



00381 3
21.

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE LAS MICOTOXINAS
PRODUCIDAS POR EL HONGO *Fusarium moniliforme*
SHELD. EN MAÍZ. Y SU RELACIÓN CON LAS
ENFERMEDADES DENOMINADAS 'PUDRICIÓN DE LA
MAZORCA' Y 'GERMINACIÓN PREMATURA'.

T E S I S

Que para obtener el Grado Académico de

**DOCTOR EN CIENCIAS
(BIOLOGÍA)**

P R E S E N T A

SERGIO AYVAR SERNA

DIRECTORA DE TESIS: DRA. MAGDA CARVAJAL MORENO

1997

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIA

***A mi esposa Mg. Luisa y
a mis hijos Ylenia Yatziri
y Sergio Jr.***

***A mis padres:
Ernestina y Emilio,
y a mis 12 hermanos.***

AGRADECIMIENTOS

A las personas

Que aportaron su esfuerzo en forma directa o que colaboraron indirectamente durante el desarrollo y la culminación del presente trabajo.

Dra. Magda Carvajal Moreno, por su apoyo como Directora de Tesis; por su participación en la fases de planificación, dirección, desarrollo y culminación de la investigación; por sus aportaciones durante la revisión de la tesis, y por brindarme su confianza y motivación constantes para realizar esta etapa en mi formación académica.

M. en C. Francisco Rojo Callejas, por su ayuda durante el análisis químico para la detección y cuantificación de las micotoxinas, y por su colaboración en la revisión de la tesis.

Dr. Ignacio Méndez Ramírez, por su ayuda en el análisis estadístico de los datos obtenidos en el campo y el laboratorio; así como por la revisión de la tesis.

Dra. María del Carmen Durán Domínguez de Bazúa, por su participación en mi Comité Tutorial; por su confianza y ayuda en la evaluación de la investigación y por la revisión de la tesis.

Dra. Silvia Denise Peña Botencourt, por su participación en mi Comité Tutorial; por su respaldo y disponibilidad para colaborar en la evaluación y revisión de la tesis.

Dr. Teófilo Herrera Suárez, por su actitud positiva para colaborar en beneficio de quienes queremos superarnos; por su confianza y ayuda en la revisión del manuscrito.

Dra. Evangelina Pérez Silva, por su disponibilidad para formar parte de mi Jurado y por su colaboración en la revisión del manuscrito de tesis.

Dra. Patricia Guevara Fefer, por su disponibilidad para participar en mi Jurado, y sus aportaciones durante la revisión de la tesis.

Lic. Aurelio Velázquez Ibarra, ex director del CSAEGRO, por su invaluable apoyo para obtener el permiso de la Institución para realizar mis estudios doctorales, y por la gran amistad que nos une.

Ing. Julio César López Uriza, Director General del CSAEGRO, por todas las facilidades otorgadas durante la etapa final de mi Doctorado, y por la confianza y amistad que siempre me ha manifestado.

M. en C. Alejandro C. Michel Aceves, director del Centro de Estudios Profesionales del CSAEGRO, por el apoyo otorgado a mi familia durante mi estancia en la ciudad de México, y por nuestra amistad.

Dr. Dan Jeffers, por el apoyo y facilidades para realizar los dos experimentos de campo en 1994 y 1995, en el campo experimental El Batán de CIMMYT.

Dra. Elizabeth Cárdenas Soriano y Bióloga Guadalupe Valdovinos Ponce, por el asesoramiento y las facilidades para trabajar en su Laboratorio de Histopatología del Instituto de Fitosanidad del Colegio de Postgraduados.

Bióloga Carmen Loyola Blanco, por su colaboración en el trabajo fotográfico.

Dibujante Felipe Villegas Márquez, por su apoyo en la elaboración de figuras.

Al personal de apoyo en campo y laboratorio del área de Fitopatología del Programa de Maíz de CIMMYT, especialmente a **Miguel, Tirso, Oswaldo, Lucas y Josafat**, por su gran cooperación en la fase operativa de los experimentos de campo de 1994 y 1995.

A Don Juanito Martínez, por su respaldo moral en las etapas más difíciles de mis estudios doctorales.

A mis compañeros de estudio: **Teresa Álvarez, Lupita Moctezuma, Luis Villarreal, Roberto Montes, Isaac Luna y Adolfo Stanley**, por todas las vivencias compartidas.

Y a las siguientes personas que me permitieron compartir su lugar de trabajo en el Laboratorio de Micología: **M. en C. Elvira Aguirre**, **Dra. Genoveva García**, **Dra. Patricia Lappe**, **M. en C. Rebeca Martínez**, **Dr. Miguel Ulloa**, **Biól. Samuel Aguirre** y **Sr. Bruno Acosta**.

A las instituciones

Que colaboraron en diversas áreas para hacer posible la realización de este trabajo multidisciplinario:

Colegio Superior Agropecuario del Estado de Guerrero, por el apoyo económico y las facilidades para llevar a cabo mi Programa de Estudios de Doctorado.

Instituto de Biología de la UNAM, por ayudarme con sus instalaciones, material y equipo, y por las facilidades para la realización de la tesis.

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por otorgarme la beca de Doctorado que hizo posible mi estancia en la Ciudad de México.

Gobierno del Estado de Guerrero, que a través de la Secretaría de Educación, me concedió la 'Beca Guerrero' para sufragar parte de mis gastos.

Facultad de Ciencias de la UNAM, por el apoyo para realizar los trámites de inscripción al Programa de Doctorado.

Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo, por su apoyo con instalaciones, equipo, material y personal para realizar los experimentos de campo de 1994 y 1995.

Instituto de Fitosanidad del Colegio de Postgraduados, por las facilidades para realizar los estudios de histopatología y microscopía electrónica de barrido.

CEICADAR del Colegio de Postgraduados, por su colaboración durante el muestreo en campo, en las localidades del estado de Puebla.

Instituto de Investigaciones en Matemáticas Aplicadas y Sistemas de la UNAM, por sus facilidades para el procesamiento estadístico de la información.

