



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO
POSTGRADO EN FITOSANIDAD
FITOPATOLOGÍA

**PIGMENTACIÓN DE *Fusarium verticillioides*
(Sacc.) COMO FACTOR DE VIRULENCIA EN
PLÁNTULAS DE MAÍZ EN MÉXICO**

ALMA ROSA SOLANO BÁEZ

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2010

La tesis titulada **PIGMENTACION DE *Fusarium verticillioides* (SACC.) NIREMBERG COMO FACTOR DE VIRULENCIA EN PLÁNTULAS DE MAÍZ EN MÉXICO**, realizada por la alumna ALMA ROSA SOLANO BÁEZ 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
FITOSANIDAD
FITOPATOLOGIA**

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO _____

DR. CARLOS DE LEÓN GARCÍA DE ALBA

ASESORA _____

DRA. GUADALUPE VALDOVINOS PONCE

ASESORA _____

DRA. HILDA VICTORIA SILVA ROJAS

Montecillo, Texcoco, Edo de México, Octubre de 2010.

AGRADECIMIENTOS

Primero quiero dar gracias al SER SUPREMO por todo lo que soy.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por financiar mis estudios de postgrado.

Al Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología (COMECYT) por financiar el final de esta investigación.

Al Dr. Carlos De León que me enseñó que *“Hacer preguntas es prueba de que se piensa”* (Rabindranath Tagore) pero sobre todo por la dirección en este proyecto y participación en mi formación personal y académica.

Dra. Guadalupe Valdovinos Ponce y Dra. Hilda Victoria Silva Rojas, por el tiempo dedicado, orientación y todas las aportaciones que hicieron a este proyecto de investigación.

M.C. Lauro Soto Rojas por la asesoría brindada en el desarrollo del análisis estadístico, pero más importante aun por tu amistad sincera, muchas gracias.

A mis colegas y amigos Guillermo Márquez, Leticia Robles, Alfricia Villamil Carmen Solano por su ayuda incondicional solo pienso que *“La verdadera amistad es como la fosforescencia, resplandece mejor cuando todo se ha oscurecido”* Rabindranath Tagore.

Culminar este proyecto no ha sido fácil y como en toda investigación el fruto recogido no puede atribuirse a una sola. Por eso agradezco el apoyo a todo el que me ha acompañado en este proceso, al personal académico y administrativo del Colegio de Postgraduados.

AGRADECIMIENTO

Con especial agradecimiento

A la familia Solano Báez:

Solo quiero expresar que no existirá forma de agradecer una vida de sacrificios, esfuerzos y amor, mis conceptos, mis valores morales y mi superación se las debo a ustedes, quiero que sientan que el objetivo alcanzado también es de ustedes y que la fuerza que me ayudo a conseguirlos fue su apoyo incondicional.

A Guillermo Márquez Licona quiero enfatizar que hoy es un día especial en mi vida, hace unos años conocí el amor de un ser especial, lleno de paz, sincera ternura y mucha fortaleza hoy quiero agradecerle por su tiempo, paciencia y dedicación, gracias por estar en todo momento conmigo, gracias por ser el complemento de mi vida.

Con mucho cariño y admiración.

DEDICATORIA

Dr. S. Gerardo Leyva Mir.

Ambiciona honor, no honores (Rabindranath Tagore).

Con gran respeto quiero dedicarle este trabajo A quien jamás encontraré la forma de agradecer

Quiero enfatizar la ayuda que me brindo para cada día cruzar con firmeza el camino de la superación, porque con su guía, apoyo y aliento, he logrado uno de mis más grandes anhelos.

Con agradecimiento infinito.

Alma Rosa Solano Báez

CONTENIDO

CONTENIDO	I
INDICE DE CUADROS	III
INDICE DE FIGURAS	IV
RESUMEN	VII
SUMMARY	VIII
I. INTRODUCCIÓN	1
II. HIPÓTESIS.....	2
III. OBJETIVOS	2
IV. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
4.1 Importancia del maíz	3
4.2 Patógenos asociados a pudrición de plántulas de maíz.....	3
4.2.1 Sintomatología.....	4
4.2.2 Características morfológicas de <i>F. verticillioides</i>	4
4.2.3 Patogenicidad	5
4.3. Pigmentos producidos por diferentes especies de <i>Fusarium</i>	5
V. MATERIALES Y MÉTODOS	9
5.1 Colecta de muestras	9
5.2 Aislamiento del patógeno	9
5.3 Caracterización morfológica	9
5.4 Ubicación filogenética	10
5.4.1 Extracción de DNA genómico	10
5.4.2 Amplificación por PCR del DNA ribosomal.....	11
5.5 Clasificación por pigmentación	12
5.6 Concentración de papa en medio de cultivo PDA	13
5.7 Prueba de patogenicidad.....	13
VI. RESULTADOS	16
6.1 Caracterización morfológica	16

6.2 Ubicación filogenética	19
6.3 Clasificación por pigmentación	20
6.3.1 Medición de color con espectrofotómetro.....	23
6.3.2 Efecto de la concentración de papa en medio de cultivo PDA sobre la pigmentación del micelio de <i>F. verticillioides</i>	24
6.4 Prueba de Patogenicidad.....	27
VII. DISCUSIÓN.....	35
VIII. CONCLUSIONES.....	39
IX. LITERATURA CITADA.....	40

INDICE DE CUADROS

- Cuadro 1.** Comparación morfológica de cuatro aislamientos obtenidos de semillas con y sin síntomas de infección causados por *F. verticillioides* (Sacc.) Nirenberg..... **16**
- Cuadro 2.** Significancia de las fuentes de variación para medir los efectos del aislamiento sintomático y asintomático, concentración de inóculo y color, sobre la virulencia en área foliar y el peso de raíz de plántulas de maíz en invernadero, Montecillo, Texcoco, México. **27**
- Cuadro 3.** Medias del porcentaje de infección de *F. verticillioides* en el área foliar y peso de raíz (g) de plántulas de maíz, bajo invernadero, Montecillo, Texcoco, México. **29**
- Cuadro 4.** Comparación de medias del porcentaje de infección y disminución de peso de raíz por aislamientos de *F. verticillioides* obtenidas de semillas sintomáticos y asintomáticos..... **30**
- Cuadro 5.** Medias del % de infección y disminución de peso de raíz causado por micelios de color blanco ó morado de *F. verticillioides*..... **30**
- Cuadro 6.** Significancia de las fuentes de variación para medir los efectos de la interacción aislamiento sintomático y asintomático con color micelial, sobre la virulencia en área foliar y peso de raíz de plántulas de maíz en invernadero, Montecillo, Texcoco, México. . **33**
- Cuadro 7.** Medias de la disminución del peso de raíz, causado por micelios de color blanco ó morado obtenidos de semillas con y sin síntomas de infección de *F. verticillioides* y sin síntomas de infección. **34**

INDICE DE FIGURAS

Fig. 1 Estructura química de anhydrofusarubin.....	6
Fig. 2. Estructura química de fusaroskyrin	6
Fig. 3. Estructura química de fusarubin, oxyjavanicin.....	6
Fig. 4. Estructura química de isomarticin	7
Fig.5. Estructura química de javanicin solanione.....	7
Fig.6. Estructura química de 8-0- Methylfusarubin.....	8
Fig. 7. Estructura química de 8-0- methyljavanicin.....	8
Fig. 8. Proporciones de hongo/ suelo, utilizadas en la prueba de patogenicidad.....	14
Fig. 9. Escala de severidad foliar; A; Plántula sana (testigo =1), B; Plántula de tamaño reducido = 2, C-D; Planta con clorosis y/o tamaño reducido = 3. E, F; Plántula con hojas atizonadas y/o enrollamiento foliar= 4, G; Plántula muerta = 5.	15
Fig. 10. Morfología de aislamiento obtenido de semilla con síntomas de infección. A: micelio morado; B: hifas hinchadas; C: microconidios en cadena larga; D: croconidios; E: monofiálide. Barras = 10 µm.....	17
Fig. 11. Morfología de aislamiento obtenido de semilla con síntomas de infección. A: micelio blanco; B: hifas hinchadas; C: microconidios en cadena larga; D: microconidios; E: monofiálide Barras =10 µm.	17
Fig. 12. Morfología del aislamiento obtenido de semilla sin síntomas de infección. A: micelio morado; B: hifa hinchada; C: microconidios en cadena larga; D: microconidios; E: monofiálide. Barras = 10 µm.	18
Fig. 13. Morfología del aislamiento obtenido de semilla sin síntomas de infección. A: micelio blanco; B: hifa hinchada; C: microconidios; D: monofiálide; E: microconidios en cadena larga. Barras = 10 µm.	18
Fig. 14. Árbol filogenético construido con secuencias correspondientes al Espacio Transcrito Interno (ITS) usando el método de Máxima Parsimonia con 1000 repeticiones Bootstrap.	19

Fig. 15. Coloración micelial en diferentes generaciones de cultivos monospóricos obtenidos de semillas sintomáticas con micelio blanco (A- D: generación 1, 2, 3 y 4, respectivamente) y semillas asintomáticas con micelio morado (E-H: generación 1, 2, 3, 4, respectivamente).	21
Fig. 16. Coloración micelial en diferentes generaciones de cultivos monospóricos provenientes de semillas asintomáticas con micelio blanco (A- D: generación 1, 2, 3 y 4, respectivamente) y semillas asintomáticas con micelio morado. (E-H: generación 1, 2,3 y 4 respectivamente).	22
Fig. 17. Lecturas de absorbancia tomadas a 550nm. Barra blanca izquierda: micelio blanco obtenido de semilla sintomática; barra oscura izquierda: micelio morado obtenido de semilla sintomática; barra blanca derecha: micelio blanco de semilla asintomática; barra oscura derecha micelio purpura de semilla asintomática.....	23
Fig. 18. Cepas de semillas sintomáticas. Crecimiento micelial cinco días después de la siembra.....	25
Fig. 19. Cepas de semillas asintomáticas. Crecimiento micelial cinco días después de la siembra.....	25
Fig. 20. Cepas de semillas sintomáticas. Crecimiento micelial treinta días después de la siembra.....	26
Fig. 21. Cepas de semillas asintomáticas. Crecimiento micelial treinta días después de la siembra.....	26
Fig. 22. Plántulas del tratamiento 1, sustrato con 0% de inóculo.....	31
Fig. 23. Plántulas del tratamiento con 100% de inóculo obtenido de semillas sintomáticas con micelio blanco.	31
Fig. 24. Plántulas del tratamiento con 100% de inóculo obtenido de semillas sintomáticas con micelio morado.....	32
Fig. 25. Plántulas del tratamiento con 100% de inóculo obtenido de semillas asintomáticas con micelio blanco.	32

Fig. 26. Plántulas del tratamiento con 100% de inóculo obtenido de semillas asintomáticas con micelio morado.**32**

Fig. 27. Disminución del peso de raíz causado por aislamientos de semillas sintomáticas y asintomáticas con micelio color morado ó blanco de *F. verticillioides*.**34**

**PIGMENTACION DE *Fusarium verticillioides* (SACC.) Nirenberg
COMO FACTOR DE VIRULENCIA EN PLÁNTULAS DE MAÍZ EN
MÉXICO.**

Alma Rosa Solano Báez, MC.

Colegio de Postgraduados, 2010.

Existen antecedentes de que los pigmentos producidos por especies de *Fusarium* tienen efecto fitotóxico en plantas hospedantes de este patógeno, son inhibidores de germinación de semillas, además de actividad antibacteriana. La influencia que pudieran tener en la virulencia aun no se define, por lo que en esta investigación se obtuvieron mazorcas de maíz, asintomáticas y con síntomas de pudrición de mazorca que fueron colectadas en el ciclo primavera-verano de 2008 del estado de Veracruz México. Se comparó la patogenicidad de los aislamientos de este hongo con micelio color blanco, rosado o morado. También, se compararon diferentes concentraciones de papa en medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA) para observar el efecto en la pigmentación de los aislamientos. Las muestras del hongo se identificaron morfológicamente con técnicas convencionales y se determinó que era *F. verticillioides*. Para la ubicación filogenética, se amplificó la región del espaciador interno transcrito (ITS). Se amplificó la región 28S RNAr, ubicando a los aislamientos dentro del complejo de la especie *Gibberella fujikuroi*. Para deliberar entre especies fue necesario amplificar el espacio intergenico (IGS), los aislamientos de semillas sintomáticas corresponden a *F. verticillioides* mientras que los aislamientos de semillas asintomáticas corresponden a otra especie dentro del complejo *G. fujikuroi*. Las diferencias de color de micelio se midieron con un espectrofotómetro calibrado a 550 nm, los valores más altos de absorbancia ocurrieron en los aislamientos con color morado intenso. La concentración de papa mostró tener influencia en la pigmentación. Con 50 g L⁻¹, la pigmentación de los aislamientos con micelio morado fue más intensa y los aislamientos con micelio blanco mostraron un color más homogéneo. Los aislamientos de las semillas sintomáticas y asintomáticas fueron patógenos, el aislamiento color morado de semillas sintomáticas fue más virulento que el aislamiento blanco, caso contrario en el aislamiento de semillas asintomáticas donde el blanco fue más virulento.

Palabras clave. semillas sintomáticas, asintomáticas, morfología, filogenia

PIGMENTATION OF *Fusarium verticillioides* (Sacc.) AS FACTOR OF VIRULENCE IN SEEDLINGS OF MAIZE IN MEXICO.

Alma Rosa Solano Báez, MC.

Colegio de Postgraduados, 2010.

There are precedents that the pigments produced by *Fusarium* species have phytotoxic effect on hosts of this pathogen, are inhibitors of seed germination, as well as antibacterial activity. The influence of the pigmentation in virulence on maize seedlings still not defined, so in this investigation from corn cobs asymptomatic and symptoms of ear rot, compared the pathogenicity and virulence of monospore isolates with mycelium color white, pink or purple. Different concentrations of culture media Potato-Dextrose-Agar (PDA) were evaluated to observe the pigmentation of the isolations. Monospore isolates were identified morphologically using conventional techniques and was determined to *F. verticillioides* as the causal agent of ear rot. The phylogenetic location was realized by the amplification of the region of internal transcribed spacer (ITS) and of the gene 28S rRNA, placing the isolates inside of species of the *Gibberella fujikuroi* complex. Symptomatic seeds isolates corresponded to *F. verticillioides* whereas the asymptomatic seeds isolations belong to another species inside the *G. fujikuroi* species complex, it was determined by the amplification of the intergenic spacer (IGS). The mycelium color differences were measured with a spectrophotometer calibrated at 550 nm, this high absorbance values were observed in isolates deep purple color. Potato concentration had influence in the pigmentation. With smaller amount of potatoes the pigmentation of the purple isolates was intense purple and the white isolates showed a uniform color. The isolates from symptomatic and asymptomatic seeds were pathogenic, the purple isolation of symptomatic seeds were more virulent than white isolation, otherwise in isolations of asymptomatic seeds the white isolation were more virulent.

Key words: ear rot, symptomatic seeds, asymptomatic seeds, morphology, phylogeny

I. INTRODUCCIÓN

El maíz es uno de los cereales de mayor producción y consumo a nivel mundial. Comparativamente, el cultivo posee un valor nutritivo superior al de la harina de trigo y sólo ligeramente inferior al del arroz (FAO, 1993).

