mg L<sup>-1</sup>, la inhibición al 100 % del crecimiento micelial fue a partir de 100 mg L<sup>-1</sup>. *Fusarium incarnatum*: la DE<sub>50</sub> fue 16.48 mg L<sup>-1</sup> y la concentración máxima evaluada (200 mg L<sup>-1</sup>) inhibió 97 %. Comparando con lo reportado por Parveen *et al.* (2013), quienes con una concentración de 200 mg L<sup>-1</sup> señalan inhibiciones de 36 % del crecimiento micelial de *A. alternata*, aislada de peras con síntomas de pudrición. En el presente trabajo se registró mayor efectividad contra *Alternaria*; la cual en promedio inhibió el 93 % del crecimiento micelial de los tres aislados. Captan es un fungicida preventivo – curativo con amplio espectro de control a patógenos por su modo acción multisitio, interfiere el mecanismo de respiración celular inhibiendo la germinación de esporas, lo que dificulta el crecimiento y desarrollo micelial y se puede traslocar hacia tejidos a partir de tratamientos a semillas o al suelo.

### 2.5.2 Respuesta a Mancozeb

*Alternaria alternata*: dosis efectiva 50 % (DE<sub>50</sub>) 4.40 mg L<sup>-1</sup>, inhibición en 85 % del crecimiento micelial. De acuerdo con Malandrakis *et al.* (2015), los valores obtenidos se encuentran dentro del rango reportado CE<sub>50</sub> de 2.34 a >100 mg L<sup>-1</sup> para diversos aislados de *A. alternata* obtenidos de frutos de tomate. *Bipolaris cynodontis*: DE<sub>50</sub> 9.50 mg L<sup>-1</sup>, inhibición al 100 % a partir de 150 mg L<sup>-1</sup>. Arshad *et al.* (2013) reportaron que una dosis de 50 ppm inhibió el 53 % del crecimiento micelial de *Bipolaris oryzae* aislada de hojas de arroz. *Fusarium incarnatum*: DE<sub>50</sub> 36.03 mg L<sup>-1</sup> e inhibición en 93 %. Mancozeb tuvo una efectividad promedio del 93 %, su mecanismo de toxicidad radica en modificar e inactivar proteínas sensibles a redox como la transcripción, traducción, estrés oxidativo del DNA y otros procesos metabólicos resultando en

citotoxicidad, este modo de acción es conocido como multisitio que no genera resistencia en los patógenos (Roede and Miller, 2014).

### 2.5.3 Respuesta a Benomilo

*Alternaria alternata*: DE<sub>50</sub> fue mayor a 100 mg L<sup>-1</sup>, supera la máxima concentración evaluada y que solo inhibió el 10.7 % del crecimiento micelial. *Bipolaris cynodontis*: DE<sub>50</sub> mayor a 100 mg L<sup>-1</sup>, esta concentración sólo inhibió el 27 % del crecimiento micelial. *Fusarium incarnatum*: la DE<sub>50</sub> 14.50 mg L<sup>-1</sup>, el crecimiento micelial fue inhibido al 100 % con la máxima concentración evaluada resultando ser efectivo. Benomilo es efectivo para controlar a *F. incarnatum* pero no para *Alternaria* y *Bipolaris*. La baja efectividad también fue reportada por Herrera *et al.* (2011) quienes utilizando una dosis de 500 mg L<sup>-1</sup>, señalan que inhibió sólo en 35.63 % el crecimiento de *A. alternata* aislada de *Thevetia peruviana*; similarmente, Cristóbal *et al.* (2013) con una dosis de 450 ppm la cual inhibió 45 % del crecimiento de *Alternaria* spp., aislada de cultivos tropicales.