CONTENIDO

Página

Dedicatoria	i
Agradecimientos	ii
Contenido	iv
Lista de Tablas	vii
Lista de Figuras	x
Lista de Apéndices	xii
Resumen	xiv
Abstract	xv
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	2
2.1 El hongo <i>Fusarium moniliforme</i>	2
2.2 Enfermedad Germinación prematura del maíz	6
2.3 Enfermedad Pudrición de la mazorca	7
2.4 Micotoxinas de <i>F. moniliforme</i>	9
a. Zearalenona (ZEA) o toxina F-2	9
b. Tricotecenos	11
- Toxina T-2	12
- Diacetoxiscirpenol	13
- Desoxinivalenol o vomitoxina	13
2.5 Técnicas para el análisis de micotoxinas	14
a. Técnica de Thomas <i>et al.</i> (1975)	14
b. Técnica de Romer (1986)	14
c. Cromatografía de capa fina (TLC)	14
d. Cromatografía de líquidos (HPLC)	15
III. OBJETIVOS	16
3.1 Objetivo general	16
3.2 Objetivos específicos	16
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	17
4.1 Biología de <i>F. moniliforme</i> Sheld.	17
a. Aislamientos monospóricos de <i>F. moniliforme</i>	17
b. Histopatología de granos de maíz	19
4.2 Fitopatología de la interacción <i>F. moniliforme</i> -maíz	20
4.2.1 Experimento de campo 1994	20
a. Tratamientos	20
b. Diseño y unidades experimentales	20
c. Establecimiento y manejo del cultivo de maíz	22

d.	Multiplicación de los aislamientos monospóricos	22
e.	Inoculación de las plantas de maíz	23
f.	Evaluación de enfermedades foliares, acame de raíz y cobertura de mazorca	23
g.	Cosecha	25
h.	Variables de estudio	25
i.	Análisis estadístico de las variables de estudio	26
4.2.2	Experimento de campo 1995	26
a.	Factores de estudio y tratamientos	26
b.	Diseño y unidades experimentales	27
c.	Establecimiento y manejo del cultivo de maíz	28
d.	Multiplicación de los aislamientos monospóricos	28
e.	Inoculación de las plantas de maíz	28
f.	Cosecha	28
g.	Variables de estudio	28
h.	Análisis estadístico	28
4.3	Análisis químico de micotoxinas en maíz del experimento de campo 1994	29
-	Preparación de estándares	29
4.3.1	Aislamiento e identificación de zearalenona (ZEA)	29
a.	Extracción mediante la técnica de Thomas <i>et al.</i> (1975)	29
b.	Aislamiento e identificación mediante TLC	30
c.	Cuantificación por HPLC y espectrofotometría UV/Vis	31
4.3.2	Aislamiento e identificación de tricotecenos (T-2, DAS y DON)	32
a.	Extracción mediante la técnica de Romer (1986)	33
b.	Cuantificación por HPLC y espectrofotometría UV/Vis	33
-	Toxina T-2	33
-	Diacetoxiscirpenol (DAS)	34
4.4	Análisis químico de micotoxinas en maíz del experimento de campo 1995	34
4.4.1	Aislamiento e identificación de ZEA	34
4.4.2	Aislamiento e identificación de tricotecenos (T-2, DAS y DON)	34
V.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
5.1	Biología de <i>F. moniliforme</i>	35
a.	Aislamientos monospóricos	35
b.	Conservación de <i>F. moniliforme</i> en el laboratorio	39
c.	Histopatología de granos de maíz	39

5.2	Fitopatología de la interacción <i>F. moniliforme</i> - maíz	41
5.2.1	Experimento de campo 1994	41
a.	Enfermedades foliares, acame de raíz y cobertura de mazorca	41
b.	Genotipo 1 de maíz	42
c.	Genotipo 2 de maíz.	46
d.	Análisis general de la respuesta de los genotipos 1 y 2 de maíz	50
5.2.2	Experimento de campo 1995	52
a.	Porcentaje de pudrición de mazorca (% PM)	52
b.	Número de granos con germinación prematura (NGGP)	52
c.	Porcentaje de mazorcas con germinación prematura (% MGP)	54
d.	Peso de mil granos (PMG)	55
e.	Peso total de granos (PTG)	56
f.	Días a floración masculina (DFM) y a floración femenina (DFF)	56
g.	Análisis de correlación	57
5.3	Análisis químico de micotoxinas en maíz	58
5.3.1	Aislamiento y cuantificación de zearalenona (ZEA)	58
a.	Experimento de campo 1994	58
b.	Experimento de campo 1995	64
5.3.2	Aislamiento y cuantificación de la toxina T-2	67
a.	Experimento de campo 1994	67
b.	Experimento de campo 1995	69
5.3.3	Aislamiento y cuantificación de diacetoxiscirpenol (DAS)	71
a.	Experimento de campo 1994	71
b.	Experimento de campo 1995	73
VI.	CONCLUSIONES	74
VII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77
VIII.	APÉNDICES	87

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1. Aislamientos monospóricos de <i>F. moniliforme</i> y tratamientos testigo evaluados en el experimento de campo 1994	21
2. Variables de respuesta evaluadas en el experimento de campo 1994.	25
3. Aislamientos monospóricos de <i>F. moniliforme</i> evaluados en el experimento de campo 1995.	26
4. Genotipos de maíz cultivados en el experimento de campo 1995.	27
5. Número, lote, concentración y dosis de los estándares de ZEA, T-2, DAS y DON analizados mediante cromatografía de capa fina (TLC)	29
6. Color y origen de las colonias de 94 aislamientos monospóricos de <i>F. moniliforme</i> cultivadas en papa-dextrosa-agar (PDA)	36
7. Valores de los cuadrados medios (CM) y probabilidad (P) obtenidos de los análisis de varianza de las variables evaluadas en el genotipo 1 de maíz cultivado en el experimento de campo 1994.	43
8. Análisis de correlación (valores de r) de las variables evaluadas en el genotipo 1 de maíz cultivado en el experimento de campo 1994	45
9. Valores de cuadrados medios (CM) y probabilidad (P) obtenidos de los análisis de varianza de las variables evaluadas en el genotipo 2 de maíz cultivado en el experimento de campo 1994.	47
10. Análisis de correlación (valores de r) de las siete variables evaluadas en el genotipo 2 de maíz cultivado en el experimento de campo 1994	49
11. Valores promedios de las variables evaluadas en el experimento de campo 1994	50
12. Precipitación pluvial (pp) y temperaturas máxima (máx.) y mínima (mín.) mensuales durante el período mayo-diciembre de 1993-1995 en EL Batán, CIMMYT, Edo. de México	51