En México, el cultivo de maíz ocupa anualmente una superficie de aproximadamente 8 millones de hectáreas y se cultiva bajo diferentes regímenes de humedad, incluyendo riego y temporal (Oropeza y Molina, 2004).

Al ser una planta cultivada, el maíz no escapa del ataque de patógenos que reducen su producción (Eubanks, 2001), como es el caso de *Fusarium verticillioides* población A (Sacc.) Nirenberg [Teleomorfo: *Gibberella fujikuroi* (Sawada) Wr. Ito in Ito and Kimura] sin. *Fusarium moniliforme* (Sheldon) (Whalley, 2003).

A nivel mundial, esta especie causa pudrición de mazorca y tallo, así como tizón en las plántulas (CIMMYT, 2004). Además de causar efectos negativos en la producción y calidad de la semilla, el hongo es de gran importancia por la producción de micotoxinas como las fumonisinas B1 y B2. (Vigier *et al.*, 1997).

Las especies del género *Fusarium* sintetizan metabolitos que se clasifican con base en la actividad biológica, estos metabolitos son pigmentos, micotoxinas, antibióticos, di y tri-terpenoides, y compuestos con estructura de anillo cuya actividad biológica no ha sido estudiada (Chelkowski, 1989; Nelson, 1992).

Algunos aislamientos de *F. verticillioides* presentan variaciones en medio de cultivo PDA (papa-dextrosa-agar) (Klittich and Leslie, 1992), al secretar pigmentos que van del color violeta a morado intenso (Levic *et al.*, 1994). Dichos pigmentos tienen propiedades antibacterianas (Visconti *et al.*, 1983), fitotóxicas (Miller, 1961), inhiben la germinación de semillas (Kimura *et al.*, 1981) y actúan como promotores de crecimiento al ser

ingeridos por insectos (Jayaraman and Parihar *et al.*, 1975). No obstante, el efecto como factor de virulencia del pigmento producido por *Fusarium* aún no está bien definido (Golin´ski *et al.*, 1991; Klittich y Leslie, 1992; Medentsev *et al.*, 2005). Se considera que los aislamientos de *F. verticillioides* que produce pigmentos en medio de cultivo PDA, son más virulentos que los que no producen (Kimura *et al.*, 1981; Visconti *et al.*, 1983).

II. HIPÓTESIS

La pigmentación de los aislamientos obtenidos de semillas con y sin síntomas de pudrición de mazorca, influirá en la virulencia sobre plántulas de maíz.

III. OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar la relación entre el color del pigmento producido por aislamientos de *F. verticillioides* y la virulencia en plántulas de maíz.

Objetivos particulares

- Identificar los aislamientos obtenidos de semillas de maíz con y sin síntomas de pudrición de mazorca.
- Comparar la patogenicidad entre aislamientos obtenidos de semillas de maíz con y sin síntomas de pudrición de mazorca.
- Comparar la virulencia entre aislamientos con micelio blanco y pigmentados (micelio morado), obtenidos de semillas de maíz con y sin síntomas de pudrición de mazorca.
- Determinar si la concentración de papa (*Solanum tuberosum*) en medio de cultivo papa- dextrosa-agar (PDA) influye en la pigmentación de los aislamientos.

IV. REVISIÓN DE LITERATURA

4.1 Importancia del maíz

El maíz es uno de los tres cereales más importante del mundo (Torrent, 2008). El maíz se originó en América antes del año 5 000 A.C. Durante varios miles de años fue seleccionado por los pueblos indígenas en diferentes aéreas geográficas lo que resultó en un gran número de variedades (White, 2004).

En México, la producción de maíz blanco representa el 63 y 66 % de la producción agrícola total en términos de volumen y valor, respectivamente.

Se calcula que entre 2.5 y 3 millones de productores están directamente relacionados con la producción de maíz blanco en México. Hasta unos 18 millones de personas dependen de la producción de maíz. El Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) reportó para el ciclo agrícola 2008 un rendimiento de 3.32 ton ha⁻¹ (López, 2003).

4.2 Patógenos asociados a pudrición de plántulas de maíz.

Todos los órganos de la planta de maíz son susceptibles al ataque de patógenos que reducen la capacidad de la planta para crecer de manera normal, provocando la pérdida de la cosecha del grano (Peiretti-Uzal *et al.*, 2007).

F. verticillioides población A (*sin. F. moniliforme*) (Teleomorfo: *G. fujikuroi*) y *G. zea* (Anamorfo: *F. graminearum*) causan tizón en plántulas y pudriciones en tallo y mazorca (Schulthess *et al.*, 2002).

4.2.1 Sintomatología.

Los síntomas producidos por *F. verticillioides* semejan a aquellos causados por *Stenocarpella* y *Cephalosporium* y no se les puede distinguir hasta que son visibles las estructuras fructíferas, las cuales producirán conidios (Bressan and Figueiredo, 2005).

Las plantas infectadas por *F. verticillioides* se marchitan, permanecen erectas cuando se secan y aparecen lesiones pequeñas de color café oscuro en los entrenudos inferiores, en un corte vertical, se observa oscurecimiento del sistema vascular. En las etapas finales de la infección la médula es destruida (De León, 2004).

En semillas, el primer signo de infección es la formación de micelio blanco que desciende de la punta de la mazorca y da una coloración rosada y morada a las semillas infectadas (Peiretti-Uzal *et al.*, 2007).

A diferencia de *G. zeae*, el daño que causa *F. verticillioides* se manifiesta principalmente en granos individuales o en ciertas áreas limitadas de la mazorca. Los granos infectados desarrollan un micelio algodonoso o rayas blancas en el pericarpio y germinan estando aún en el olote. (Nelson, 1992).

4.2.2 Características morfológicas de *F. verticillioides*

El hongo presenta conidiogénesis enteroblástica fialídica con producción de microconidios en cadena (Glenn *et al.*, 2004). La célula basal de los macroconidios no forma pie y la célula apical está curvada. Los microconidios son de forma oval y sin septos, pueden estar en pequeños agregados. No se producen clamidosporas, sólo hinchamiento de hifas (Nelson *et al.*, 1990). El crecimiento en medio de cultivo en PDA se caracteriza por desarrollar coloración morado púrpura (Leslie and Summerell, 2006).

4.2.3 Patogenicidad

La enfermedad, ocasionada por *F. graminearum* ha tenido un mejor desarrollo que *F. verticillioides*. Año con año hay una alta variabilidad en la expresión de las enfermedades y esto depende, entre otros factores, de las condiciones de humedad en campo. (Stewart, 2002).

Cuando *F. verticillioides* infecta la variación genética ocurrida en áreas pequeñas de la mazorca, indica infecciones independientes de diferentes fuentes de inóculo. También indica que la presencia de genotipos múltiples del hongo en áreas pequeñas, provee más oportunidades de recombinación genética mediante reproducción sexual y así, el hongo puede ganar virulencia (Walker, 2001).

La virulencia, es influenciada por fitotoxinas muy potentes, incluyendo los tricotecenos producidos por *Fusarium* (Harris *et al.*, 1999). Señalando que la virulencia es considerada como un componente de la patogenicidad y definida como grado o medida relativa de esta (D'Arcy *et al.*, 2001).

4.3. Pigmentos producidos por diferentes especies de *Fusarium*.

En *F. verticillioides* los pigmentos se producen gracias a la presencia activa de la vitamina A, ya que los carotenoides pueden estar presentes pero inactivos (Miller, 1961). A continuación se enuncian diferentes pigmentos producidos por algunas especies de *Fusarium*:

Anhydrofusarubin (Fig.1). Características; $C_{15}H_{12}O_6$; peso molecular; 288, absorbanza λ_{max} 295, ~ 460, 500, 535, ~ 585 nm. Este pigmento, producido por la cepa 47 de *F. solani*, tiene actividad insecticida contra *Calliphora erythrocephala*, además de un comportamiento similar al fusarubin (Gerber and Mokhtar, 1979).

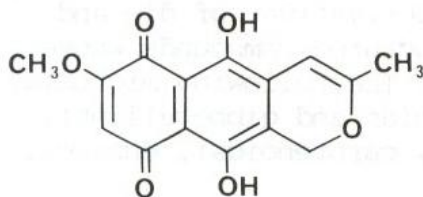


Fig. 1 Estructura química de Anhydrofusarubin

Fusaroskyrin (Fig. 2) (4, 4', 5, 5', 8, 8'- hexahydroxy-2-2'-dimethoxy-7, 7'-dimethyl -1, 1'-dianthraquinone). Características; $C_{32}H_{22}O_{12}$; peso molecular 598; Cristales rojos, absorbancia $\lambda_{max}^{CHCl_3}$ 256, 276, 305-310, 505 nm. Producido por *Fusarium* sp. Causa en soya la enfermedad del moteado purpura (Elix *et al.*, 2002).

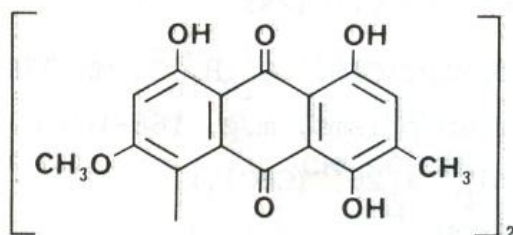


Fig. 2. Estructura química de fusaroskyrin

Fusarubin y oxyjavanicin (Fig.3). Características; $C_{15}H_{14}O_7$; peso molecular 306; Prismas rojos; absorbancia $\lambda_{max}^{CHCl_3}$ 303, 505 nm. Producidos por *F. javanicum* y *F. solani* respectivamente, los pigmentos inhiben a *Staphylococcus* sp., son fitotóxico en tomate de corte a 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Tienen una DL_{50} de, 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ sobre *Botrytis allii* Munn (Phelps *et al.*, 1990), son asociados a la decarboxilación anaeróbica del piruvato, a una concentración de 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Kurobane *et al.*, 1980).

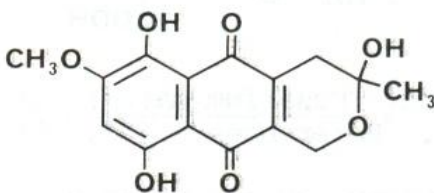


Fig. 3. Estructura química de fusarubin, oxyjavanicin

Isomarticin (Fig.4). Características; $C_{18}H_{16}O_9$; peso molecular 376; Prismas café; absorbancia λ_{max}^{EtOH} 227, 306, 497 nm. Es producido *F. martii* var. Pisi; es fitotóxico en tomate de corte a 8 $\mu\text{g/g}$. Posee una $DL_{50} \geq 500$ $\mu\text{g/ml}$ contra *Botrytis allii* Munn. A una concentración de 7 $\mu\text{g/ml}$ inhibe a *Bacillus subtilis*, inhibe la decarboxilación anaeróbica del piruvato a 248 $\mu\text{g/ml}$ (Phelps *et al.*, 1980).

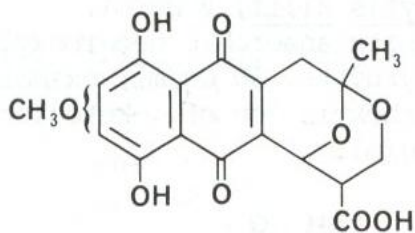


Fig. 4. Estructura química de isomarticin

Javanicin, (Fig.5) (5,8-dihydroxy-6-methoxy-2-methyl-3,2'-oxo-propyl-1,4-naphthaquinone). Características; $C_{15}H_{14}O_6$; peso molecular 299; Cristales rojos; absorbancia $\lambda_{max}^{CHCl_3}$ 307, 510 nm. Es producido por *F. javanicum* y *F. solani*. Tienen actividad antibiótica en microorganismos Gram positivos y ácidos grasos y fitotoxicidad en tomate de corte a 60 $\mu\text{g/ml}$ (Miller, 1961).

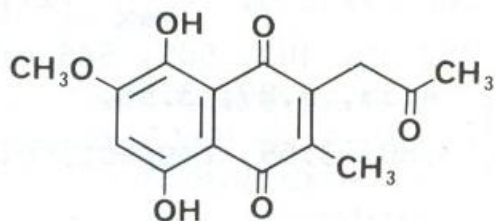


Fig.5. Estructura química de javanicin solanione.

El 8-0- Methylfusarubin (Fig.6). Características; $C_{16}H_{16}O_7$; peso molecular 320; absorbancia λ_{max} 226, 282.5, 484, 510, 550 nm. Producido por *F. verticillioides* (Kimura *et al.*, 1981) y *F. subglutinans* (Visconti *et al.*, 1983).

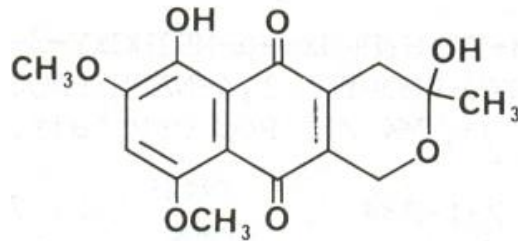


Fig.6. Estructura química de 8-0- Methylfusarubin.

8-0- methyljavanicin (Fig.7.). Características; $C_{16}H_{16}O_6$; peso molecular 304; absorbancia λ_{max} 226, 282.5, 482, 510, 550 nm. Es producido por *F. verticillioides* y *F. solani* en altas concentraciones inhibe la germinación de semillas de lechuga (Kimura *et al.*, 1981).

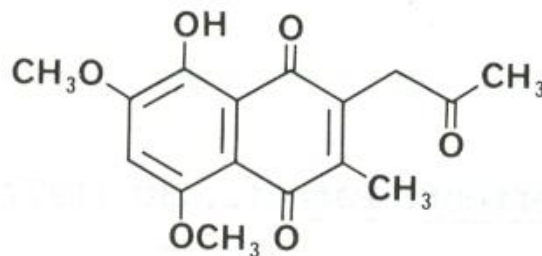


Fig. 7. Estructura química de 8-0- methyljavanicin

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Colecta de muestras

Se colectaron mazorcas de maíz en el Estado de Veracruz, México durante el ciclo agrícola primavera- verano 2008. De las cuales, se tomaron cien semillas con síntomas y cien sin síntomas de infección por pudrición de mazorca. El material se analizó en el laboratorio de Enfermedades de Frutos en Postcosecha ubicado en el Postgrado en Fitopatología del Colegio de Postgraduados en Montecillo, Estado de México.

5.2 Aislamiento del patógeno

Se desgranaron las mazorcas y las semillas se desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio al 1.5%, por tres minutos. Posteriormente, se enjuagaron dos veces con agua destilada estéril y se colocaron en cámara húmeda para promover el crecimiento micelial. Del crecimiento obtenido se hizo una suspensión de conidios para obtener cultivos monospóricos en cajas de Petri con medio de cultivo PDA. Las cajas de Petri en donde se presentó buen crecimiento micelial se utilizaron para transferir a nuevas cajas de Petri con PDA con el propósito de incrementar al patógeno.