### 2.5.4 Respuesta a Procloraz

*Alternaria alternata*: DE<sub>50</sub> fue 0.014 mg L<sup>-1</sup>, el crecimiento micelial de *A. alternata* se inhibió al 100 % con 1 mg L<sup>-1</sup>, resultados comparados con Vasilescu *et al.* (2004) quienes reportan CE<sub>50</sub> 0.09-0.59 mg L<sup>-1</sup> para *A. alternata* aislada de semillas de rábano. Cristóbal *et al.* (2013), reportan inhibición del 75-95 % de *Alternaria* sp. usando 700 ppm. *Bipolaris cynodontis*: DE<sub>50</sub> 0.018 mg L<sup>-1</sup> e inhibición al 100 %. *Fusarium incarnatum*: DE<sub>50</sub> 0.004 mg L<sup>-1</sup> y el crecimiento micelial se inhibió al 100 % resultados similares reportan Romero *et al.* (2015), DL<sub>50</sub> de 0.0042 mg L<sup>-1</sup> para *Fusarium solani*. Procloraz presento una efectividad promedio del 94 %, este fungicida pertenece al grupo químico de los Imidazoles, es de acción preventiva, translaminar, sistémica y

curativa. Actúa inhibiendo la biosíntesis del Ergosterol, componente de la membrana celular fúngica relacionado con el crecimiento y división celular (Tapia, 2005).

### 2.5.5 Respuesta al Tiabendazol

*Alternaria alternata*: la  $DE_{50}$  mayor a  $5 \text{ mg L}^{-1}$  superando la máxima concentración evaluada que sólo inhibió el 7.2 % del crecimiento micelial. *Bipolaris cynodontis*: la  $DE_{50}$  mayor a  $5 \text{ mg L}^{-1}$ , solo logró inhibir el 4.5% del crecimiento micelial. Resultados obtenidos por Herrera *et al.* (2011), con dosis de  $600 \text{ mg L}^{-1}$ , sólo inhibió el 36.61 % del crecimiento micelial de *A. alternata* aislada de *Thevetia peruviana*. Cristóbal *et al.* (2013) utilizaron una dosis de 500 ppm y reportan inhibición del 33 % de *Alternaria* sp. *Fusarium incarnatum*:  $DE_{50}$   $2.66 \text{ mg L}^{-1}$  e inhibición al 100 % con la máxima concentración evaluada. Resultados similares obtiene Merlington (2014) que reporta  $CE_{50} < 5 \text{ mg L}^{-1}$  para aislados de *Fusarium incarnatum-equiseti* obtenidos de tubérculos de papa. Tiabendazol resulto efectivo solo para controlar el crecimiento de *Fusarium*, pero no para *Alternaria* y *Bipolaris*, este mismo efecto se observó con Benomilo, debido a que pertenecen al mismo grupo químico de los bezimidazoles y comparte similitud en el modo de acción.

### 2.5.6 Respuesta al Tiofanato metílico

*Alternaria alternata*:  $DE_{50}$   $0.77 \text{ mg L}^{-1}$ . La máxima concentración evaluada ( $10 \text{ mg L}^{-1}$ ) inhibió al 100 % el crecimiento micelial. *B. cynodontis*:  $DE_{50}$   $0.49 \text{ mg L}^{-1}$ , inhibición del crecimiento micelial al 100 %. *F. incarnatum*:  $DE_{50}$   $0.28 \text{ mg L}^{-1}$ . Tiofanato metílico presento alta efectividad (96 %) de control contra los tres aislados. Es un fungicida sistémico (movimiento en la planta a través del xilema), preventivo: causa anormalidades en la germinación de esporas,

interfiere en la mitosis y la síntesis del DNA de las células fúngicas. El tratamiento a semillas controla patógenos de la raíz como *Rhizoctonia* y *Fusarium* spp.