Tabla	Página
13. Valores del cuadrado medio (CM) y probabilidad (P) obtenidos de los análisis de varianza de las variables evaluadas en el experimento de campo 1995.	53
14. Prueba de Tukey de los valores promedio de 5 variables evaluadas en los genotipos de maíz inoculados con cuatro aislamientos monospóricos de <i>F. moniliforme</i> , en el experimento de campo 1995.	55
15. Análisis de correlación (valores de <i>r</i>) de las variables evaluadas en el experimento de campo 1995	57
16. Áreas del cromatograma y valores de la ecuación de la recta de regresión utilizados para graficar la curva de calibración de ZEA	60
17. Valores del cuadrado medio (CM) y probabilidad (P) de los análisis de varianza de la concentración de las micotoxinas zearalenona (ZEA), toxina T-2 y diacetoxiscirpenol(DAS) en los genotipos 1 y 2 de maíz del experimento de campo 1994	61
18. Concentraciones de ZEA , T-2 y DAS ($\mu\text{g}/\text{kg}$) en los genotipos 1 y 2 de maíz del experimento de campo 1994	62
19. Análisis de correlación (valores de <i>r</i>) de la concentración de las micotoxinas zearalenona (ZEA), toxina T-2 y diacetoxiscirpenol (DAS), con las demás variables evaluadas en los genotipos 1 y 2 del experimento de campo 1994	63
20. Valores del cuadrado medio (CM) y de probabilidad (P) de la concentración de las micotoxinas zearalenona (ZEA), toxina T-2 y diacetoxiscirpenol (DAS), en el experimento de campo 1995	64
21. Concentraciones de ZEA ($\mu\text{g}/\text{kg}$) en 3 genotipos de maíz inoculados con aislamientos monospóricos de <i>F. moniliforme</i> , en el experimento de campo 1995	65
22. Análisis de correlación (valores de <i>r</i>) de la concentración de las micotoxinas zearalenona (ZEA), toxina T-2 y diacetoxiscirpenol (DAS), con las demás variables evaluadas en el experimento de campo 1995	66
23. Áreas del cromatograma y valores de la ecuación de la recta de regresión utilizados para graficar la curva de calibración de T-2	68

Tabla

Página

24.	Concentraciones de T-2 ($\mu\text{g}/\text{kg}$) en 3 genotipos de maíz inoculados con aislamientos monospóricos de <i>F. moniliforme</i> , en el experimento de campo 1995	70
25.	Áreas del cromatograma y valores de la ecuación de la recta de regresión utilizados para graficar la curva de calibración de DAS	72
26.	Concentraciones de DAS ($\mu\text{g}/\text{kg}$) en 3 genotipos de maíz inoculados con aislamientos monospóricos de <i>F. moniliforme</i> , en el experimento de campo 1995	73

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Distribución mundial del hongo <i>Fusarium moniliforme</i> (= <i>Gibberella fujikuroi</i>) (Commonwealth Mycological Institute, 1963)	2
2. Distribución nacional del hongo <i>Fusarium moniliforme</i> (= <i>Gibberella fujikuroi</i>)	2
3. Principales sistemas taxonómicos propuestos para <i>Fusarium</i> (Nelson <i>et al.</i> , 1983).	3
4. Síntomas de la enfermedad Germinación prematura . Elotes testigo (A) e inoculado (B).	7
5. Síntomas de la enfermedad Pudrición de la mazorca	8
6. Estructura química de la zearalenona (Pier, 1981)	10
7. Estructura química de los tricotecenos: Toxina T-2, diacetoxiscirpenol (DAS) y desoxinivalenol (DON) (Cole y Cox, 1981; Pier, 1981)	12
8. Características de la unidad experimental	20
9. Características del punzón	23
10. Escala de calificación enfermedades foliares (CIMMYT, 1985)	24
11. Escala de calificación de cobertura de mazorca (CIMMYT, 1985)	24
12. Escala de calificación de pudrición de mazorca por <i>F. moniliforme</i> Sheld	26
13. Preparación de las muestras para el análisis químico por cromatografía de capa fina (TLC)	30
14. Preparación de las muestras para el análisis químico por cromatografía de líquidos (HPLC)	32

Figura

15. Características del micelio (m), conidióforos (cf), macroconidios (ma), microconidios individuales (mi), en cadena (mc) y en falsas cabezuelas (fc), de <i>F. moniliforme</i> Sheld. observadas al microscopio compuesto.	37
16. Características de esporodoquios (es), macroconidios (ma) y macroconidióforos (monofialides, mo) de <i>F. moniliforme</i> Sheld., observadas en el microscopio de barrido	38
17. Cortes transversales del coleóptilo y longitudinales de la radícula del embrión y en el pericarpio de granos de maíz infectados por <i>F. moniliforme</i> Sheld. Aleurona (al), coleóptilo (co), endospermo (en), radícula (ra), escutelo (es), tejido colapsado (tc), pericarpio (p) y micelio del hongo (mh)	40
18. Cromatografía de placa fina (TLC) de muestras y estándar de ZEA	58
19. Cromatogramas del estándar de ZEA y de la muestra 40	59
20. Curva de calibración para la cuantificación de zearalenona	60
21. Cromatografía de placa fina (TLC) de muestras y estándares de T-2 y DAS	67
22. Cromatogramas del estándar de T-2 y de la muestra 34	67
23. Curva de calibración para la cuantificación de toxina T-2	68
24. Cromatogramas del estándar de DAS y de la muestra 85	71
25. Curva de calibración para la cuantificación de diacetoxiscirpenol	72

LISTA DE APÉNDICES

Apéndice	Página
1. Hospedantes y síntomas causados por <i>Fusarium moniliforme</i> Sheld.	87
2. Efectos patológicos provocados por razas toxígenas de <i>F. moniliforme</i> Sheld. en animales domésticos y de laboratorio	88
3. Distribución de los tratamientos con tres repeticiones en los genotipos 1 y 2 de maíz en un diseño experimental "Alfa látice", en el experimento de campo 1994	89
4. Distribución de los tratamientos con tres repeticiones en un diseño experimental de "Bloques al Azar con Parcelas Divididas", en el experimento de campo 1995	90
5. Tratamientos y repeticiones del experimento de campo 1994, seleccionados para el análisis químico de ZEA, T-2, DAS y DON	91
6. Tratamientos y repeticiones del experimento de campo 1995, seleccionados para el análisis químico de ZEA, T-2, DAS y DON	92
7. Prueba de Tukey del porcentaje de Pudrición de mazorca del genotipo 1 de maíz inoculado con 94 aislamientos de <i>F. moniliforme</i> en el experimento de campo 1994	93
8. Prueba de Tukey del porcentaje de mazorcas con Germinación prematura del genotipo 1 de maíz inoculado con 94 aislamientos de <i>F. moniliforme</i> en el experimento de campo 1994.	94
9. Prueba de Tukey del porcentaje de Pudrición de mazorca del genotipo 2 de maíz inoculado con 94 aislamientos de <i>F. moniliforme</i> en el experimento de campo 1994	95
10. Prueba de Tukey del número de granos con Germinación prematura del genotipo 2 de maíz inoculado con 94 aislamientos de <i>F. moniliforme</i> en el experimento de campo 1994	96