5.3 Caracterización morfológica

Se realizó la identificación morfológica de los aislamientos de acuerdo con, Booth 1971; Nelson *et al.*, 1983; Marasas *et al.*, 1987; Nirenberg and O'Donnell 1998 y Leslie and Summerell 2006. Una vez obtenidos los aislamientos puros del patógeno se indujo la formación de: fiálides, microconidios, macroconidios y clamidosporas. Para inducir la formación de fiálides, se colocó una pequeña porción de crecimiento micelial y agar sobre un porta objetos dentro de una caja Petri en condiciones de humedad y esterilidad por un periodo de 72 hs. La caja Petri se mantuvo

bajo luz blanca con focos SOLAR® 39W T12/AI/LD a 26°C. Las estructuras obtenidas se midieron y documentaron con una cámara montada al microscopio MOTICAM 2300® (DC. Imaging, LLC)

Para obtener macro y microconidios se inoculó micelio en cajas Petri con medio de cultivo “Carnation Leaf Agar” (CLA), a una temperatura de 22-24 °C por 24 días (Morales- Rodríguez *et al.*, 2006). Para la formación de cadenas de microconidios, se colocó micelio en cajas Petri con PDA a una temperatura 22-24 °C por un período de 10 días. Para promover la formación de clamidosporas se mantuvieron los cultivos bajo las mismas condiciones por 14 días.

La morfometría se obtuvo realizando 100 mediciones de cada estructura antes mencionada.

5.4 Ubicación filogenética

5.4.1 Extracción de DNA genómico

Se tomo micelio de los aislamientos derivados de semillas con y sin síntomas de infección por pudrición de mazorca, color morado y blanco incubados a 20 a 25°C con luz blanca continua. Después de cuatro días, cuando se desarrolló el micelio, se tomó una porción de aproximadamente 5 mm de micelio y se colocó en un tubo Eppendorf de 200 µL conteniendo 30 µL de la solución de lisis, LyseNGo (Pierce, USA). Posteriormente, se colocaron los tubos a 95°C durante 5 min, después se centrifugaron por 10 min a 5,000 *xg*. La calidad del DNA se verificó con electroforesis a 76 V/45 minutos, en un gel de agarosa al 1% Ultrapure™ (Gibco®) utilizando buffer TBE (Tris- Borato-EDTA pH 8.0), el gel se tiño con bromuro de etidio. Las bandas se observaron en un transiluminador (Gel Doc 2000, BIO RAD_, USA).

Posteriormente se tomó 5 µL del sobrenadante para las amplificaciones de los genes ribosomales mediante la PCR.

5.4.2 Amplificación por PCR del DNA ribosomal.

Para la amplificación de la región ITS se utilizaron los iniciadores universales ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC) (White *et al.*, 1990) que amplifica un fragmento de 580 pares de bases aproximadamente (bp). Otro par de iniciadores utilizados fueron ITS5 y NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') (O'Donnell, 1992), para amplificar un fragmento de 1,100 bp, que incluyó la región del ITS y ~600 bp del gen 28S rRNA.

La mezcla de reacción para PCR se preparó en un volumen final de 25 μ L conteniendo la enzima μ 1 x *Taq* DNA polimerasa, 0.8 mM deoxinucleosido trifosfatos (0.2 mM cada uno), 100 ng DNA, 20 pmol de cada iniciador y 2 unidades de *GoTaq* DNA (Promega, USA).

Las amplificaciones se realizaron con un ciclo inicial de desnaturalización a 95°C por 2 min; 35 ciclos de desnaturalización a 95°C por 1 min, el alineamiento a 57°C por 1 min, y una extensión final a 72°C por 2 min; finalmente un ciclo de amplificación a 72°C por 10 min.

Todas las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un Peltier Thermal Cycler PTC-200 (BIORAD, México), las amplificaciones se verificaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1.2% preparado con 1x TAE búfer (Tris Acetate-EDTA) y corrido a 87 V cm^{-3} durante 1 h. El gel se tiñó con bromuro de etidio (3 mg L^{-1}), y las bandas se visualizaron en un transiluminador Gel Doc 2000 UV, (BIORAD, USA). Los productos amplificados se limpiaron con el kit de purificación QIAquick PCR (Qiagen, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Estos productos se secuenciaron en ambas direcciones con un sistema automatizado de secuenciación de DNA de Applied Biosystems modelo 3730XL (Applied BioSystems, USA); para asegurar que no hubiera lecturas de nucleótidos incorrectas

5.4.3 Amplificación de la región IGS.

Los componentes de la mezcla de reacción para PCR fueron; 6.2 μL de agua, 0.3 μL *Taq* ADN, 5 μL de buffer, 2.5 μL MgCl_2 , 2 μL CNS1 (iniciador 1), 2 μL CNL11 (iniciador 2), 2 μL de DNTPs y 5 μL de DNA, para hacer un total de 25 μL de ADN.

La amplificación se realizó con una desnaturalización inicial de 95° C por 2 minutos, 35 ciclos de desnaturalización a 95°C por 2 minutos, el alineamiento 60°C por 1 minuto, extensión final 72°C por 1 minuto, un ciclo de amplificación a 72°C por 7 minutos, conservación de ADN a 4°.

5.4.4 Análisis filogenético de la región del ITS.

Las secuencias de ambas regiones se ensamblaron y editaron usando BioEdit versión 7.0.5 (Hall, 1999), con el cual se creó una secuencia consenso. Esta secuencia, se comparó con las secuencias depositadas en el GenBank del National Center for Biotechnology Information (NCBI), mediante la opción BLASTN 2.2.19 (Zhang *et al.*, 2000). Para el análisis filogenético, la secuencia consenso se compiló en un archivo fasta y se alineó con el profile mode del Clustal W 1.8.1. (Thompson *et al.*, 1994), incluido en el programa Mega 4.0.2 (Tamura *et al.*, 2007) y analizada con el método de Máxima Parsimonia utilizando la opción Close Neighbour Interchange (CNI) search (nivel=1), con árbol inicial por adición al azar (10 reps), y los gap/missing se consideraron como completas deleciones. Para determinar los valores de confianza de los agrupamientos dentro del árbol resultante, un análisis de bootstrap se estimó con 1000 repeticiones (Felsestein, 1985).

5.5 Clasificación por pigmentación

Los cien aislamientos del hongo obtenidos de semillas con y sin síntomas de infección por pudrición de mazorca se clasificaron en dos grupos,

blancos y morados de acuerdo a la pigmentación que presentaron. Se obtuvieron cultivos monospóricos hasta que la pigmentación de los aislamientos fue constante.

La medición del color de cada aislamiento se hizo en un espectrofotómetro Lambda Bio 10 ® (Perkin Elmer). Para lo cual, el micelio purificado obtenido de los aislamientos que produjeron colonias blancas y moradas, se colocaron, independientemente en un matraz con medio de cultivo papa- dextrosa (PD) por un periodo de 15 días en agitación constante Multi- Wrist Shaker (Lab-Line instruments®), se licuó y se colocó en tubos de ensaye para medir la absorbancia, calibrando el espectrofotómetro a 550nm, absorbancia usada para detectar metabolitos en especies de *Fusarium* (Chelkowski, 1989) usando como blanco medio de cultivo PD.

5.6 Concentración de papa en medio de cultivo PDA

Los aislamientos con crecimiento micelial de color blanco y morado obtenidos de semillas sintomáticas y asintomáticas, se sembraron independientemente en medio de cultivo PDA preparado con 50, 100,150 y 200 gr de papa. Se observó la variación en la producción del pigmento a los 15 y 30 días.

5.7 Prueba de patogenicidad

El experimento se realizó en condiciones de invernadero en dos ciclos; otoño- invierno 2008 manteniendo una humedad relativa (HR) promedio de 65% a 22°C y primavera- verano 2009 HR promedio de 75% a 24°C. Los aislamientos blanco y morado de semillas con y sin síntomas de pudrición de mazorca, se incrementaron en sustrato de avena entera. La avena se humectó por 12 h y se esterilizó durante 2 h a 120 °C a 20 Lb de presión.

Las pruebas de patogenicidad de los diferentes aislamientos, se llevaron a cabo mezclando diferentes proporciones del sustrato inoculado con suelo

estéril (Fig.8) usando una concentración de 2×10^6 conidios/g de sustrato inoculado.

En cada tratamiento se colocaron 10 semillas de maíz del sintético blanco VS 356 (origen 2007B) elegido por ser un material apto para desarrollarse en el trópico Mexicano, mejorado por selección recurrente, provistas por el Campo Cotaxtla, del Instituto Nacional Investigaciones Agrícolas y Pecuarias, con cinco repeticiones por tratamiento.

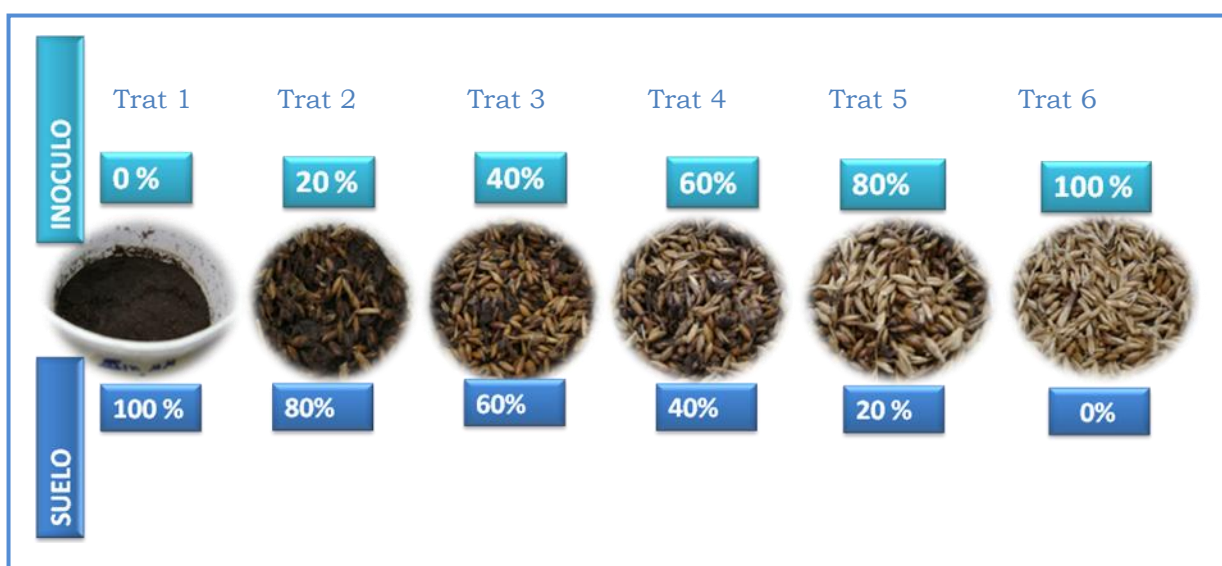


Fig. 8. Proporciones de hongo/ suelo, utilizadas en la prueba de patogenicidad.

Se realizaron tres evaluaciones de severidad del área foliar de las plántulas de maíz, con base en la siguiente escala diagramática (Fig.9): Plántula sana (testigo) =1; Plántula de tamaño reducido = 2; Plántula clorótica y de tamaño reducido = 3; Plántula con hojas atizonadas y/o enrollamiento foliar = 4 y Plántula muerta = 5. La primera evaluación se realizó a los 15 días después de la inoculación (ddi), la segunda 20 ddi y la tercera a los 25 ddi, en esta última, además de la severidad del área foliar, se tomo el peso de raíz de cada plántula.

Los resultados obtenidos se analizaron siguiendo un diseño experimental en Parcelas sub divididas, siendo parcela mayor aislamiento de semillas sintomáticas o asintomáticas, parcela mediana color de micelio blanco ó morado y parcela menor porcentaje de inóculo de cada tratamiento, utilizando el programa SAS® System for Windows 9.0.

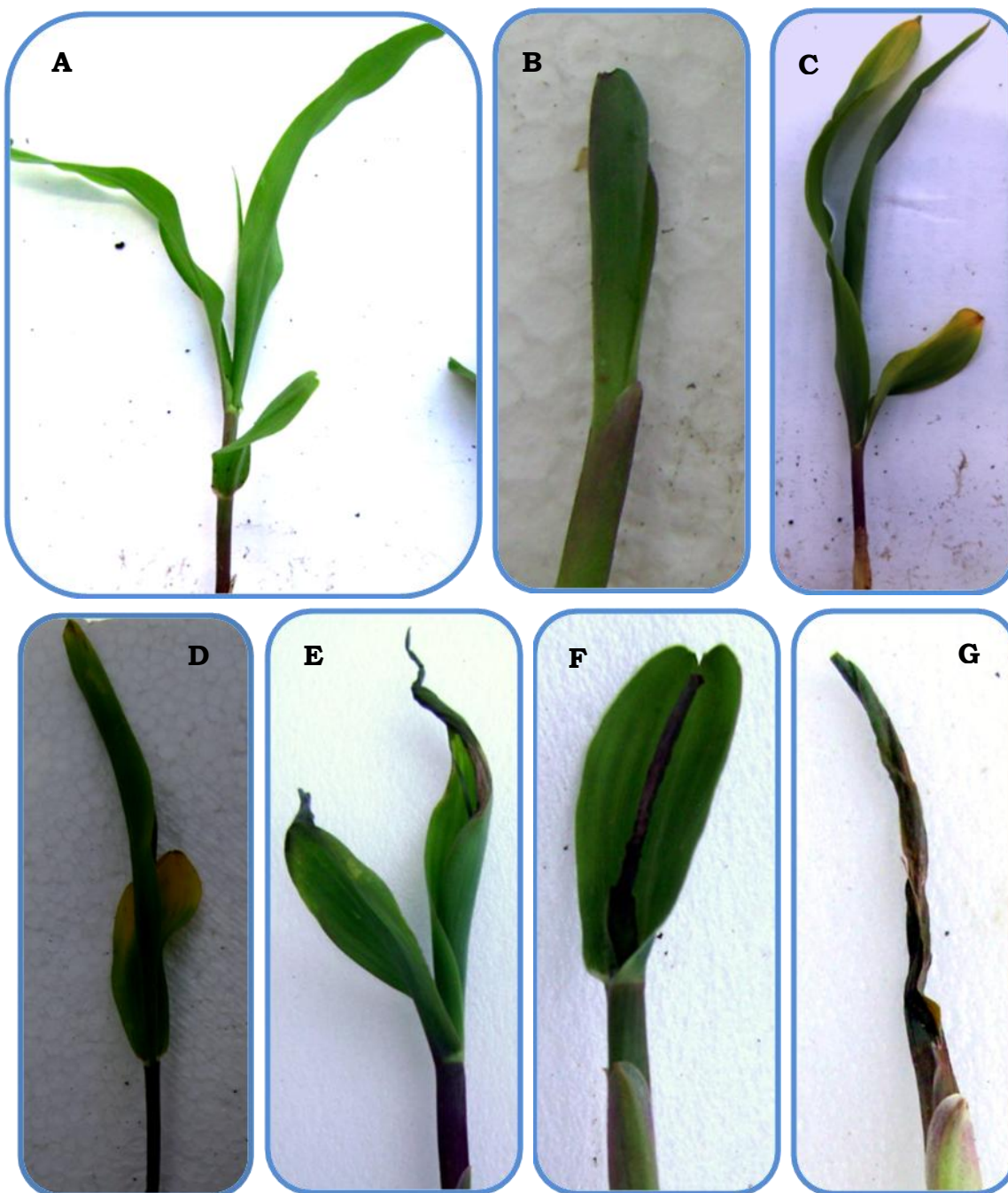


Fig. 9. Escala de severidad foliar; A; Plántula sana (testigo =1), B; Plántula de tamaño reducido = 2, C-D; Planta con clorosis y/o tamaño reducido = 3. E, F; Plántula con hojas atizonadas y/o enrollamiento foliar= 4, G; Plántula muerta = 5.