### 2.5.7 Respuesta a *Bacillus subtilis*

La mínima concentración evaluada (0.005 mg L<sup>-1</sup>) inhibe más del 90 % del crecimiento micelial de los tres hongos. ***Alternaria alternata***: DE<sub>50</sub> 0.00015 mg L<sup>-1</sup>, a partir 0.05 mg L<sup>-1</sup> se inhibió el crecimiento micelial en 93 % el cual representó el mayor efecto control alcanzado. ***Bipolaris cynodontis***: DE<sub>50</sub> 0.00023 mg L<sup>-1</sup> e inhibición al 100 %. ***Fusarium incarnatum***: DE<sub>50</sub> 0.00014 mg L<sup>-1</sup> e inhibición al 100 % a partir de 0.01 mg L<sup>-1</sup>. Romero *et al.* (2015) obtuvieron datos similares con concentración de 0.01 mg L<sup>-1</sup> en *Fusarium solani*, aislado de frutos de chayote. Song *et al.* (2014), reportan el control efectivo del 70 % de *F. incarnatum* causante de la pudrición de raíz del Giseng, usando *Bacillus subtilis* a concentración de 1 x 10<sup>6</sup> UFC. Se ha demostrado que *B. subtilis* libera numerosos compuestos antifúngicos pertenecientes los Lipopéptidos (Bottero *et al.*, 2017), con capacidad de inhibir el crecimiento de patógenos. Estos compuestos tienen múltiples mecanismos de acción alterando procesos celulares como la homeostasis intracelular de calcio, metabolismo energético y procesamiento del RNA (Villareal *et al.*, 2018).

Cuadro 2. 2. Efectividad de los fungicidas, prueba *in vitro* de sensibilidad de *Alternaria alternata*, *Bipolaris cynodontis* y *Fusarium incarnatum* aislados de semilla comercial de pasto Banderita *Bouteloua curtipendula*.

Fungicida	Concentración mg L <sup>-1</sup>	% de Inhibición		
		<i>A. alternata</i>	<i>B. cynodontis</i>	<i>F. incarnatum</i>
Captan	0.1	0.00	0.00	2.30
	0.5	0.00	0.43	6.40
	1	3.57	7.23	8.60
	5	7.40	17.57	10.03
	10	8.00	19.73	51.53
	100	77.00	100	89.53
	200	83.33	100	97.77

Mancozeb	1	14.33	7.93	1.67
	150	84.50	100	84.3
	250	84.53	100	91.67
	300	85.00	100	93.00
Benomilo	1	2.20	21.50	5.03
	5	5.50	19.50	25.00
	10	7.70	18.37	46.30
	100	10.76	27.67	100
Procloraz	0.001	6.63	24.67	22.47
	0.01	37.63	41.47	67.87
	0.1	56.27	80.00	78.37
Tiabendazol	1	84.10	100	100
	0.1	0.00	0.00	0.00
	0.5	0.00	0.00	1.43
	1	1.50	1.23	53.07
Tiofanato metilico	5	7.17	4.47	100
	0.01	0.00	0.00	9.93
	0.05	0.00	4.20	15.13
	0.1	0.00	7.90	29.83
	0.5	40.23	-	50.17
	1	52.53	76.13	62.50
	5	57.47	-	65.00
<i>Bacillus subtilis</i>	10	100	100	88.53
	0.005	90.23	94.67	96.90
	0.01	92.03	100	100
	0.05	93.00	100	100
	1	93.00	100	100

Cuadro 2. 3 Comparación de medias de la máxima efectividad por fungicida en la inhibición del crecimiento micelial de *Alternaria alternata*, *Bipolaris cynodontis* y *Fusarium incarnatum* aislados de semilla comercial de pasto Banderita *Bouteloua curtipendula*