Apéndice

Página

11.	Prueba de Tukey del porcentaje de mazorcas con Germinación prematura del genotipo 2 de maíz inoculado con 94 aislamientos de <i>F. moniliforme</i> en el experimento de campo 1994	97
12.	Prueba de Tukey del peso de mil granos (g) del genotipo 2 de maíz inoculado con 94 aislamientos de <i>F. moniliforme</i> en el experimento de campo 1994	98
13.	Prueba de Tukey del peso total de granos (g) del genotipo 2 de maíz inoculado con 94 aislamientos de <i>F. moniliforme</i> en el experimento de campo 1994	99
14.	Prueba de Tukey de 4 variables evaluadas en 18 genotipos de maíz inoculados con aislamientos de <i>F. moniliforme</i> , en el experimento de campo 1995	100
15.	Valores de Rf y concentración de zearalenona ($\mu\text{g}/\text{kg}$) en las muestras de los genotipos 1 y 2 de maíz del experimento de campo 1994	101
16.	Valores de Rf y concentración de zearalenona (ZEA) en muestras de maíz del experimento de campo 1995	102
17.	Valores de Rf y concentración de toxina T-2 ($\mu\text{g}/\text{kg}$) en las muestras de los genotipos 1 y 2 de maíz del experimento de campo 1994	103
18.	Valores de Rf y concentración de toxina T-2 en muestras de maíz del experimento de campo 1995	104
19.	Valores de Rf y concentración de diacetoxiscirpenol (DAS) en las muestras del genotipo 2 de maíz del experimento de campo 1994	105
20.	Valores de Rf y concentración de diacetoxiscirpenol (DAS) muestras de maíz del experimento de campo 1995	106

RESUMEN

La presente investigación se realizó con los objetivos de: (a) Observar la morfología del hongo *F. moniliforme* Sheld en medios de cultivo y en tejidos de granos de maíz afectados por **Germinación prematura** y (b) Evaluar la virulencia y la capacidad de producción de las micotoxinas zearalenona (ZEA), toxina T-2, diacetoxiscirpenol (DAS) y desoxinivalenol (DON), de aislamientos monospóricos de este hongo inoculados en maíz cultivado en campo.

Se obtuvieron 94 aislamientos monospóricos del hongo, se observó su morfología en medios de cultivo papa-dextrosa-agar, hojas de clavel-agar y KCl-agar, y se conservaron en gel de sílice en tubos de ensayo. Se realizó la histopatología en granos con **Germinación prematura**.

Los 94 aislamientos monospóricos se inocularon en los genotipos TL94A-1977-15 (G-1) y TL94A-1977-17 (G-2) de maíz cultivados en el campo El Batán, CIMMYT en 1994. Se midieron las variables: Porcentaje de **Pudrición de mazorca**, número de granos y porcentaje de mazorcas con **Germinación prematura** y otras que son componentes del rendimiento de grano, que se sometieron al análisis de varianza, la prueba de Tukey y el análisis de correlación. Se seleccionaron 78 muestras de grano y se efectuó el análisis químico de ZEA, T-2, DAS y DON. Asimismo, en 1995 se inocularon los aislamientos monospóricos: C-591, P-12, P-44 y P-64 en 18 genotipos de maíz cultivados en el mismo lugar. Se midieron las variables mencionadas y se efectuó el análisis estadístico. Se realizó el análisis químico de estas micotoxinas en 45 muestras.

Los aislamientos monospóricos produjeron principalmente pigmentaciones rojo carmín (31%), violeta (24%) y anaranjada (20%); formaron masas de macroconidios en esporodocios y abundantes microconidios en cadena; conservaron su viabilidad y patogenicidad por 1 año o más, almacenados en el gel de sílice. Se localizaron hifas del hongo en los tejidos del escutelo, coleoriza, chalaza y pericarpio de granos con **Germinación prematura**. Se observó la presencia de cuerpos esféricos oscuros y núcleos anormales en células de la aleurona, así como la separación y el colapso de células del embrión colonizadas por el hongo.

Los 94 aislamientos monospóricos del hongo causaron **Pudrición de mazorca** y **Germinación prematura** en los 2 genotipos cultivados en 1994. Los de Puebla (P-24, 28, 34, 35, 36, 62, 63 y 67) y de CIMMYT (C-474, 574) provocaron los daños más severos de **Pudrición de mazorca**. Los síntomas más severos de **Germinación prematura** los ocasionaron los aislamientos de Puebla (P-34, 38, 46, 63, 64 y 76) y de CIMMYT (C-520 y 624). El rendimiento de grano del genotipo 2 fue más afectado por las dos enfermedades, que el del genotipo 1. Los daños de estas dos enfermedades se correlacionaron en forma positiva y estadísticamente significativa.

Los 18 genotipos de maíz inoculados en 1995 no presentaron diferencias estadísticas en el porcentaje de **Pudrición de mazorca**; pero si mostraron variaciones significativas en el número de granos afectados por **Germinación prematura**. El aislamiento P-64 provocó los síntomas más severos de pudrición (69.9%) y de germinación prematura (36.57%) de mazorcas y fue el que más afectó el rendimiento de grano, el cual disminuyó al aumentar el tejido de la mazorca colonizado por el hongo. Los genotipos tardíos tendieron a producir mazorcas con más pudrición.

En las 78 muestras analizadas en 1994, la micotoxina ZEA se detectó en el 73.1%, con niveles de 11.996 a 2039.474 $\mu\text{g}/\text{kg}$. La T-2 se detectó en el 28.2%, con concentraciones de 85.735 a 2399.222 $\mu\text{g}/\text{kg}$. El DAS se encontró en 16.7%, de 52.114 a 673.443 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Se encontró una correlación positiva entre los niveles de la toxina T-2 y el porcentaje de **Pudrición de la mazorca**. En las 45 muestras analizadas en 1995, se confirmó la presencia de ZEA en el 31.1% (19.05 a 386.489 $\mu\text{g}/\text{kg}$); de T-2 en el 40% (157.217 a 278.767 $\mu\text{g}/\text{kg}$) y DAS en el 71.1%, en concentraciones de 32.251 a 453.148 $\mu\text{g}/\text{kg}$. El DON no se detectó en las muestras de 1994 ni de 1995. Los niveles de ZEA se correlacionaron en forma positiva con las concentraciones de la toxina T-2, en los granos de maíz colonizados.