VI. RESULTADOS

6.1 Caracterización morfológica

Los aislamientos obtenidos de semillas sintomáticas y asintomáticas infectadas con *F. verticillioides* presentaron características similares (Fig.10- 13). El crecimiento micelial en medio de cultivo PDA inicialmente fue de color blanco, posteriormente naranja y finalmente morado. El hongo presentó hinchamiento de hifas y producción microconidios sin septos de forma oval y con la base lisa. En el micelio aéreo se formaron largas cadenas de microconidios con células conidiogénicas creciendo en monofiálides; los macroconidios fueron muy escasos. La morfometría fue similar en los cuatro aislamientos (Cuadro 1).

Cuadro 1. Comparación morfológica de cuatro aislamientos obtenidos de semillas con y sin síntomas de infección causados por *F. verticillioides* (Sacc.) Nirenberg.

Características morfológicas	F. verticillioides (Sacc.) Nirenberg			
	Aislamientos provenientes de semillas sintomáticas		Aislamientos provenientes de semillas asintomática	
Color	micelio blanco	micelio morado	micelio blanco	micelio morado
Microconidia (largo x ancho μm)	9.97x2.49	8.56 x 1.95	9.87 x 1.93	7.43x1.81
Microconidia en cadena	+	+	+	+
Macroconidio (largo x ancho μm)	39.64x3.58	34.2x3.07	32.06x3.29	31x3.09
Conidióforo	Simple o ramificado	Simple o ramificado	Simple o ramificado	Simple o ramificado
Fiálides (largo x ancho μm)	Monofiálide 27.9x2.13	Monofiálide 22 x 2.99	Monofiálide 25x 2.22	Monofiálide 22 x 2.88
Hinchamiento de hifas	+	+	+	+

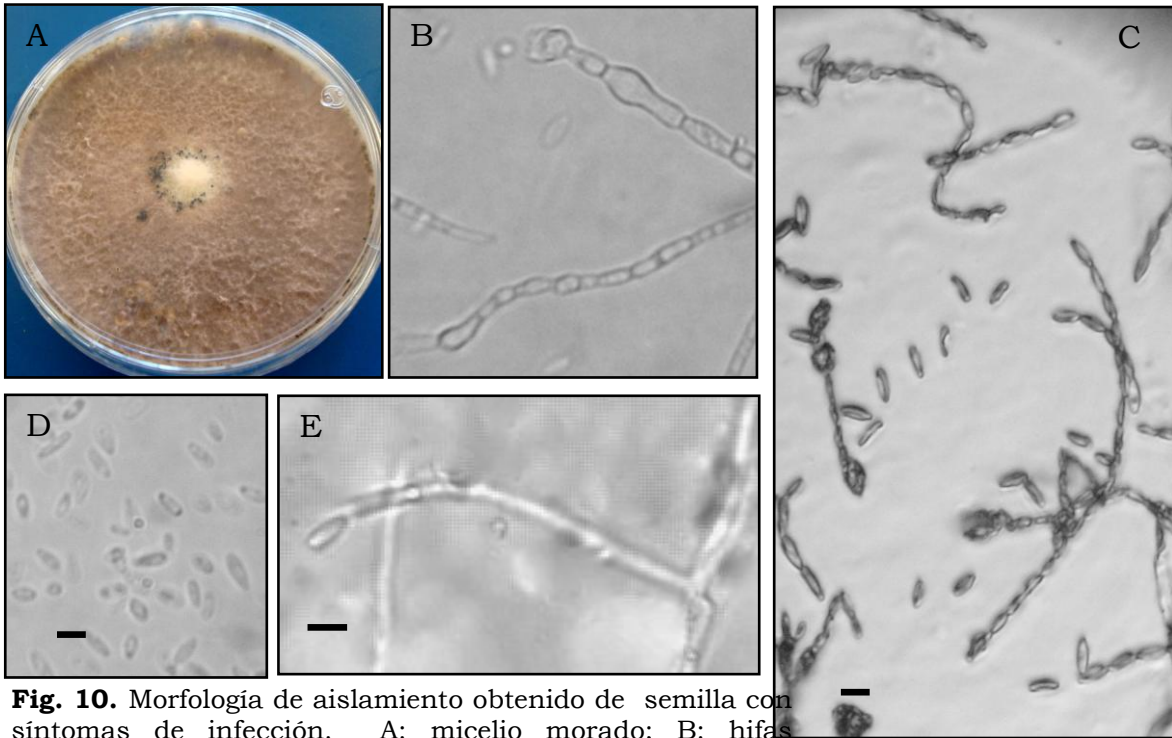


Fig. 10. Morfología de aislamiento obtenido de semilla con síntomas de infección. A: micelio morado; B: hifas hinchadas; C: microconidios en cadena larga; D: croconidios; E: monofiálide. Barras = 10 µm.

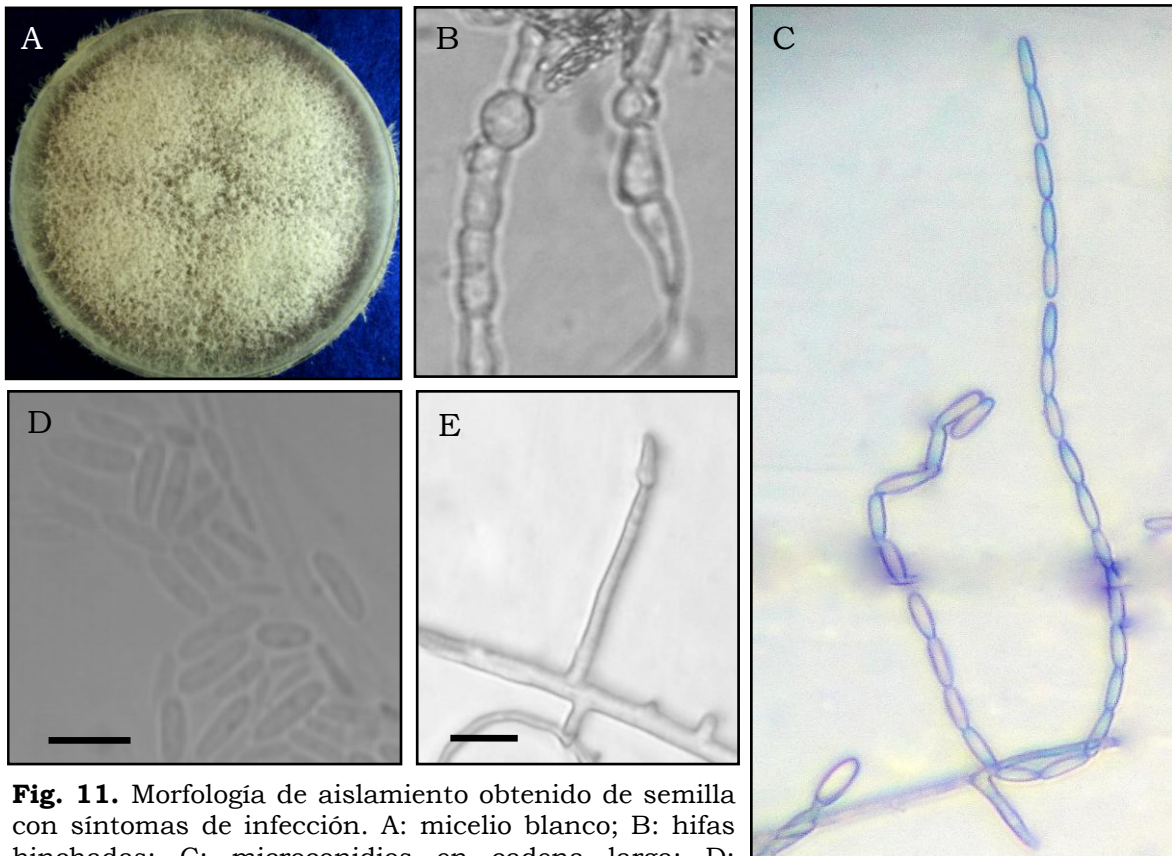


Fig. 11. Morfología de aislamiento obtenido de semilla con síntomas de infección. A: micelio blanco; B: hifas hinchadas; C: microconidios en cadena larga; D: microconidios; E: monofiálide. Barras = 10 µm.

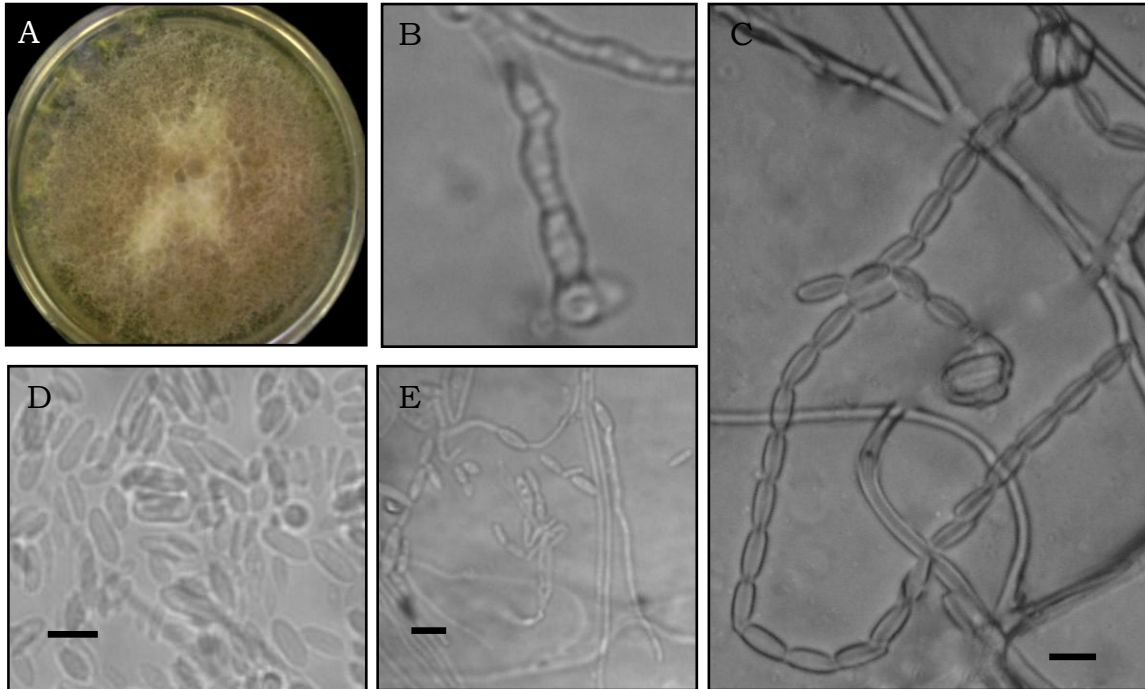


Fig. 12. Morfología del aislamiento obtenido de semilla sin síntomas de infección. A: micelio morado; B: hifa hinchada; C: microconidios en cadena larga; D: microconidios; E: monofiálide. Barras = 10 μ m.

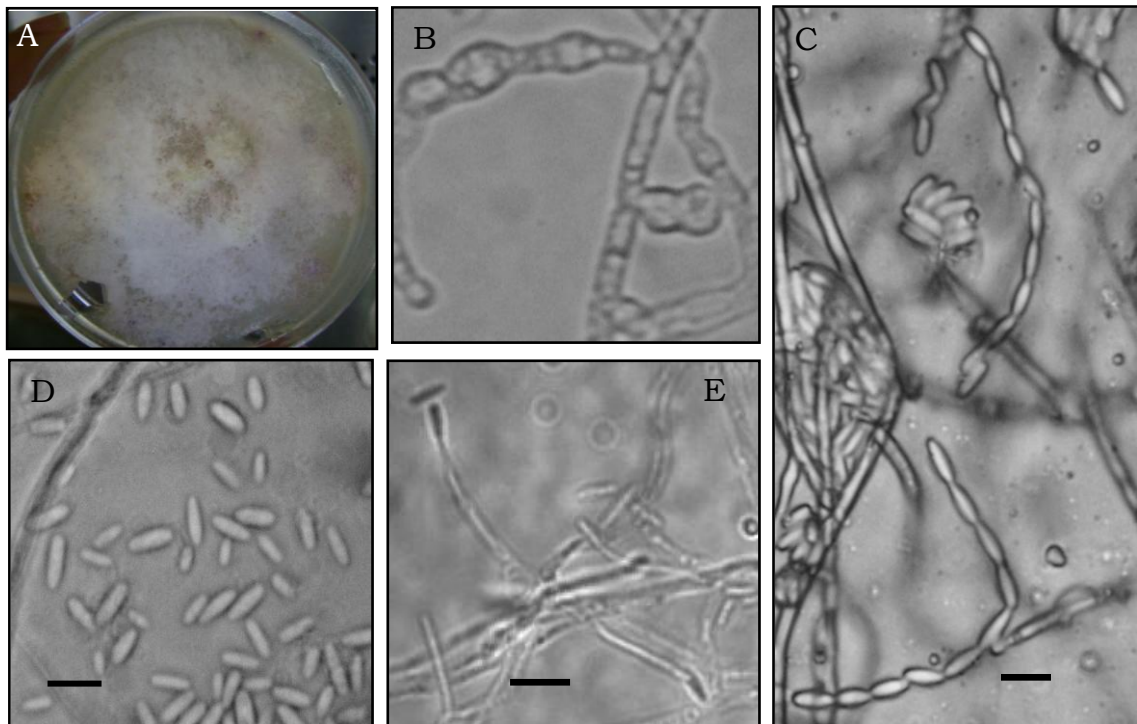


Fig. 13. Morfología del aislamiento obtenido de semilla sin síntomas de infección. A: micelio blanco; B: hifa hinchada; C: microconidios; D: monofiálide; E: microconidios en cadena larga. Barras = 10 μ m.

6.2 Ubicación filogenética

El árbol filogenético construido con la amplificación de los ITS indicó que los aislamientos obtenidos de semillas con síntomas de pudrición de mazorca corresponden a *F. verticillioides*, mientras que los aislamientos de semillas asintomáticas no se alinearon con una especie de *Fusarium* en específico.

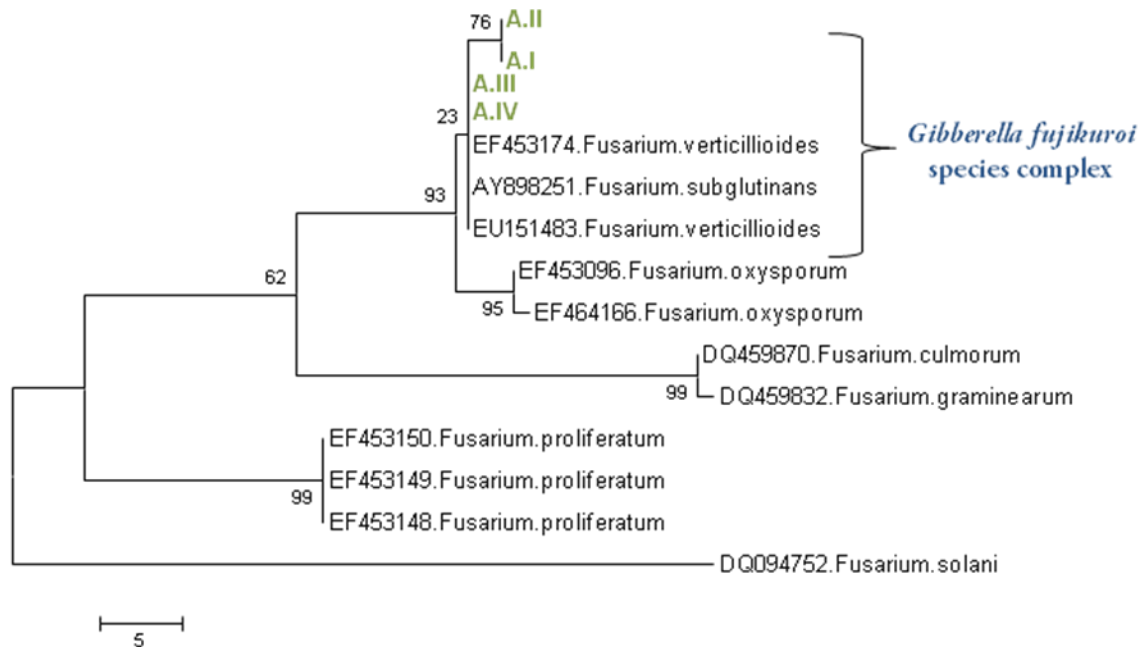


Fig. 14. Árbol filogenético construido con secuencias correspondientes al Espacio Transcrito Interno (ITS) usando el método de Máxima Parsimonia con 1000 repeticiones Bootstrap. A I y II aislamientos asintomáticos, A III y A IV aislamientos sintomáticos.