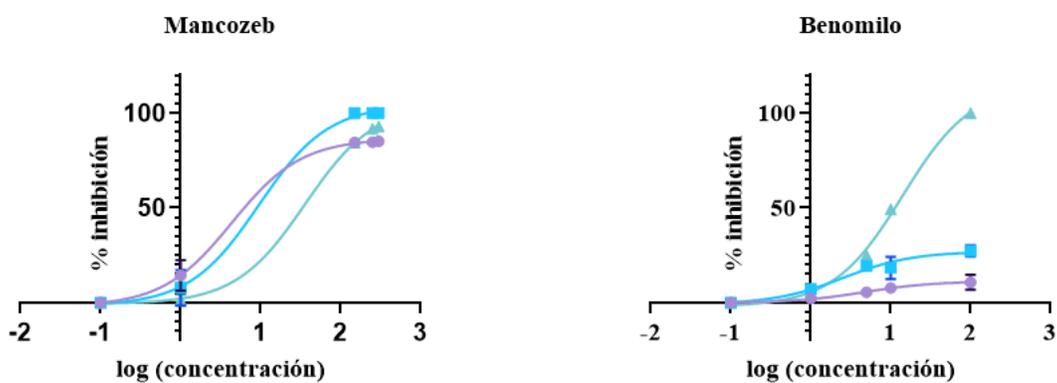
	Inhibición					
	Captan	Mancozeb	Benomilo	Procloraz	Tiabendazol	Tiofanato M.
<i>A. alternata</i>	83.33c	85.00c	10.76e	84.10c	1.17ef	100a
<i>B. cynodontis</i>	100a	100a	27.37d	100a	4.47f	100a
<i>F. incarnatum</i>	97.76a	93.00b	100a	100a	100a	90.33b

\*Medias con la misma literal son estadísticamente iguales.

Cuadro 2. 4. Dosis que inhibe el 50 % del crecimiento micelial  
 $DE_{50}$  mg L<sup>-1</sup>

Fungicida	<i>A. alternata</i>	<i>B. cynodontis</i>	<i>F. incarnatum</i>
Captán	61.90	37.44	16.48
Mancozeb	4.40	9.50	36.00
Benomilo	>100	>100	14.50
Procloraz	0.014	0.018	0.004
Tiabendazol	>5.00	>5.00	2.66
Tiofanato M.	0.77	0.49	0.28
Bacillus	0.00015	0.00023	0.00014

En la Figura 2.1 se representa el comportamiento dosis-respuesta, obtenida de cada concentración del fungicida y el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial del hongo. Las concentraciones evaluadas (eje de las “x”) están representadas por su análogo logarítmico, dando como resultado la línea sigmoidea en las gráficas (Fig 2.1).