ABSTRACT

The aims of the present research were: (a) To know the morphology of the fungus *Fusarium moniliforme* Sheld. in culture media and in sprouted maize kernel tissues, and (b) to evaluate the toxicity and the mycotoxin production of zearalenone (ZEA), T-2 toxin, diacetoxyscirpenol (DAS) and deoxynivalenol (DON) of monosporic isolates of this fungus inoculated in field grown maize. Ninety four fungal monosporic isolates were obtained and their fungal colonization was studied in culture media potato-dextrose-agar, carnation leaves agar and KCl- agar, and their preservation in tubes with silica gel. The histopathology of sprouted grains was realized.

Ninety four monosporic isolates of *F. moniliforme* were inoculated in TL94A-1977-15 (G1) and TLO4A 1977 17 (G2) maize genotypes grown in CIMMYT Campus Texcoco, Mexico, in 1994. The variables taken into account were: ear rot percentage, sprouted grains number, sprouted ears percentage, and other components of grain yield, which undergo to: a variance analysis, Tukey's test and correlation analysis. Seventy eight grain samples were selected and a chemical analysis was done to determine ZEA, T-2, DAS and DON. In 1995, the monosporic isolates: C-591, P-12, P-44 and P-64 were inoculated in 18 maize genotypes in the same campus. The mentioned variables were measured and a statistical analysis was done. The chemical analysis of the mycotoxins: ZEA, T-2, DAS and DON in 45 samples was obtained.

The monosporic isolates of *F. moniliforme* produced mainly carmin red (31%), purple (24%) and orange (20%) pigmentations; they formed conidia groups in sporodochia and abundant microconidia in chains; they were alive and pathogenic for a year or more, stored in silica gel. The places where the fungus was present as hyphae were in the scutellum tissue, coleorhize, chalaza and pericarpium of the sprouted grains. Dark spherical bodies and abnormal nucleus in aleurone cells were present, as well as a collapse of the embryo cells colonized by the fungus.

The 94 monosporic isolates of the fungus caused ear rot and sprouting in both genotypes in 1994. The monosporic cultures from Puebla P-(24, 28, 34, 35, 36, 62, 63 and 67) and from CIMMYT (C-474 and C-574) produced severe ear rot symptoms. The worse symptoms of sprouting were produced with the isolates of Puebla P-(34, 38, 46, 63, 64 and 76) and from CIMMYT (C-520 and C-624). Grain yield of genotype 2 was susceptible to both diseases than genotype 1. The damages of these two diseases were directly correlated with a positive statistical significance.

The 18 maize genotypes inoculated in 1995, did not have statistical differences in ear rot percentage; but showed significant variations in the number of sprouted grains. The isolate P-64 caused the most severe symptoms of rottenness (69.9%) and of sprouted ears (36.6%), and was the one that affected more the grain yield. The late genotypes produced more rotten ears.

In the 78 samples analysed in 1994, ZEA mycotoxin was detected in 73.1%, with the levels from 11.996 to 2039.474 $\mu\text{g}/\text{kg}$. T-2 toxin was detected in 28.2%, with the amounts from 85.735 to 2399.222 $\mu\text{g}/\text{kg}$. DAS was found in 16.7% of the samples, with the amounts from 52.114 to 673.443 $\mu\text{g}/\text{kg}$. There was a positive correlation between the amounts of T-2 toxin and ear rot percentage. In the 45 samples analysed in 1995, the presence of ZEA was confirmed in 31.1% with the levels from 19.05 to 386.489 $\mu\text{g}/\text{kg}$; T-2 toxin was in 40% of the samples in the levels from 157.217 to 278.767 $\mu\text{g}/\text{kg}$. DAS was detected in 71.1%, with the levels from 32.251 to 453.148 $\mu\text{g}/\text{kg}$. DON mycotoxin was not detected in the samples in 1994 and 1995. The levels of ZEA was correlated in a positive way, with the amounts of T-2.

I. INTRODUCCIÓN

El maíz (*Zea mays* L.) es una de las plantas más útiles al hombre. En México ocupa el primer lugar en superficie cultivada y en consumo diario por habitante; se utiliza como materia prima en la industria y en la elaboración de alimentos balanceados para animales. Por su gran adaptabilidad, se siembra en las condiciones naturales más heterogéneas del país, donde su producción es afectada por factores biológicos, climatológicos, sociales, económicos y políticos (Reyes, 1990).

El ataque de hongos fitopatógenos en condiciones de campo y almacén, es uno de los problemas que afectan la cantidad y la calidad de la cosecha de granos, así como de sus productos derivados. Entre ellos destaca *Fusarium moniliforme* Sheld., fitopatógeno facultativo cosmopolita, agente causal de las enfermedades denominadas **Putridión de la mazorca** y **Germinación prematura**, que causan daños severos durante el desarrollo y maduración del grano y después de la cosecha; se encuentran ampliamente distribuidas en las zonas de clima templado, subtropical y tropical del mundo, donde se produce este cereal para la alimentación del hombre y los animales domésticos (Booth, 1971; Ortega y De León, 1971; Navarrete, 1986).

Este hongo fitopatógeno es también toxígeno porque contamina a este cereal con micotoxinas como la zearalenona, tricotecenos, fusarina, moniliformina, fumonisinas y otras, que al ser ingeridas por el hombre y los animales en los alimentos contaminados provocan efectos tóxicos agudos, cancerígenos, teratógenos, mutágenos, eméticos y estrogénicos. Asimismo, afectan al desarrollo de las plantas y otros organismos (Cullen y Caldwell, 1983; Nelson *et al.*, 1983; Marasas *et al.*, 1984; Hsieh, 1988; Scudamore *et al.*, 1988; FAO, 1991).

En México se ha investigado la interacción de este hongo con el cultivo de maíz; los trabajos se han enfocado principalmente a estudiar la etiología, epifitología, fisiología de la planta enferma, severidad de daños y métodos de control (Zenteno-Zevada y Muñoz, 1968; Félix y Romero, 1981; Ortíz-Cereceres, 1983; Navarrete, 1986; González *et al.*, 1987; Bárcenas, 1988; Flores y Delgado, 1991; Cepeda y Venegas, 1992). Sin embargo, se ha generado menos información acerca de las micotoxinas específicas que produce este hongo en el campo y la relación que tienen estos metabolitos secundarios con el desarrollo de estas dos enfermedades (Carvajal, 1987).