En la amplificación de IGS, los aislamientos de sin síntomas caen dentro del grupo de especies complejas de *G. fujikuroi*.

6.3 Clasificación por pigmentación

Después de cuatro generaciones de cultivos monospóricos, se obtuvo mayor estabilidad en la producción de pigmento de las colonias. Ocho de los 10 aislamientos con desarrollo micelial blanco obtenidos de semillas sintomáticas con micelio blanco (Fig.15), desarrollaron y mantuvieron colonias blancas; las dos colonias restantes presentaron crecimiento micelial blanco y centro morado. En los cultivos monospóricos provenientes de semillas sintomáticas con micelio morado (Fig.15) hubo una proporción 5:5, en la cuarta generación, la mitad de las colonias fueron de color morado y la otra mitad blancas con el centro del crecimiento micelial con una combinación morado y blanco.

Los aislamientos obtenidos de las semillas asintomáticas con micelio blanco, en la cuarta generación mantuvieron la pigmentación menos variable. Ya que Ocho de 10 colonias desarrollaron únicamente micelio blanco. Mientras que los aislamientos de las colonias con micelio morado (Fig.16), nueve de las diez mantuvieron la coloración morada.

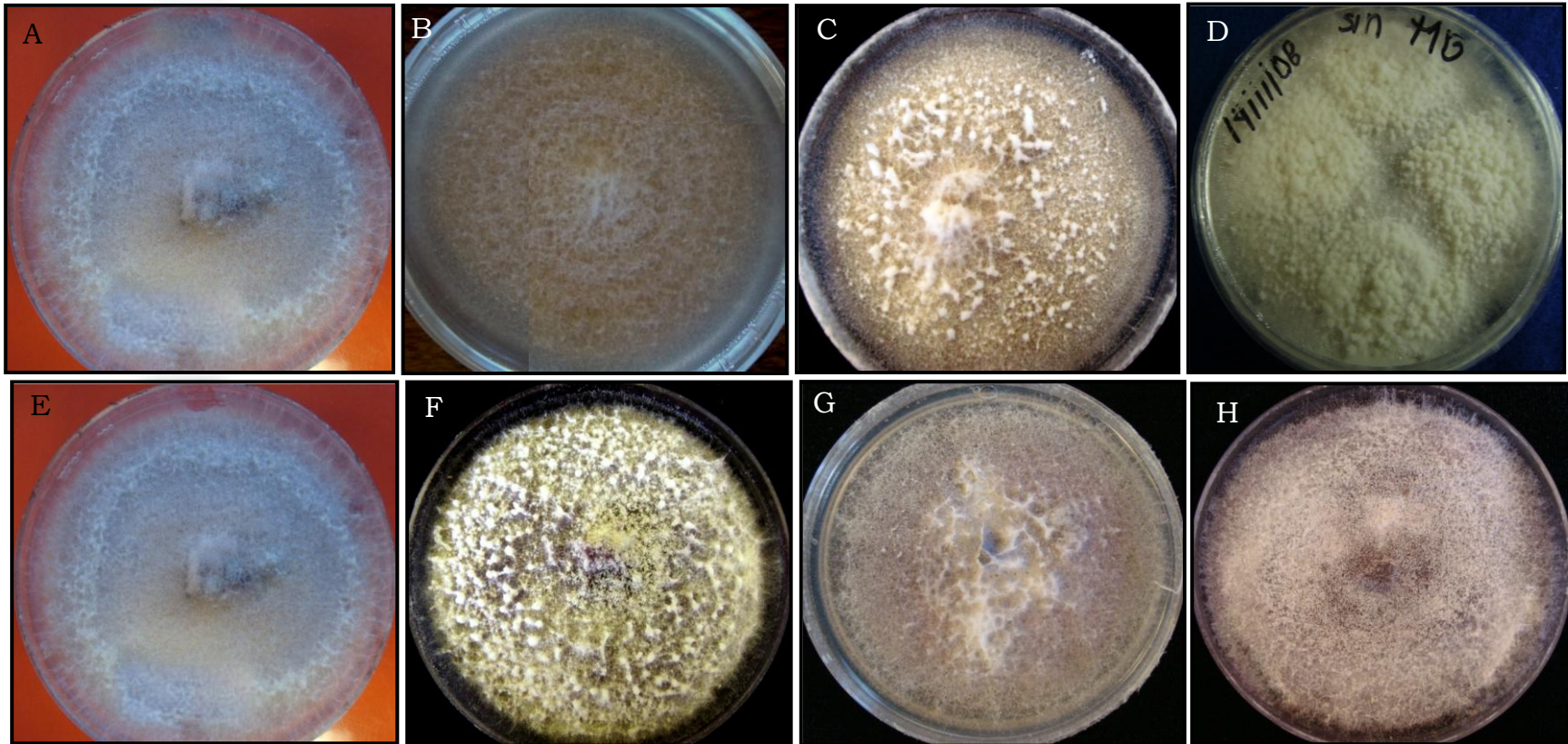


Fig. 15. Coloración micelial en diferentes generaciones de cultivos monospóricos obtenidos de semillas sintomáticas con micelio blanco (A- D: generación 1, 2, 3 y 4, respectivamente) y semillas asintomáticas con micelio morado (E-H: generación 1, 2, 3, 4, respectivamente).

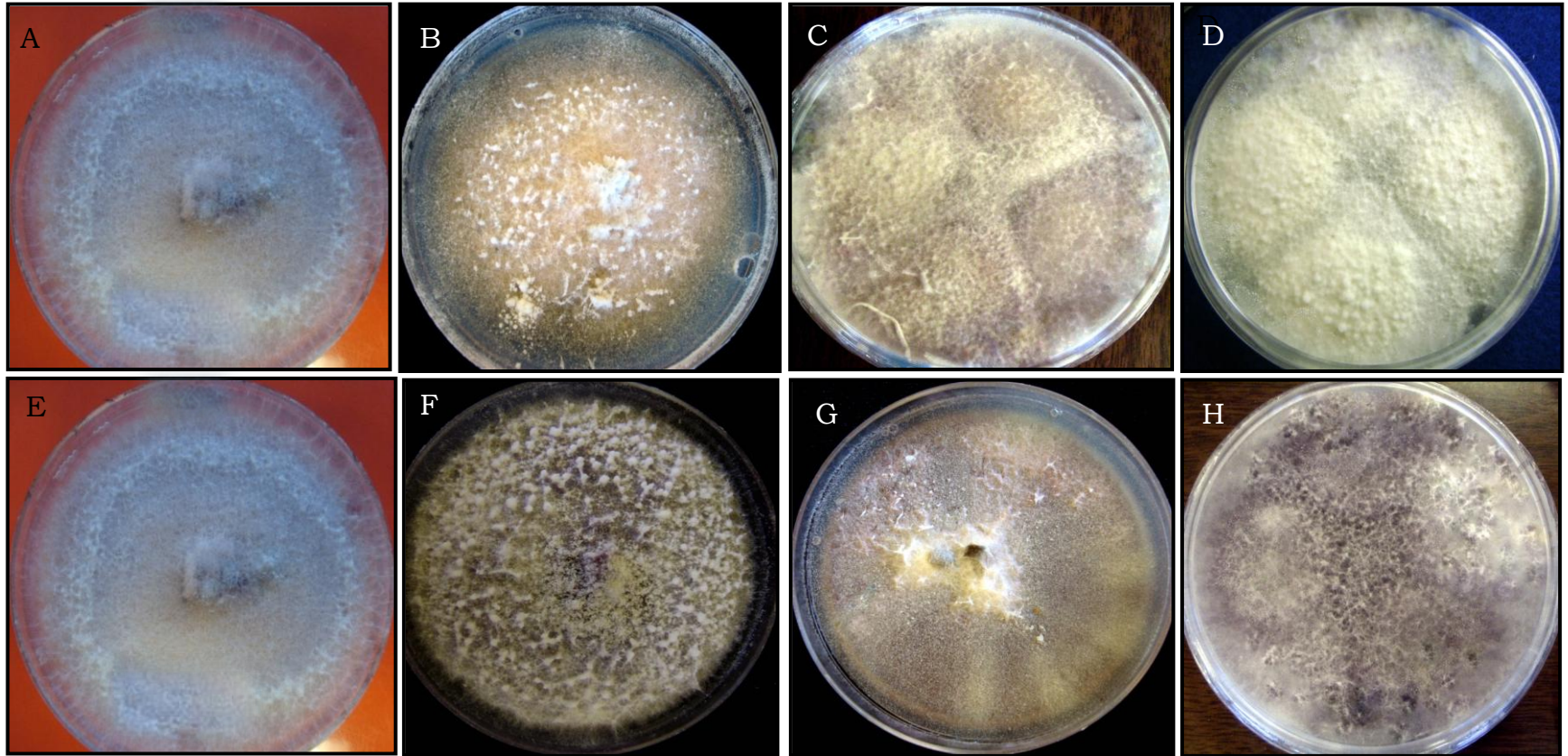


Fig. 16. Coloración micelial en diferentes generaciones de cultivos monospóricos provenientes de semillas asintomáticas con micelio blanco (A- D: generación 1, 2, 3 y 4, respectivamente) y semillas asintomáticas con micelio morado. (E-H: generación 1, 2,3 y 4 respectivamente).

6.3.1 Medición de color con espectrofotómetro.

La absorbancia a 550 nm (Fig.17) indicó que la cantidad de luz absorbida a esta longitud de onda por los aislamientos procedentes de semillas sintomáticas con micelio morado fue de 2.012 y micelio blanco absorbancia de 0.176. De manera similar en los aislamientos con micelio blanco y morado de semillas asintomáticas obtuvieron valores de absorbancia de 0.226 y 0.714, respectivamente. Comparativamente los valores de absorbancia, en los aislamientos con micelio color morado tuvieron valores numéricos más altos que los aislamientos con micelio blanco. Los pigmentos 8-O-Methylfusarubin producido por *F. subglutinas* (Visconti *et al.*, 1983) y el 8-O methyljavanicin producido por *F. verticillioides* da lecturas de absorbancia a 550nm (Kimura *et al.*, 1981) con un comportamiento similar a los pigmentos obtenidos de los aislamientos.

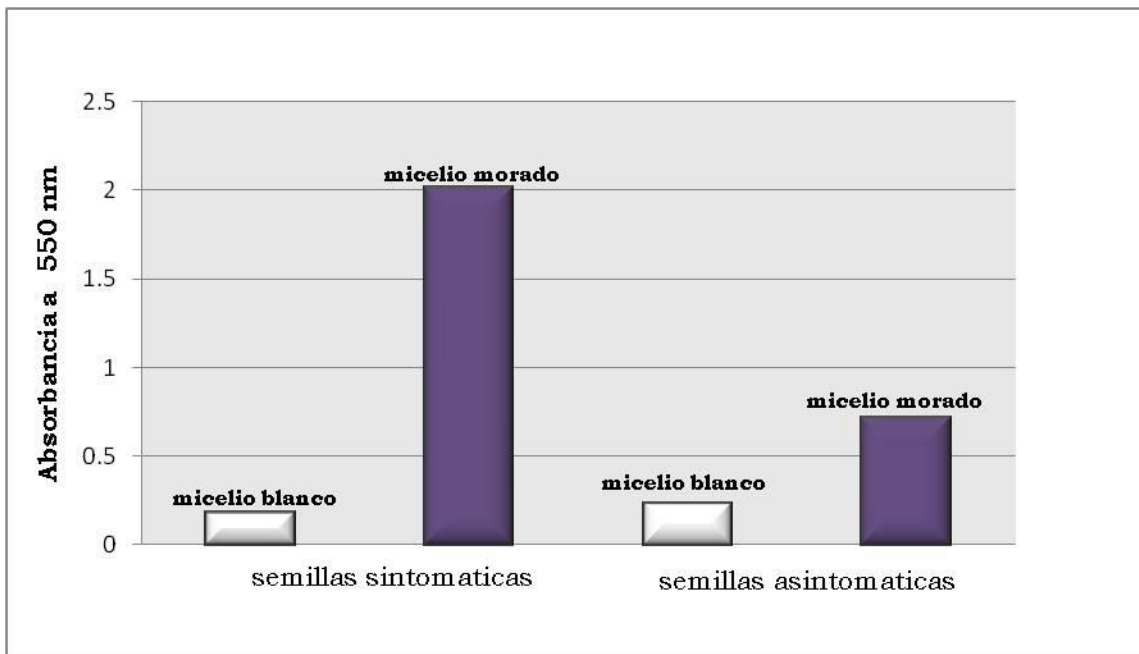


Fig. 17. Lecturas de absorbancia tomadas a 550nm. Barra blanca izquierda: micelio blanco obtenido de semilla sintomática; barra oscura izquierda: micelio morado obtenido de semilla sintomática; barra blanca derecha: micelio blanco de semilla asintomática; barra oscura derecha micelio purpura de semilla asintomática.

6.3.2 Efecto de la concentración de papa en medio de cultivo PDA sobre la pigmentación del micelio de *F. verticillioides*.