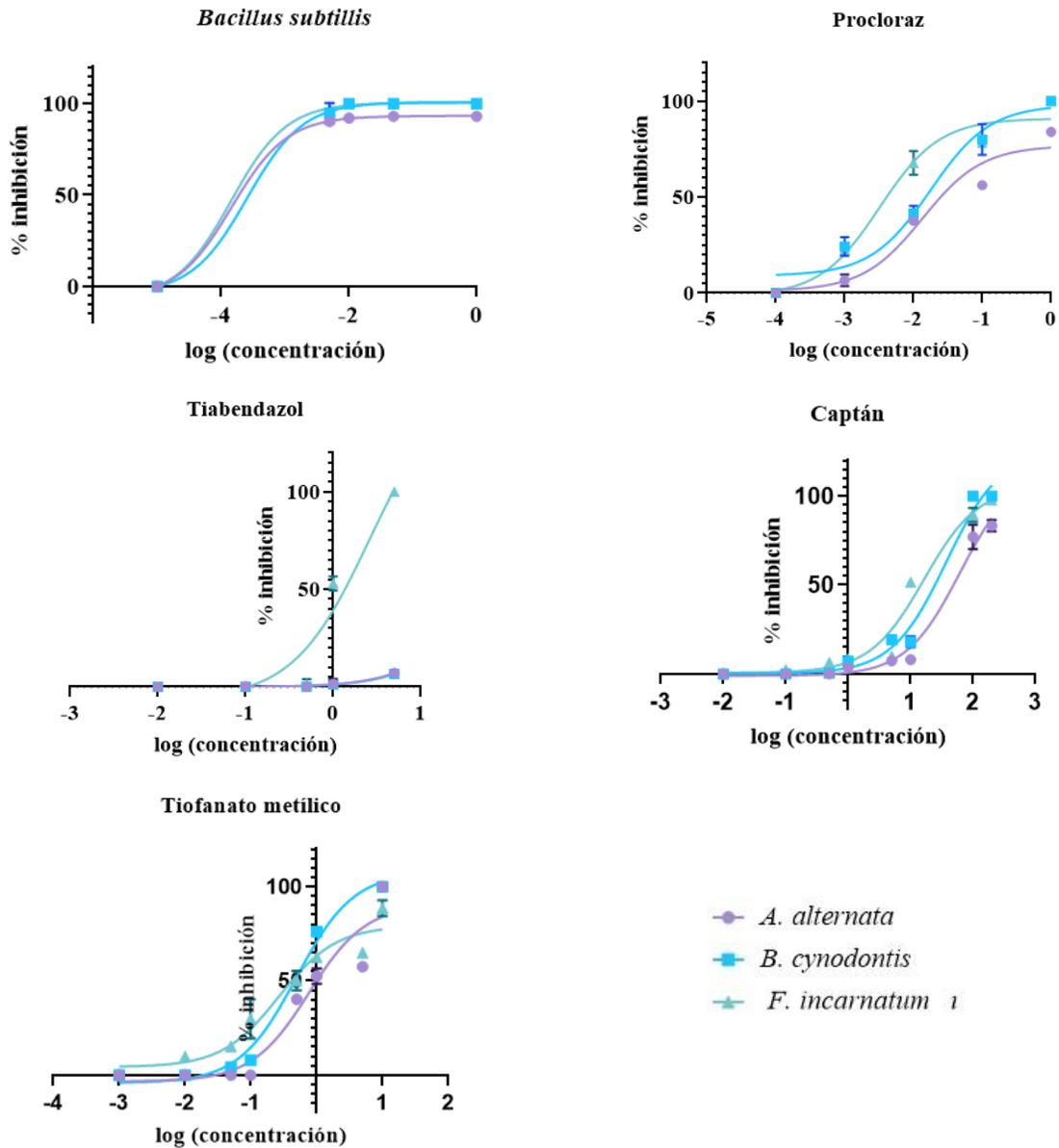


Figura 2. 1 Gráficas dosis - inhibición de los fungicidas contra *Alternaria alternata*, *Bipolaris cynodontis* y *Fusarium incarnatum* aislados de semilla comercial del pasto Banderita. Gráficas obtenidas con el programa Graphad Prism 8.2.

Los resultados muestran la efectividad de los fungicidas evaluados para controlar a los tres tipos de hongos, con excepción de benomilo y tiabendazol. La combinación de fungicidas contacto

+ sistémico es una práctica común que complementan el tratamiento asegurando la protección de la semilla y su germinación suprimiendo la acción de hongos patógenos (Arriagada, 2012).

## 2.6 CONCLUSIONES

Los valores obtenidos para DE<sub>50</sub> de *Alternaria alternata*, *Bipolaris cynodontis* y *Fusarium incarnatum* variaron dependiendo del hongo y el fungicida; por lo tanto, se recomienda usar la DE<sub>50</sub> con mayor concentración del fungicida, para asegurar efectividad al 50 %.

Los fungicidas de contacto Captán y Mancozeb; y los fungicidas sistémicos Procloraz y Tiofanato metílico son efectivos para el control de *Alternaria alternata*, *Bipolaris cynodontis* y *Fusarium incarnatum*. Los fungicidas sistémicos inhiben el crecimiento micelial a partir de bajas concentraciones; lo anterior, en comparación con aquellas alcanzadas por Captan y Mancozeb.

No es recomendable el uso de Benomilo y Tiabendazol debido a la baja efectividad presentada.