La importancia de este cultivo y de los daños directos e indirectos que ocasiona este patógeno, motivaron la presente investigación que, en su primera fase, se enfocó a aislar, identificar y seleccionar cepas virulentas y a evaluar su potencial de producción de micotoxinas en maíz cultivado en condiciones de campo. En la segunda etapa del trabajo, se evaluó la respuesta de diversos genotipos de maíz a la colonización y producción de micotoxinas de las cepas más agresivas, para determinar si existía una interacción diferencial hospedante-patógeno, y considerar el uso de la resistencia genética como un método de control para este problema.

II. ANTECEDENTES

2.1 El hongo *F. moniliforme*

Distribución e importancia. Este hongo es un parásito facultativo cosmopolita diseminado en zonas templadas húmedas y subhúmedas, subtropicales y tropicales de África, Asia, América, Europa y Oceanía - Figura 1- (U.S.D.A., 1960; Commonwealth Mycological Institute, 1963; Booth, 1971; Ortega y De León, 1971; Walker, 1975; Burgess y Liddell, 1983; Nelson *et al.*, 1983; Frederiksen, 1986). Ataca a una amplia gama de cultivos de valor económico y produce toxinas que al ingerirlas dañan a los animales domésticos y al hombre (Marasas *et al.*, 1984; Frederiksen, 1986; Pittet *et al.*, 1992).



Figura 1. Distribución mundial del hongo *Fusarium moniliforme* (= *Gibberella fujikuroi*) (Commonwealth Mycological Institute, 1963)

En México este hongo se encuentra en las regiones del Golfo, Pacífico, Sureste, Valles Altos del Centro y El Bajío (Figura 2), afectando principalmente gramíneas y frutales (Díaz, 1979; Ortíz-Cereceres, 1983; González *et al.*, 1987; Hernández *et al.*, 1987; Navarrete *et al.*, 1987; Cepeda y Orozco, 1989; Covarrubias, 1989; Ayvar *et al.*, 1990; Cepeda y Venegas, 1991; Narro y Vega, 1993; Noriega *et al.*, 1995).



Figura 2. Distribución nacional del hongo *Fusarium moniliforme* (= *Gibberella fujikuroi*)

Rango de hospedantes y patogenicidad. *Fusarium moniliforme* se encuentra asociada con frecuencia al cultivo de maíz y a otros hospedantes ubicados en las familias: Amarantaceae, Amaryllidaceae, Asclepiadaceae, Betulaceae, Bromeliaceae, Buxaceae, Caryophyllaceae, Coniferae, Cruciferae, Convolvulaceae, Cucurbitaceae, Euphorbiaceae, Gramineae, Iridaceae, Lauraceae, Leguminosae, Liliaceae, Linaceae, Malvaceae, Marantaceae, Moraceae, Musaceae, Orchidaceae, Palmae, Polemoniaceae, Rosaceae, Rubiaceae, Rutaceae, Scrophulariaceae, Solanaceae, Sterculiaceae y Tiliaceae.

Las plantas enfermas presentan una sintomatología muy variable (Apéndice 1); sin embargo, los síntomas característicos provocados por este fitopatógeno principalmente en cereales, son: marchitez, tizón de plántulas, achaparramiento, hipertrofia, hiperplasia, secamiento y pudriciones de raíz, tallo y fruto (U.S.D.A., 1960; Booth, 1971; Ortega y De León, 1971; Walker, 1975; Burgess y Liddell, 1983; Marasas *et al.*, 1984; Agrios, 1985; Frederiksen, 1986; Romero, 1988; Holliday, 1989).

Taxonomía. *F. moniliforme* Sheld. (anamorfo) pertenece al Reino Fungi, División Eumycota, Subdivisión Deuteromycotina, Clase Hyphomycetes, Orden Moniliales, Familia Tuberculariaceae. Mientras que la fase sexual es *Gibberella fujikuroi* (Saw.) Wr. (teleomorfo) y se ubica en el Reino Fungi, División Eumycota, Subdivisión Ascomycotina, Clase Euascomycetes, Subclase Pyrenomycetidae, Orden Hypocreales, Familia Hypocreaceae (Herrera y Ulloa, 1990). La taxonomía de *Fusarium* es compleja y confusa porque se aplican diversos sistemas taxonómicos. Además, las especies mutan y degeneran con facilidad si se cultivan en forma sucesiva en el laboratorio. Hay confusión por la amplia sinonimia de este género (Marasas *et al.*, 1984). En esta investigación se utilizó el sistema propuesto por Nelson *et al.* (1983), que parte de la publicación de Wollenweber & Reinking (1935) y combina la información de varios sistemas taxonómicos desarrollados desde entonces hasta ahora (Figura 3).

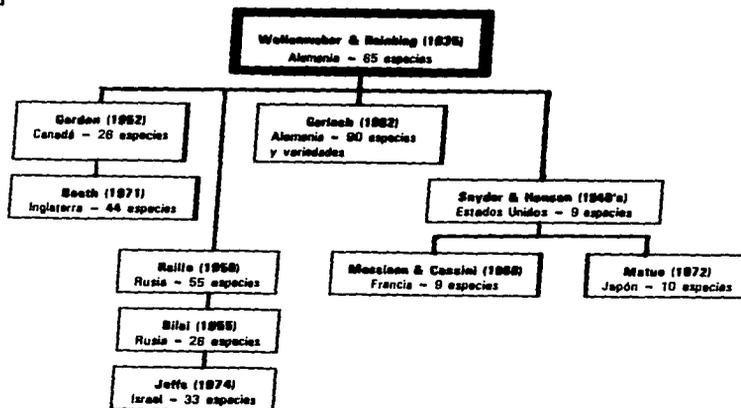


Figura 3. Principales sistemas taxonómicos propuestos para *Fusarium* (Nelson *et al.*, 1983)

Morfología y pigmentación de las colonias. En el medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA) el hongo forma micelio blanco, de crecimiento rápido. Al madurar la colonia produce pigmentaciones que fluctúan de anaranjado-violeta a violeta-oscuro (casi negro), pálido, lila, vináceo, crema o magenta-oscuro, de acuerdo con el código de colores propuesto por Nelson *et al.* (1983). Algunos cultivos carecen de coloración. El micelio aéreo es denso, varía de velludo a afieltrado, de aspecto pulverulento por la formación de microconidios. Los esporodoquios están normalmente ausentes, cuando se presentan son de color anaranjado-pálido a bronceado y están confluentes. Algunos aislamientos producen esclerocios de color usualmente azul-oscuro; pero esta característica disminuye o se pierde a través de transferencias sucesivas en medios de cultivo (Booth, 1971; Burgess y Liddell, 1983; Nelson *et al.*, 1983).