Evaluación a los cinco días después de la siembra:

Medio de cultivo PDA con 50 g de papa. El crecimiento micelial de color morado producido por los aislamientos provenientes de semillas de maíz sintomáticas y asintomáticas fue difuso y delgado, con pigmentación no definida. En cuanto a las colonias blancas, el micelio mostró un aspecto fino, desarrollo homogéneo y sin pigmentación (Fig. 18-19)

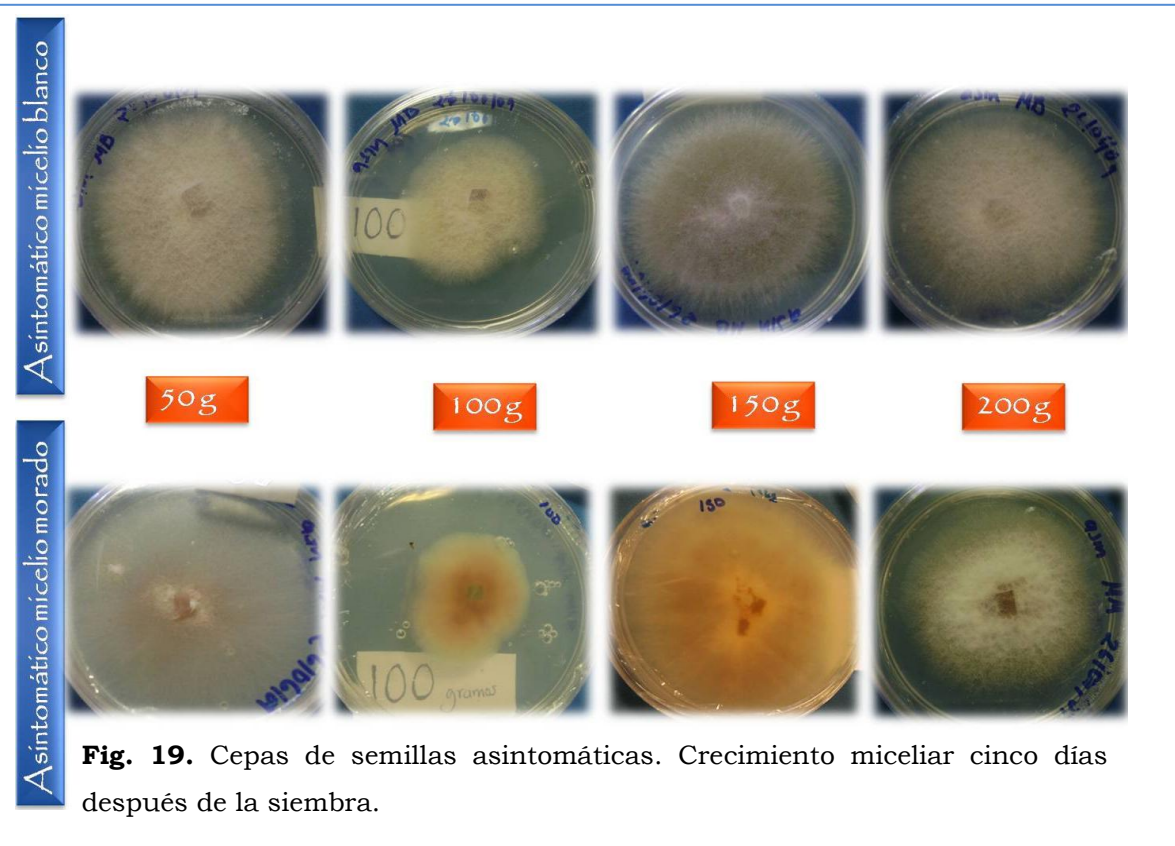
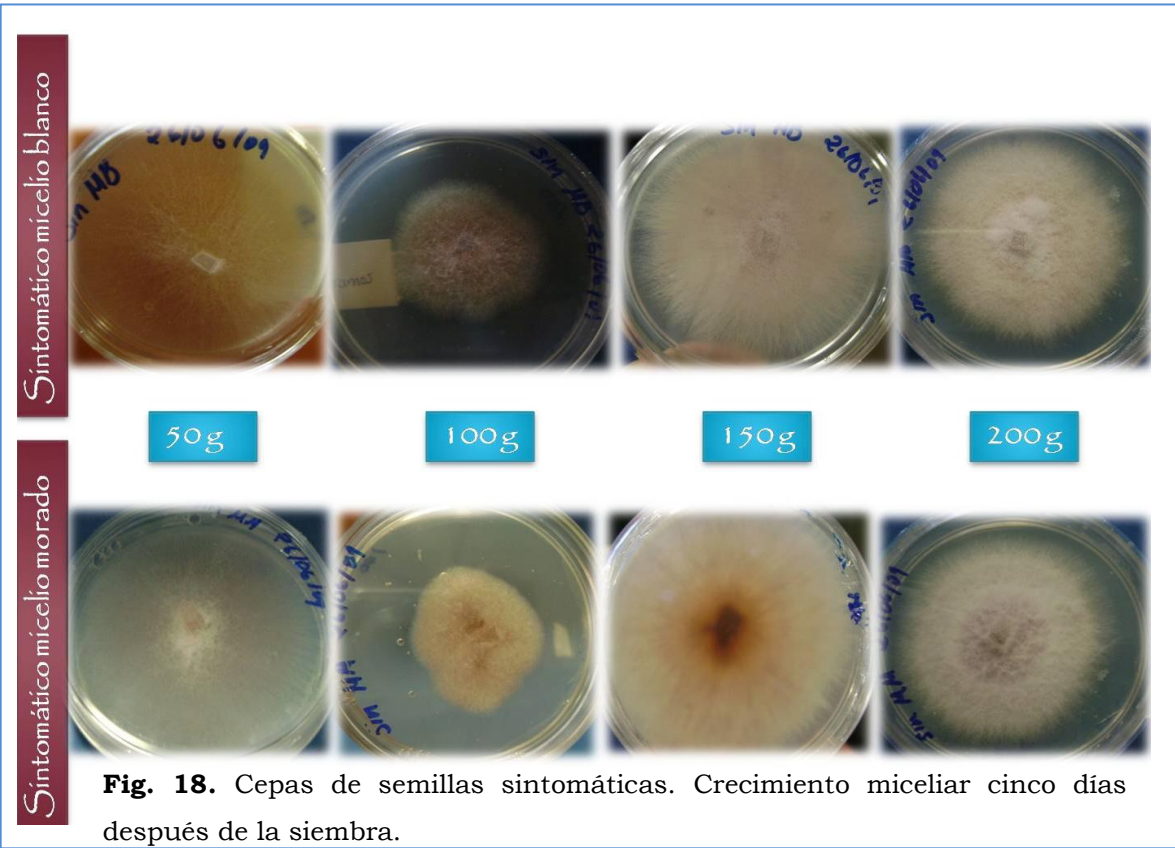
Medio de cultivo PDA con 100 g de papa. El crecimiento micelial fue lento y con aspecto algodonoso (Fig. 18-19).

Medio de cultivo PDA con 150 y 200g. Los crecimientos miceliales de color blanco y morado producido por los aislamientos, mostraron una coloración naranja que posteriormente se tornó morada (Fig.18-19).

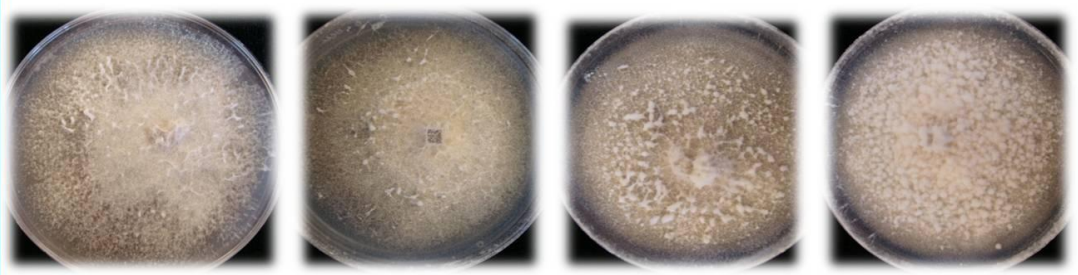
Evaluación a los treinta días después de la siembra,

Medio de cultivo PDA con 50 g de papa. El crecimiento micelial color blanco producido por aislamientos provenientes de semillas sintomáticas y asintomáticas fue homogéneo y sin pigmentación. Por otro lado, las colonias con micelio color morado desarrollaron una pigmentación más definida e intensa (Fig. 20-21).

Medio de cultivo PDA con 100, 150 y 200 g de papa. Presentaron crecimiento micelial de consistencia algodonosa. Los micelios blancos y morados no tuvieron una coloración bien definida, ya que en diferentes puntos dentro de la caja de Petri mostraron pigmentación morada con micelio algodonoso (Fig.20-21).



Sintomático micelio blanco



50g

100g

150g

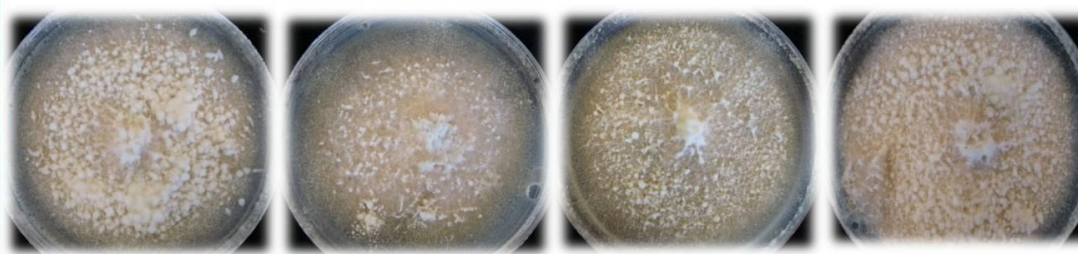
200g

Sintomático micelio morado



Fig. 20. Cepas de semillas sintomáticas. Crecimiento micelar treinta días después de la siembra.

Asintomático micelio blanco



50g

100g

150g

200g

Asintomático micelio morado

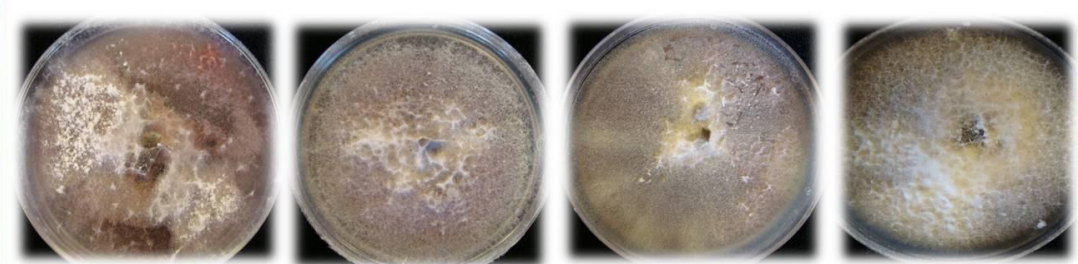


Fig. 21. Cepas de semillas asintomáticas. Crecimiento micelar treinta días después de la siembra.

6.4 Prueba de Patogenicidad

El valor de $Pr > F$ de la fuente de variación bloque, no muestra diferencias significativas, esto es debido a que las repeticiones del experimento tuvieron el mismo comportamiento. Por ejemplo, las macetas que contenía inóculo del aislamiento de semillas sintomáticas color morado, tuvieron el mismo comportamiento en los cinco bloques, siendo consistente en la evaluación de severidad en área foliar y el peso de la raíz (Cuadro 2).

Cuadro 2. Significancia de las fuentes de variación para medir los efectos del aislamiento sintomático y asintomático, concentración de inóculo y color, sobre la virulencia en área foliar y el peso de raíz de plántulas de maíz en invernadero, Montecillo, Texcoco, México.

*CV= 22.41; $R^2 = .89$; Media de Severidad = 29.79; **CV= 25.32; $R^2 = .82$

Fuente de variación	Severidad foliar*		área Peso de raíz**	
	F-valor	Pr > F	F-valor	Pr > F
Bloque	0.79	0.5366	1.55	0.1989
Aislamiento	2.53	0.1169	0.58	0.4501
Bloque*aislamiento	0.65	0.6305	3.88	0.0070
Color	0.18	0.6756	0.01	0.9084
Aislamiento*color	2.68	0.1067	22.89	<.0001
Bloque*aislamiento*color	1.07	0.3982	1.66	0.1247
Tratamiento	118.24	<.0001	54.72	<.0001
Aislamiento*tratamiento	1.72	0.1568	1.92	0.1184
Color*tratamiento	0.70	0.5930	0.75	0.5629
Aislamiento*color*tratamiento	7.05	<.0001	3.39	0.0140

La significancia de la fuente de variación tratamiento fue <0.0001 tanto en la evaluación de severidad del área foliar como en el peso de raíz (Cuadro 2). Las plántulas sin inóculo (Tratamiento 1) tuvieron el mayor peso de raíz (DMS de 0.146) y no mostraron área foliar dañada (DMS de 5.9)(Fig.22), por lo que se coloca en un grupo diferente del resto de los tratamientos. Al incluir el tratamiento 1 en el análisis de varianza se incorpora una variabilidad que

no está asociada con ningún aislamiento o color, por lo que no se consideró en el análisis de varianza y la comparación de medias de Tukey.

Los resultados de la proporción suelo/ la concentración de inóculo confirmaron la existencia de una relación directamente proporcional entre la severidad y la concentración del inóculo (Cuadro 3). El tratamiento 6 que corresponde al tratamiento con mayor cantidad de inóculo, tiene el valor de severidad media más alto (grupo a). En contraste, en el tratamiento 2, que corresponde a la concentración más baja de inóculo, el porcentaje de severidad es menor y se ubica en el grupo (c) con dos diferencias mínimas significativas con respecto al tratamiento 6.

Estadísticamente, la severidad en las plántulas es similar en los tratamientos con un 40%, 60% y 80% de inóculo, es decir en los tratamientos 3, 4 y 5, respectivamente. Sin embargo, los datos experimentales muestran un claro patrón en el que la media de infección incrementa conforme hay mayor concentración de inóculo en el sustrato.

El peso de la raíz y la concentración del inóculo presentaron una relación inversamente proporcional (Cuadro 3). El tratamiento 2 correspondiente al sustrato con menor cantidad de inóculo (20%) y registró la media del peso de raíz con el valor más alto y estadísticamente diferente al resto de tratamientos (e). En contraste, el tratamiento seis (mayor concentración de inóculo, 100%), registró la media del peso de raíz con menor valor, ubicado en el grupo (a).

Cuadro 3. Medias del porcentaje de infección de *F. verticillioides* en el área foliar y peso de raíz (g) de plántulas de maíz, bajo invernadero, Montecillo, Texcoco, México.

Concentración de inóculo	Media de severidad*		Media de peso de raíz**	
Trat6 100%	58.319	a	0.28850	a
Trat5 80%	27.201	b	0.50900	b
Trat4 60%	23.172	bc	0.65700	c
Trat3 40%	21.637	bc	0.78700	d
Trat2 20%	18.663	c	1.00600	e

*DMS = 5.9281; ** DMS = .146. Medias con las misma letra no difieren significativamente en $Pr \geq 0.05$

Por otro lado, la agrupación de medias indicó que la severidad media observada en el área foliar (Cuadro 4), no incrementó significativamente, sin importar si el aislamiento provenía de semillas con síntomas de *F. verticillioides* ó sin síntomas.

Ocurre algo similar con las medias del peso de raíz. No obstante, aunque la evidencia estadística indique que los aislamientos no son significativos a un nivel de significancia estándar ($\alpha=0.05$), en la determinación del grado de severidad el valor $Pr > F$ se muestra una probabilidad de error de 0.1189 (Cuadro 2). Debe considerarse que en un rango de probabilidad de 0 a 1 se puede afirmar que el aislamiento de semillas con síntomas de *F. verticillioides* es más virulento, por lo que la probabilidad de que la afirmación sea correcta es de 0.8811 el cual es un valor cercano a 1. De acuerdo con lo observado durante las evaluaciones, la experiencia visual sugiere que dicho aislamiento es más virulento por el daño que provoca en el área foliar y la disminución del peso de raíz.

Cuadro 4. Comparación de medias del porcentaje de infección y disminución de peso de raíz por aislamientos de *F. verticillioides* obtenidas de semillas sintomáticos y asintomáticos.