El fungicida biológico *Bacillus subtilis* fue el de mayor efectividad, inhibiendo en 90% a partir de la mínima concentración evaluada, siendo una alternativa viable para el tratamiento de semillas por su potencial para controlar patógenos.

## 2.7 LITERATURA CITADA

- Arriagada RV. 2012. Semillas. Inspección, análisis, tratamiento y legislación. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA-O.E.A.) 115p. <http://repiica.iica.int/docs/bv/agrin/b/f03/XL2000600205.pdf> (consultada, diciembre 2018).
- Arshad M, Hussein N, Ali S, Khan J, Saleem K y Babar M. 2013. Behavior of *Bipolaris Orizae* at different temperatures, culture media, fungicides and rice germplasm for resistance. *Pakistan Journal of Phytopathology*, 25(01): 8-90. <https://www.pjp.pakps.com/index.php/PJP/article/view/15>.
- Bottero JY, Rose J, De Garidel C, Masion A, Deutsch T, Brochard G y Lanone S. 2017. SERENADE: Safer and ecodesign research and education applied to nanomaterial development, the new generation of materials safer by design. *Environmental Science: Nano*, 4(3), 526–538. Doi: 10.1039/C6en00282j.
- Cristóbal AJ, Navarrete MZ, Herrera PE, Mis MM, Tun SM y Ruiz SE. 2013. Hifomicetos asociados a plantas tropicales del estado de Yucatán, México: identificación genética y evaluación de fungicidas para su control. *Revista Protección Vegetal*, 28(2):138-144. [scielo.sld.cu/pdf/rpv/v28n2/rpv07213.pdf](http://scielo.sld.cu/pdf/rpv/v28n2/rpv07213.pdf).
- Herrera PE, Bacab PM, Alejo JC, Tun SM y Ruíz SE. 2011. Patogenicidad de *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. *Alternaria alternata* (Fries) Keissler en *Thevetia peruviana* (Pers.) K. Schum. y su control in vitro. *Fitosanidad*, 15(4):231-236. Disponible: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=209123682005>.
- Hopkins M. 2016. Consideraciones para comenzar bien con tratamiento de semillas. *Revista Hortalizas*, Publicación mensual-marzo (on line). (consultada, junio 2019) <https://www.hortalizas.com/proteccion-decultivos/tratamiento-de-semillas/>.
- Iacomini VB, Avenot H, Bataillé SN, Laurent E, Guénard M y Simoneau P. 2004. *In vitro* fungicide sensitivity of *Alternaria* species pathogenic to crucifers and identification of *Alternaria*

*brassicicola* field isolates highly resistant to both dicarboximides and phenylpyrroles. *Crop Protection*, 23(6), 481–488. Doi: 10.1016/j.cropro.2003.10.003.

Malandrakis AA, Apostolidou ZA, Markoglou A y Flouri F. 2015. Fitness and cross-resistance of *Alternaria alternata* field isolates with specific or multiple resistance to single site inhibitor and Mancozeb. *European Journal of Plant Pathology*, 142(3), 489-499. Doi: 10.1007/S10658-015-0628-5.

Mc Grath, MT. 2004. ¿Qué Son Los Fungicidas? Trad. Santamaria L y Ureta RJC. 2014. *The Plant Health*. Doi: 10.1094/phi-i-2004-0825-01. (consultada, agosto 2019).

Merlington, AA. 2014. Management options for control of *Fusarium* dry rot (*Fusarium* spp.) and potato common scab (*Streptomyces* spp.) of potato (*Solanum tuberosum* L.) in Michigan. Michigan State University. Thesis–Master of Science. (consulta, agosto 2019) <https://d.lib.msu.edu/etd/2476>.