En algunos cultivos el micelio aéreo es suprimido y reemplazado por capas de macroconidios que le dan al cultivo un aspecto húmedo y amarillento (*pionnótide*); mientras que en otros no se desarrollan los esporodoquios ni la pigmentación de la colonia teniendo aspecto micelial (Nelson *et al.*, 1983).

Fase asexual (anamorfo). *F. moniliforme* Sheld. forma conidióforos en hifas aéreas; estos tienen una célula basal simple con 2 a 3 fiálides apicales, laterales, simples; miden de 20-30 μ de longitud, 2-3 μ de ancho en la base y 1-5 μ en el ápice. Los microconidios se forman agrupados en cabezas falsas sobre monofiálides y en cadenas basípetas originadas de conidióforos ramificados o en fiálides individuales. Son fusiformes, ovoides, elipsoidales o clavados, con la base ligeramente aplanada, usualmente son monocelulares, miden de 1.5-3.5 x 5-12 μ (Booth, 1971). Cuando se deslizan hacia la base de la cadena y se acumulan en gotas de muclago en los orificios de salida de las fiálides, presentan aspecto de ramillete o falsa cabeza (Walker, 1975; Herrera y Ulloa, 1990). El número de conidios y la longitud de las cadenas puede variar de un cultivo a otro; a veces, las cadenas tienen sólo 3 conidios (Walker, 1975; Burgess y Liddell, 1983; Nelson *et al.*, 1983). Los macroconidios se desarrollan de fiálides en hifas laterales; a veces son escasos. En medio de cultivo hojas de clavel-agar (HCA), se producen masas abundantes en esporodoquios anaranjado-pálidos. Son alargados, delgados, de falcados a casi rectos, con 3 a 7 septos; miden de 2.5-4 x 25-60 μ y su pared es delgada. La célula apical es ligeramente curvada y ahusada en el extremo y la célula basal tiene forma de pie (Booth, 1971; Walker, 1975; Burgess y Liddell, 1983; Nelson *et al.*, 1983). Esta especie se distingue por las cadenas largas de microconidios producidos por monofiálides individuales y la ausencia de clamidosporas (Burgess y Liddell, 1983; Nelson *et al.*, 1983).

Fase sexual (teleomorfo). *Gibberella fujikuroi* (Saw.) Wr. produce peritecios individuales o en grupos, superficiales o sumergidos en el substrato, de globosos a subcónicos, azul-oscuros, ostiolados, de 220-300 x 250-375 μ . Las ascas son rectas, elipsoidales a clavadas, con 4-8 ascosporas hialinas, de elipsoidales a fusiformes, con 1-3 septos, con sus extremos redondeados, con estrechamientos en los septos y dispuestas oblicuamente en 1 o 2 series en el asca. Las masas de ascosporas son de color ocre-asalmonado; miden de 3.9-6.0 x 14-19 μ (Booth, 1971; Walker, 1975; Frederiksen, 1986; Nelson *et al.*, 1983).

Genética. Este hongo muta con frecuencia en sus características de cultivo, morfológicas y de virulencia (Walker, 1975; Nelson *et al.*, 1983). Es heterotálico, tiene un sistema simple de entrecruzamiento, con dos tipos de compatibilidad (A y B) determinados por alelos alternos en un solo locus. En un cruzamiento fértil una raza produce gametos femeninos y otra, masculinos. Esta unión sexualmente compatible origina peritecios que producen ascosporas haploides (Booth, 1971; Desjardins, 1992).

Ciclo biológico. El hongo inverna en los residuos de cosecha, en el suelo y como micelio en el tejido interno de la semilla de maíz (Lawrence *et al.*, 1981; Burgess y Liddell, 1983; Headrick y Pataky, 1989; Holliday, 1989). Los peritecios se forman a principios de otoño y liberan las ascosporas que son diseminadas e inician la infección primaria. En los períodos de clima húmedo y cálido, sobre las lesiones de las plantas afectadas se forman abundantes macro y microconidios que son transportados por el viento y actúan como inóculo secundario (Walker, 1975).

Conservación en el laboratorio.

Aunque existen diversas técnicas para mantener viables en el laboratorio a los aislamientos de *F. moniliforme*; Windels *et al.* (1988) han demostrado que la técnica de sílica gel en tubos de ensayo, tiene las ventajas de ser sencilla, barata, efectiva y el hongo guardado en un mismo tubo se puede utilizar las veces necesarias, en comparación con otras técnicas de características similares como el PDA en tubos de ensayo, que tiene el inconveniente de ser un sustrato rico en carbohidratos, que propicia el crecimiento, la esporulación y puede inducir mutaciones que afectan la morfología, virulencia y otras propiedades del hongo (Nelson *et al.*, 1983), y puede conducir a fallas en pruebas de patogenicidad en campo e invernadero; tal como sucedió en el trabajo realizado por Félix y Romero (1981), quienes no pudieron provocar síntomas de **Germinación prematura** en elotes inoculados, en campo e invernadero, con aislamientos de *F. moniliforme* cultivados y mantenidos en PDA en tubos de ensayo; es probable que ellos utilizaran un aislamiento poco virulento; pues en estudios posteriores, Galindo y Romero (1982) y Galindo (1983) lograron reproducir los síntomas de esta enfermedad, en elotes inoculados con una cepa de este hongo que había sido preservada mediante esta misma técnica. Años más tarde, Navarrete (1986) observó que esta cepa era menos agresiva que otras para inducir síntomas de pudrición y germinación prematura en elotes inoculados en el laboratorio y en el campo; quizás el hongo perdió virulencia después de mantenerlo 2 años en PDA cubierto con aceite mineral en tubos de ensayo.

El gel de sílice induce una disminución en el metabolismo del hongo (hipobiosis) por la pérdida de agua (Sleesman y Leben, 1978), que ocurre cuando los conidios suspendidos en leche se transfieren a las partículas de gel de sílice, que absorben rápidamente el agua de la suspensión y mantiene adsorbidas las esporas y la leche descremada sólida; bajo estas condiciones, el hongo permanece latente, no coloniza el sustrato y está en condiciones poco propicias de sufrir mutaciones que alteren su patogenicidad (Windels *et al.*, 1988).