Origen del Aislamiento Semillas	Media de severidad*	Media de peso de raíz*
Sintomáticas	30.859 a	0.63700 a
Asintomáticas	28.737 a	0.66200 a

* DMS= 3.92 Medias con las misma letra no difieren significativamente en $Pr \geq 0.05$

En el ANOVA del peso de raíz (Cuadro 2), la fuente de variación aislamiento no fue significativa. Estadísticamente no se puede afirmar que el aislamiento de semillas sintomáticas disminuye en mayor medida el peso de la raíz. En la evaluación de la variable severidad, se observó que las plántulas inoculadas con aislamientos de semillas sintomáticas (Fig. 23, 24) presentaron más daño foliar en comparación con los aislamientos de semillas asintomáticas (Fig. 25, 26).

La variable color de micelio, observada en la evaluación de severidad en área foliar y en el peso de raíz, los resultados estadísticos permiten afirmar que no hay diferencias cuando se compara la virulencia de micelios color blanco y morado (Cuadro 5).

Cuadro 5. Medias del % de infección y disminución de peso de raíz causado por micelios de color blanco ó morado de *F. verticillioides*.

Color de micelio	Media de severidad*	Media del peso de raíz**
Blanco	30.079 a	0.6514 a
Morado	29.517 a	0.6476 a

*DMS= 3.179; ** DMS= 3.26115. Medias con las misma letra no difieren significativamente en $Pr \geq 0.05$.



Fig. 22. Plántulas del tratamiento 1, sustrato con 0% de inóculo.



Fig. 23. Plántulas del tratamiento con 100% de inóculo obtenido de semillas sintomáticas con micelio blanco.



Fig. 24. Plántulas del tratamiento con 100% de inóculo obtenido de semillas sintomáticas con micelio morado.



Fig. 25. Plántulas del tratamiento con 100% de inóculo obtenido de semillas asintomáticas con micelio blanco.



Fig. 26. Plántulas del tratamiento con 100% de inóculo obtenido de semillas asintomáticas con micelio morado.

Debido a que el diseño experimental en parcelas con doble división dejó ver que la interacción aislamiento-color fue significativa (Cuadro 2) se hizo un análisis de varianza con la finalidad de analizar el papel de la virulencia de los aislamientos de las semillas con y sin síntomas de infección por *F. verticillioides* blanco o morado sobre plántulas de maíz (Cuadro 6).

Cuadro 6. Significancia de las fuentes de variación para medir los efectos de los aislamiento de semillas con y sin síntomas en interacción con color micelial, sobre la virulencia en área foliar y peso de raíz de plántulas de maíz bajo condiciones de invernadero. Montecillo, Texcoco Edo, de México.

Fuente de variación	Severidad de área foliar*		Peso de raíz**	
	F-valor	Pr > F	F-valor	Pr > F
Aislamiento-color	1.42	0.2419	5.84	0.0011
Tratamiento	93.66	<.0001	40.86	<.0001

*CV= 22.41; R² = .89; Media de severidad = 29.79; **CV= 29.30; R² = .66; Media de peso = 0.649500

En la severidad del área foliar, no hay significancia en la fuente variación aislamiento-color (Cuadro 6), por lo que las posibles interacciones entre el color de micelio y el aislamiento de semillas sintomáticas o asintomáticas, al agruparlas en base a sus medias, resultarían en un solo grupo. Debido a lo subjetivo que puede ser una evaluación visual de daño foliar se debe considerar la variable peso de raíz en este caso la fuente de variación de la interacción aislamiento-color es significativa (Cuadro 6). Como resultado de la agrupación de medias de esta variable, se tiene que el aislamiento obtenido de semillas sintomáticas color morado, es el más virulento, al mostrar una media con el menor peso de raíz (Cuadro 7) en comparación con el aislamiento blanco obtenido de semillas sintomáticas.

El aislamiento blanco de semillas asintomáticas es más virulento que el aislamiento morado de semillas asintomáticas, esto considerando la diferencia en las medias del peso de raíz (Cuadro 7).

Cuadro 7. Medias de la disminución del peso de raíz, causado por aislamientos de color blanco ó morado obtenidos de semillas con y sin síntomas de infección de *F. verticillioides*.

Aislamiento-color micelial	Peso de raíz*
Asintomático - Morado	0.73880 a
Sintomático - Blanco	0.71760 ab
Asintomático - Blanco	0.58520 bc
Sintomático - Morado	0.55640 c

*DMS= 0.1409; Medias con las misma letra no difieren significativamente en $Pr \geq 0.05$.

Se asocia una mayor virulencia a un menor peso de raíz porque este comportamiento lo tuvieron las raíces de plántulas que interactuaron con los diferentes aislamientos del hongo, ya que en promedio las raíces de las plántulas que se desarrollaron sin estar en contacto con *F. verticillioides*, tuvieron el doble del peso de raíz (Fig.27).

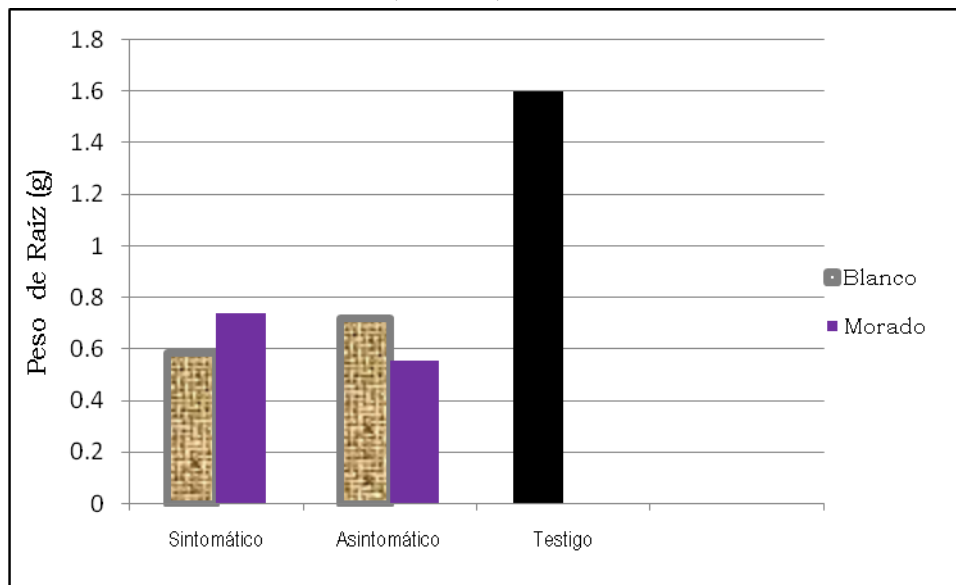


Fig. 27. Disminución del peso de raíz causado por aislamientos de semillas sintomáticas y asintomáticas con micelio color morado ó blanco de *F. verticillioides*.

VII. DISCUSIÓN

Las estados periteciales del genero de *Fusarium* admiten una organización en secciones, lo que permite caracterizarlos morfológicamente (Nelson, 1990). Este es el caso de *F. verticillioides* (Sacc.) Nirenberg (sin. *F. moniliforme*), miembro de la sección Liseola, en la que sus integrantes no forman clamidosporas, sólo hinchamiento de hifas que ocasionalmente son confundidas con pseudoclamidosporas, (Nelson *et al.*, 1983, 1990, 1992; Leslie and Summerell, 2006). Además, es poco frecuente la formación de macroconidias (Nelson *et al.*, 1983) y cuando se presentan tienen la célula apical curvada y la basal en forma de pie (Nirenberg and O'donnell, 1998), con 3-7 septos (Booth, 1971). Hay una frecuente formación de microconidias en cadenas (Morales-Rodríguez *et al.*, 2006). La conidiogénesis es entoroblástica fialídica (Glenn *et al.*, 2004). La morfometría de las estructuras originadas de los aislamientos obtenidos de semillas sintomáticas y asintomáticas se asemeja a *F. verticillioides* (cuadro 10). En una ubicación filogenética frecuentemente se utiliza la región del ITS y en ocasiones hay menos del 1% de similaridad en estas secuencias. En el complejo de especies de *G. fujikuroi* la región del ITS no detecta diferencias en especies que están relacionadas filogenéticamente (Zeng *et al.*, 2009). La ubicación filogenética mediante la amplificación de IGS de los aislamientos de semillas sintomáticas, involucrados en la pudrición de mazorca indica que tales aislamientos corresponden a *F. verticillioides*. La divergencia de la secuencia de la región del IGS es mayor que la de las secuencias de la región del ITS (Sugita *et al.*, 2004), lo que permitió ubicar a los aislamientos obtenidos de semillas asintomáticas en el complejo de especies de *G. fujikuroi*. Debe considerarse que las secuencias de nucleótidos y las estructuras de la región IGS responsable de la heterogeneidad no se han terminado de comprender (Shihomi *et al.*, 2009), por lo que es necesario usar otras herramientas moleculares para determinar la especie a la que corresponde los aislamientos provenientes de las semillas asintomáticas.

Cuadro 10. Características morfológicas consideradas en la caracterización morfológica de *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg.

	Morales-Rodríguez <i>et al.</i> , 2006	Leslie & Summerell, 2006	Nirenberg and O'donell, 1998	Nelson <i>et al.</i> , 1983;1990;1992.	Booth, 1971.	Aislamiento I	Aislamiento II	Aislamiento III	Aislamiento IV
Morfología									
Color	Salmon-purpura	Gris-magenta, violeta		Blanco-purpura	Crema beige-violeta	Blanco	Morado	Blanco	Morado
Microconidia (largo x ancho en µm)	11.8x2.4,5 .0-12.0x1.5-2.5	Con célula apical curvada	2-3x5-12		5-12x1.5-2.5	9.97x2.49	8.56 x 1.95	9.87 x 1.93	7.43x1.81
Microconidia en cadena	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Falsas cabezas	+	+	+	+	+				
Macroconidio (largo x ancho en µm)	31.0x3.7	Sin septo con base lisa	2.5-5x15-60		30-50x2.5-4 (5-6 septos)	39.64x3.58	34.2x3.07	32.06x3.29	31x3.09
Conidióforo	Simple o ramificado	Simple y/o ramificado	Simple y/o ramificado	Simple y/o ramificado	Simple y/o ramificado	Simple y/o ramificado	Simple y/o ramificado	Simple y/o ramificado	Simple y/o ramificado
Fiálides (largo x ancho en µm)	Monofiálide 22.0x3.5	Monofiálide	Monofiálide	Monofiálide	Monofiálide 20-24 x 3.5-4	Monofiálide 27.9x2.13	Monofiálide 22 x 2.99	Monofiálide 25x 2.22	Monofiálide 22 x 2.88
Clamidosporas ^a	-	-a	-	- a	-	-a	-a	-a	-a

-a Hifas inchadas.

Aislamiento I = semillas sintomática micelio blanco, Aislamiento II = semillas sintomática micelio morado,

El comportamiento de los aislamientos obtenidos de semillas sintomáticas y asintomáticas fue similar durante la prueba de patogenicidad, ya que ambos causaron daño foliar y disminución en el peso de la raíz, pero en la evaluación de la virulencia los aislamientos se comportaron de manera diferente. Fue notable que en concentraciones altas el hongo aislado de los dos tipos de semilla, inhibiera la germinación de las semillas usadas en el experimento, tanto con aislamientos de pigmento morado (Kimura *et al.*, 1981) como en los no pigmentados (micelio blanco). Algunos aislamientos de *F. verticillioides* producen infecciones asintomáticas en semilla. Sin embargo, una vez que se promueve el crecimiento micelial, el hongo logra infectar a la semilla afectando la emergencia de la plántula (Yates and Jaworski, 2000). En presencia de inóculo, el hongo es capaz de colonizar tejidos de la planta de maíz durante todo su ciclo vegetativo, incluyendo raíz, tallo, mazorca y semillas. Aunque en la selección de las semillas la presencia del hongo no fue perceptible, no implicó que esas semillas no estuvieran infectadas (Singh *et al.*, 1977; Thomas and Buddenhagen, 1980). La infección asintomática puede presentarse en cualquier parte de la planta y ser transmitida por la semilla a las plántulas, pudiendo o no desarrollar una infección sistémica (Munkvold and Desjardins, 1997). Está reportado que los granos de maíz son muy vulnerables a las infecciones asintomáticas de semillas (Mendoza *et al.*, 2006), ya que las hifas colonizan los espacios intercelulares a diferencia de las infecciones sintomáticas que se encuentran tanto en los espacios inter como intracelulares, lo que ayuda a que sean visibles (Oren *et al.*, 2003). Los aislamientos de *F. verticillioides* pueden o no producir pigmentación (Nelson, 1992). En el presente trabajo se destacó que el micelio morado del aislamiento de semillas con síntomas fue más virulento que el micelio blanco del mismo aislamiento. En contraste, el micelio blanco del aislamiento de semillas asintomáticas fue más virulento que el micelio morado de este aislamiento.

En la ubicación filogenética, se mencionó que el patógeno presente en semillas asintomáticas no era *F. verticillioides*, pero sí miembro del complejo de especies de *G. fujikuroi*.

Fusarium verticillioides (Sacc.), *F. subglutinans* (Wollenw and Reinking) y *F. proliferatum* (Matsush.) son especies morfológicamente similares que infectan plántulas de maíz causando síntomas idénticos y también se encuentran en semillas asintomáticas (Wilke *et al.*, 2007). No hay un comportamiento similar en los aislamientos porque no se trata del mismo hongo. De igual forma, es controversial afirmar que se trate de un patógeno distinto a *F. verticillioides* el que infecta semillas asintomáticas. Sin embargo, es notable que los aislamientos blanco y morado producidos por *F. verticillioides* tienen diferente virulencia, lo cual que puede deberse a que producen cantidades de compuestos metabólicos diferentes (Menniti *et al.*, 2010).

La pigmentación puede ser variegada en el medio de cultivo, lo que sugiere que la producción del pigmento es influenciada por la concentración de papa (Klittich and Leslie, 1992). El crecimiento micelial blanco de los aislamientos obtenidos de semillas sintomáticas y asintomáticas se mantiene sin pigmentación cuando crece en medio de cultivo PDA con 50g de papa. En los aislamientos con pigmentación morada, ésta fue más intensa en la misma concentración de papa. La pigmentación se produce bajo condiciones adversas o de deficiencia de algún elemento (Mendentsev *et al.*, 2005). En algunos casos, cuando se estudia la heredabilidad de un pigmento y la progenie no lo reproduce homogéneamente, puede deberse a que la pigmentación está asociada a un carácter multigénico (Klittich and Leslie 1992; Nirenberg and O'Donnell, 1998).

VIII. CONCLUSIONES

Los aislamientos obtenidos de semillas sintomáticas corresponden a *F. verticillioides*.

Los aislamientos obtenidos de semillas asintomáticas forman parte del complejo *Gibberella fujikuroi*.

Los aislamientos provenientes de semillas sintomáticas y asintomáticas causan daño foliar y disminución en el peso de la raíz

El aislamiento color morado de semillas con síntomas de *F. verticillioides* es más virulento que el aislamiento de color blanco.

El aislamiento de color blanco de semillas asintomáticas más virulento que el aislamiento color morado.

Con 50 g papa L⁻¹, la pigmentación de las cepas con micelio morado fue más intensa y las cepas con micelio blanco mostraron un color más homogéneo.