Parveen, S, Ganie AA, y Wani AH. 2013. *In vitro* efficacy of some fungicides on mycelial growth of *Alternaria alternata* and *Mucor pyriformis*. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 46(10), 1230–1235. (consultada, agosto 2019) Doi: 10.1080/03235408.2013.763617.

Roede JR y Miller GW. 2014. Mancozeb. *Encyclopedia of Toxicology*, 144-146. (consulta, agosto 2018). Doi:10.1016/b978-0-12-386454-3.00157-3.

Romero VSD, Tlapal BB, Cadena IJ, Nieto D y Arévalo GL. 2015. Hongos causantes de enfermedades postcosecha en chayote (*Sechium edule* (Jacq.) Sw.) y su control *in vitro*. *Revista Agronomía Costarricense*, 39(2), 19-32, Disponible: [http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=s0377-94242015000200019&lng=en&tlng=es](http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=s0377-94242015000200019&lng=en&tlng=es).

Song M., Yun H Y, y Kim Y H. 2014. Antagonistic *Bacillus* species as a biological control of Ginseng root rot caused by *Fusarium* cf. *incarnatum*. *Journal of Ginseng Research*, 38(2), 136–145. Doi: 10.1016/j.jgr.2013.11.016.

Tapia C. 2005. Mecanismos de acción, reacciones adversas y nuevos antimicóticos. *Meadwave, Revista Biomédica*, 5(4): 3548. Doi: 105867/Medwave.2005.04.3548.

Villareal DF, Villa RE, Cira CL, Estrada AI, Parra CF y Santos VS. 2018. El género *Bacillus* como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad agrícola. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 36(1), 95-130. <https://dx.doi.org/10.18781/r.mex.fit.1706-5>.

## CONCLUSIONES GENERALES

Se determinó que las semillas evaluadas tienen baja calidad fitosanitaria. De los aislamientos obtenidos el 67 % correspondió al género *Alternaria*, 24% a *Fusarium* y 9% a *Bipolaris*. *Alternaria* y *Bipolaris* presentaron mayor incidencia en brácteas accesorias, y *Fusarium* en carióspsides.

Los patógenos identificados cultural y morfológicamente corresponden a *Alternaria alternata*, *A. tenuissinna*, *Fusarium incarnatum*, *F. scirpi* y *Bipolaris cynodontis* como los principales hongos asociados en semilla comercial del pasto Banderita (*Bouteloua curtipendula*) proveniente del Valle del Mezquital, Hidalgo. El análisis molecular y filogenético confirman la identificación morfológica.

La prueba de sensibilidad a fungicidas mostró que los aislados de *Alternaria alternata*, *Bipolaris cynodontis* y *Fusarium incarnatum* asociadas a semillas del pasto Banderita son sensibles Captán, Mancozeb, Procloraz, Tiofanato metílico y *Bacillus subtilis*; sin embargo, *A. alternata* y *B. cynodontis* presentaron resistencia a Benomilo y Tiabendazol.

Valores calculados para la dosis efectiva que inhibe el 50% del crecimiento micelial (DE<sub>50</sub>): Captán 16.48 a 61.90 mg L<sup>-1</sup>, Mancozeb 4.4 a 36.0 mg L<sup>-1</sup>, Procloraz 0.004 a 0.018 mg L<sup>-1</sup>, Tiofanato metílico 0.28 a 0.77 mg L<sup>-1</sup>, *Bacillus subtilis* 0.00014 a 0.00022 mg L<sup>-1</sup>, Benomilo 14.13 a > 100 mg L<sup>-1</sup> y Tiabendazol 2.66 a > 100 mg L<sup>-1</sup>.

Los fungicidas Captan, Mancozeb, Procloraz, Tiofanato metílico y *Bacillus subtilis* son efectivos para el control *Alternaria alternata*, *Bipolaris cynodontis* y *Fusarium incarnatum* ya que inhibieron el crecimiento micelial en más del 90 %. No es recomendable el uso de benomilo y tiabendazol debido a la baja efectividad presentada.