IX. LITERATURA CITADA

- Agrios, G. N. 2005. Plant pathology. 5^a ed. Academy Press. Univer. of Florida. 903p.
- Alberts, B.; Jhonson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. 2002. Molecular biology of the cell .4th ed, Garland Publ., New York. p. 59-62.
- Anderson, P.K.; Cunningham, A.A.; Patel, N.G.; Morales, F.J.; Epstein, P.R; Daszak. P. 2004. Emerging infectious diseases of plants: pathogen pollution, climate change and agrotechnology drivers. Trends Ecol. Evol.; 19:535–544.
- Aristegui, B. 2002. *Fusarium culmorum* (W.G. Smith) Saccardo. Rev. Iberoam. Micol: 31:32.
- Booth, C. 1971 The genus *Fusarium*. Ed. Commonwealth Micological Institute. England. 213 p.
- Bressan, W.; Figueiredo, J. 2005. Biological control of *Stenocarpella maydis* in maize seed with antagonistic *Streptomyces* sp. isolates. J. Phytopath. 153: 623 - 626
- Chelkowski, J. 1989. *Fusarium* mycotoxins, taxonomy and pathogenicity; topics in secondary metabolism. Vol.2. Elsevier Sci. Publi. B.V. New York. U.S. 492 p.
- Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo. 2004. Enfermedades del maíz. Una guía para su identificación en campo. 4a ed. Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo, El Batan, Mex. 123 p.

- D´Arcy, C. J.; Eastburn, D. M.; Schumann, G. L. 2001. Illustrated Glossary of Plant Pathology. The Plant Health Instructor. DOI: 10.1094/PHI-I-2001-0219-01
- Elix, J. A.; Wardlaw, J.H. 2002. Fusarubin from a lichen source. J. Australasian Lichennology. 51: 2-3.
- Eubanks, M. W. 2001. The mysterious origin of maize. Economic Botany 55(4): 492-514.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. Evolution 39: 783-791.
- Gerber, N. N.; Mokhtar, S. A.1979. New antibiotic pigments related to fusarubin from fusarium solani (mart.) sacc. The J. of Antibiotics. 32(7): 665-668.
- Golin´ski, P.; Chełkowski, J.; Zajkowski, P.; Kostecki, M. 1991. Do the pigments differ chemotaxonomically in fungi belonging to the genus *Fusarium*?. Mycotoxin Research. 165-171.
- Glenn, E.; Richardson, A.; Bacon, E. 2004. Genetic and morphological characterization of a *Fusarium verticillioides* conidiation mutant. Mycol. Soc. of America . Mycology. 96:968-980.
- Guadarrama, M. N. 2005. Identificación morfológica y molecular de los hongos de la rizosfera del clavel (*Dianthus caryophyllus* L.) en Coatepec de Harinas, Estado de México. Tesis de licenciatura. Depto. de Parasitología Agrícola. Univ. Autónoma Chapingo. Texcoco, Méx. México. 48 p.

- Harris, L.; Desjardins, A.; Plattner, R.; Nicholson, G.; Butler, J.; Young, C.; Weston, R.; Proctor, H.; Hohn, M. 1999. Possible role of trichothecene mycotoxins in virulence of *Fusarium graminearum* on maize. *Plant Disease* 83:954-960
- 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.
- Jayaraman, S.; Parihar, D. B. 1975. Isolation of a growth promoting pigment from foodgrains infested with *Fusarium moniliforme*. *Indian Journal of Experimental Biology*. 13(3): 313-314.
- Kimura, Y.; Takashi, H.; Nakajima, H. 1981. Isolation, Identification and Biological Activities of 8-O-Methyl- javanicin Produced by *Fusarium solani*. *Agric. Biol Chem.* 45 (11): 2653-2654
- Klittich, J. R.; Leslie, J. F. 1992. Identification of a second mating population within the *Fusarium moniliforme* anamorph of *Gibberella fujikuroi*. *Mycologia* 84: 541-547.
- Kurobane, I.; Vining, L. C.; McInnes, A. G.; Gerber, N. N. 1980. Metabolites of *Fusarium solani* related to dihydrofusarubin. *The journal of antibiotics*. 11 (33): 1376-1379.
- Leslie, J. F.; Summerell, S. B. 2006. *The fusarium laboratory manual*. Irs. Ed. Blackwell Publi. Iowa, USA. 388 p.
- Levic, J.; Halda, L.; Penčić, V. 1994. Reduced pigmentation and growth of *Fusarium* cultures caused by *Enterobacter cloacae* strains. *Phytopathologia Mediterranea*. 33(1): 71-77.

- Lezica, F.P.; Filip, R.; Gorzalczany, S.; Ferraro, G.; Erausquin, G. A.; Rivas, C.; Ladaga, G.J.B. 2009. Prevalence of ergot derivatives in natural ryegrass pastures: detection and pathogenicity in the horse. *Theriogenology* 71: 422–431.
- Llanos, T. R. 1998. Descripción y usos de la reacción en cadena de la polimerasa (RCP) en fitobacteriología. Tesis de licenciatura. Depto. de Parasitología Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo, Texcoco Méx. 51p
- López, L. M. 2003. El cultivo del maíz y la colaboración del fitomejorador para establecer la autosuficiencia. *Revista Mexicana de Agronegocios*. 7(12): 596–605.
- Marasas, W.; Rabie, C. J.; Thiel, P.G.; Nelson, P. E.; Toussoun, T.A. 1986. Moniliformin production in *Fusarium* section *liseola*. *Mycologia*. 78(2):242–247.
- Menniti, A. M.; Gregori, R.; Neri, F. 2010. Activity of natural compounds on *Fusarium verticillioides* and fumonisin production in stored maize kernels. *International Journal of Food Microbiology* 136: 304–309.
- Mendoza, E. M.; Andrio, E. E.; López, B. A.; Rodríguez, G. R.; Moreno, L. L.; Rodríguez, H. S. 2006. Tasa de Infección de la pudrición del tallo en maíz causada por *Fusarium moniliforme*. *Agronomía mesoamericana* 17: 19–24.
- Medentsev, A. G.; Arinbasarova, A. Yu.; Akimenko, V. K. 2005. Biosynthesis of Naphthoquinone Pigments by Fungi of the Genus *Fusarium*. *Applied Biochemistry and Microbiology* 41: 503–507.
- Miller, M.W.1961. The Pfizer handbook of microbial metabolites. McG. Company, INC.USA.792 p.
- Mórales- Rodríguez, I.; Yáñez- Morales, M.; Silva-Rojas, H.V.; García-de-los-Santos, G.; Guzman – de- Peña, D. 2006. Biodiversity of *Fusarium* species in Mexico associated with ear rot in maize, and their identification using a phylogenetic approach. *Mycopathologia* 163: 31–39

- Munkvold, G.P.; Desjardins, A. S. 1997. Fumonisin in maize. Can we reduce their occurrence? *Plant Disease* 81(6): 556-563.
- Nelson, P.E.; Toussoun, T.A.; Marasas. W. F. 1983. *Fusarium* species; an illustrate manual for identification. The Penn. Stat. Univ. Press. USA. 193 p.
- Nelson, P. E.; Burgess, L. W.; Summerell, B. A. 1990. Some morphological and physiological characters of *Fusarium* species in sections *liseola* and *elegans* and similar species. *Mycologia* 82 (1): 99-106.
- Nelson, P. E. 1992. Taxonomy and biology of *Fusarium moniliforme*. *Mycopathologia*, 117:29-36.
- Nirenberg, H. I.; O'Donnell, K. 1998. New *Fusarium* species and combinations within the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia*. 90 (3): 434-458
- Oren, L.; Smadar, E.; Cohen, D.; Sharom, A. 2003. Early events in the *Fusarium verticillioides*-maize interaction characterized by using a green fluorescent protein-expressing transgenic isolate. *Appl. Environ. Microbiol.* 69(3): 1695–1701.
- Oropeza, R. M.; Molina, G. J.; Cervantes, T. S. 2004. Logros del programa de mejoramiento genético de maíz del Campus Veracruz – C.P. al 2004. *Agrociencia* 36(4):421-431.
- Ortiz-Zamora, F. 2002. Procesamiento morfológico de imágenes en color. Aplicación a la reconstrucción geodésica. Tesis doctoral, Depto. de Física, Ingeniería de sistemas y Teoría de la señal. Universidad de Alicante. Alicante, España. 8-40 pp.
- Peiretti-Uzal, D.A.; Nazar-Lovera, M.; Biasutti-Valenzano, C.; Giorda-Lerda, L. 2007. Susceptibilidad a *Fusarium verticillioides* (S.) Nirenberg en la población de maíz mpb-fca 8561. *Agron Mesoam.* 18(2): 171-176.

- Phelps, D.C.; Nemeč, S.; Baker, R.; Mansell, R. 1990. Immunoassay for naphthazarin phytotoxins produced by *Fusarium solani*, *Phytopathology*. 80 (3) : 298-302.
- Sandoval-Mejía, L. A.; Bueso-Uclés, F. Javier.; Vélez-Nauer, M. 2008. Predicción nutricional para pastos tropicales por espectroscopia de reflectancia en el infrarrojo cercano. *Agron. Mesoam.* 19 (2): 221-225.
- Schulthess, K. F.; Cardwell, K. F.; Gounou, S. 2002. The effect to endophytic *Fusarium verticillioides* on infestation of two maize varieties by lepidopterous stemborers and coleopteran grain feeders. *Phytopathology* 92: 121-128
- Singh, D.; Singh, T. 1977. Location of *Fusarium moniliforme* in kernels of maize and disease transmission. *Indian Journal of Mycology and Plant Pathology* 7:32-38.
- Shihomi, U.; Michio, I.; Makoto, K. 2009. Structure and organization of the rDNA intergenic spacer region in *Pythium ultimum*. *Mycoscience* 50 (19):224-232.
- Stewart, D. W.; Reid, L.; R. M.; Nicol, W.; Schaafsma, W. A. 2002. A mathematical simulation of growth of *Fusarium* in maize ears after artificial inoculation. *Phytopathology* 92 (5):534-541.
- Sugita, T.; Ikeda, R.; Nishikawa, A. 2004. Analysis of *Trichosporon* isolates obtained from the houses of patients with summer-type hypersensitivity pneumonitis. *Journal.Clin. Microbiol* 42 (12): 5467-5471.
- Tamura, K.; Dudley, J.; Nei, M.; Kumar, S. 2007. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software ver. 4.0. *Molecular Biology Evolution* 24: 1596-1599.
- Thomas, M.D.; Buddenhagen, I.W. 1980. Incidence and persistence of *Fusarium moniliforme* in symptomless maize kernels and seedlings in Nigeria. *Mycologia* 72(5):882-887.

- Thompson, J.D.; Higgins, D. G.; 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.
- Torren, F. A. 2008. Rodríguez- Montessoro,R.; De León, C. In *El cultivo del maíz; temas selectos 1ra.* Mundi-Prensa.126p.
- Valadez, M. E. 2000. *Huellas de ADN en genomas de plantas.* Ediciones Mundi prensa, México. 147 p.
- Vigier, B.; Reid, M. L.; Seifert, A. K.; Stewart, W. D.; and Hamilton, R. I. 1997. Distribution and prediction of *Fusarium* species associated with maize ear rot in Ontario. *Can. J. Plant Pathology* 19(1):60-65.
- Visconti, A. ; Surico, G.; Iacobellis, N.S. ; Bottalico, A.1983. Production of pigments by isolates of *Fusarium moniliforme* Sheld. from cereals in Italy and their antibacterial acitivity. *Phytopathologia Mediterranea.* 22 (3): 152-156.
- Walker, S.; Leath, S. L.; Hagler, W. M.; Murphy, P. J. 2001. Variation among isolates of *Fusarium graminearum* associated with Fusarium head blight in North Carolina. *Plant Disease* 85:404-410.
- Whalley, J. A. Whalley. 2003. The name fusarium moniliforme should no longer be used. *Mycol. Res.* 107 (6): 641-644
- 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.
- White, D. G. 2004. *Plagas y enfermedades del maíz.* Ed. Mundi- Prensa. American Phytopathological Society. USA. 78 p.
- Wilke, A. L.; Bronson, C. R.; Tomas, A.; Munkvold, G. P. 2007. Seed Transmission of *Fusarium verticillioides* in maize plants Grown Under Three Different Temperature Regimes. *Plant Disease.* 91:1109-1115.

- Yates, I.E.; Jaworski, A. J.2000. Differential growth of *Fusarium moniliforme* relative to tissues from 'Silver Queen', a sweet maize. *Can. J. Bot* 78(4): 472–480.
- Zhang, Z.; Schwart, S.; Wagner, L; Miller, W. 2000. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *Journal of Computational Biology* 7: 203-214.
- Zeng, J.; Souza, M. C.; Fukushima, K. ;Takizawa, K.; Correja, M. O.; Pereira, N. R.; Nishimura, K. 2009. Identification of *Trichosporon* spp. Strains by Sequencing D1/D2 Region and Sub-typing by Sequencing Ribosomal Intergenic Spacer Region of Ribosomal DNA. *J Huazhong Univ Sci Technol [Med Sci]* 29: 655-658

Página. Web

Food Agriculture Organization. 1993. Maize in human nutrition. 168p. disponible en linea.

<http://www.fao.org/docrep/T0395E/T0395E00.htm>

APÉNDICE

PROGRAMA SAS PARCELAS CON DOBLE DIVISION

Programa SAS; variable severidad.

```
data alma;
input bloq $ aislamiento $ color $ tratamiento $ severidad;
datalines;

proc glm data=alma;
  class bloq aislamiento color tratamiento;
  model severidad = bloq aislamiento bloq* aislamiento
    color aislamiento *color bloq* aislamiento *color
    tratamiento aislamiento * tratamiento color* tratamiento
    aislamiento *color* tratamiento;
  means tratamiento /tukey;
  test h= aislamiento e=bloq* aislamiento;
  means aislamiento /tukey e=bloq* aislamiento;
  test h=color e=bloq* aislamiento *color;
  means color/tukey e=bloq* aislamiento *color;
  test h= aislamiento *color e=bloq* aislamiento *color;
run;
quit;
```

Programa SAS; variable peso raíz.

```
data alma;
input bloq $ aislamiento $ color $ tratamiento $ severidad;
datalines;

proc glm data=alma;
  class bloq aislamiento color tratamiento;
  model severidad = bloq aislamiento bloq* aislamiento
    color aislamiento *color bloq* aislamiento *color
    tratamiento aislamiento * tratamiento color* tratamiento
    aislamiento *color* tratamiento;
  means tratamiento /tukey;
  test h= aislamiento e=bloq* aislamiento;
  means aislamiento /tukey e=bloq* aislamiento;
  test h=color e=bloq* aislamiento *color;
  means color/tukey e=bloq* aislamiento *color;
  test h= aislamiento *color e=bloq* aislamiento *color;
run;
quit;
```

PROGRAMA SAS; ANÁLISIS INTERACCIÓN AISLAMIENTO- COLOR

Variable; área foliar

```
data interaccion;  
input cepcol $ micelio $ severidad;  
datalines;
```

```
proc anova;  
class cepcol micelio;  
model severidad=cepcol micelio;  
means micelio cepcol/tukey;  
run;  
quit;
```

Variable; peso de raíz

```
data interaccion;  
input cepcol $ micelio $ peso;  
datalines;
```

```
proc anova;  
class cepcol micelio;  
model peso=cepcol micelio;  
means micelio cepcol/tukey;  
run;  
quit;
```