Micotoxicidad. *F. moniliforme* se encuentra con frecuencia contaminando alimentos básicos de animales y humanos, tales como el maíz y otros cereales. Produce compuestos orgánicos que son tóxicos para mamíferos y aves (De León, 1984; Nelson *et al.*, 1983; Marasas *et al.*, 1984; Carvajal, 1987; Bárcenas, 1988).

Desde su descripción original en 1904, se han reportado \pm 32 razas toxígenas (Marasas *et al.*, 1984), capaces de provocar efectos patológicos a diversos animales (Apéndice 2).

Control. El control del hongo y de sus micotoxicosis depende de la prevención de la infección y del desarrollo del patógeno en el campo y almacén. Es importante determinar los factores involucrados en la patogenicidad del hongo y en la resistencia del hospedante (Desjardins, 1992), con el propósito de establecer las prácticas más apropiadas de control cultural, químico y genético de la enfermedad (Bauer, 1984).

2.2 Enfermedad "Germinación prematura del maíz"

Antecedentes. Desde la primera mitad de este siglo, se han señalado como agentes causales de esta enfermedad a factores: genéticos (Mangelsdorf, 1930; Robertson, 1955), ambientales (Routchenko y Soyer, 1971), fisiológicos (Smith *et al.*, 1978; Fong *et al.*, 1983) y fitopatógenos (Calvert *et al.*, 1969; Galindo y Romero, 1982; Galindo, 1983).

En México se observó desde mediados de la década de los 70's en la región maicera en las faldas del volcán La Malinche (Ortega y Vega, 1983; Ortiz-Cereceres, 1983). A partir de 1980 se investigó sobre la incidencia, evaluación de daños, métodos de control y etiología de la enfermedad.

En 1983, se encontraron evidencias experimentales de que *F. moniliforme* es el agente causal de la enfermedad, al reproducirse los síntomas en el laboratorio, invernadero y campo, mediante la inoculación de conidios del hongo en elotes tiernos en estado lechoso-masoso (Galindo y Romero, 1982; Galindo, 1983; Navarrete, 1986; Carvajal, 1987); aunque no siempre se lograron reproducir satisfactoriamente los síntomas de esta enfermedad (Félix y Romero, 1981; Navarrete, 1986).

Distribución e importancia. Esta enfermedad se ha reportado en Estados Unidos, Francia, Venezuela y México (Galindo, 1983). En este último país, ha sido importante en regiones maiceras de clima templado, localizadas en los Valles Altos de Puebla, Tlaxcala y Estado de México, donde bajo condiciones de clima favorable y siembra de variedades susceptibles, ha provocado decrementos entre el 25 y el 35% del rendimiento de grano (Galindo, 1983; Ortiz-Cereceres, 1983; Márquez, 1985).

Sintomatología. El síntoma característico es la germinación de granos inmaduros (tiernos) en estado lechoso-masoso (Figura 4) o en madurez fisiológica, adheridos a las mazorcas cubiertas por brácteas, sobre las plantas cultivadas en el campo (Galindo y Romero, 1982; Ortega y Vega, 1983).

Algunos granos afectados exhiben el embrión de color verde claro cubierto por el epicarpio; mientras que otros, originan plántulas verdes vigorosas, que en ocasiones emergen a través de las brácteas que cubren a la mazorca enferma (Galindo y Romero, 1982; Márquez, 1985; Navarrete, 1986).

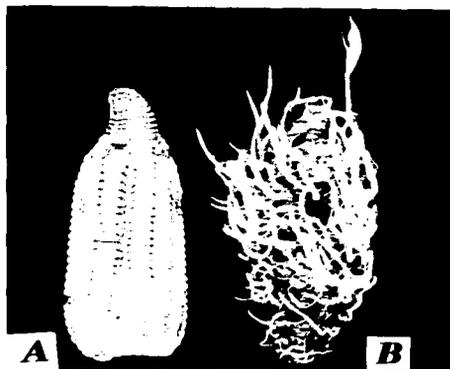


Figura 4. Síntomas de la enfermedad "Germinación prematura". Elotes testigo (A) e inoculado (B) (Fotografía: Magda Carvajal)

Epifitología. El desarrollo de la enfermedad se favorece por un desequilibrio micronutricional (hierro, manganeso y zinc) en la planta; fechas de siembras tempranas; niveles altos de humedad en el suelo, temperatura de 6-28 °C, humedad relativa alta (> de 75 %) y precipitación abundante (> de 30 mm diarios (Sánchez *et al.*, 1983; Navarrete, 1986).

Control. La aplicación de altas dosis de fertilizante fosforado, la siembra de variedades resistentes en la época recomendada y la destrucción de los residuos de cosecha, son prácticas de cultivo que ayudan a disminuir la incidencia de la **Germinación prematura** (Lugo y Cajuste, 1983; Sánchez *et al.*, 1983). La semilla para siembra se puede desinfectar con fungicidas como benomyl, bayleton y zineb (Navarrete, 1986). Se puede aplicar termoterapia para eliminar al hongo de la semilla (Daniels, 1983).

2.3 Enfermedad "Putrefacción de la mazorca"

Distribución e importancia. Es la enfermedad más común de la mazorca en todo el mundo, en climas cálidos-húmedos y secos (De León, 1984 y Shurtleff, 1977). Se ha reportado principalmente en Nigeria y Sudáfrica; Argentina, Bolivia, Brasil, Chile, Colombia, Costa Rica, Guatemala, México, Nicaragua y Perú (América); Tailandia e India

(Asia), donde se han registrado daños ligeros, moderados y severos de la enfermedad (Ortega y De León, 1971). En el territorio mexicano se ha reportado en el Estado de México, El Bajío, Jalisco, Michoacán, Puebla, Tamaulipas, Tlaxcala y Veracruz (Cepeda y Orozco, 1989; Cepeda y Venegas, 1991; Cepeda *et al.*, 1994; González *et al.*, 1987; Ortíz-Cereceres, 1983; Navarrete, 1986).

Sintomatología. El hongo puede atacar desde la siembra hasta la cosecha (Cepeda y Venegas, 1991); causa marchitez de plántulas y pudriciones de la raíz, tallo y mazorca (Agrios, 1985; Flores y Delgado, 1991; Shurtleff, 1977). La pudrición de la mazorca y el grano, son los daños más importantes, porque disminuyen el rendimiento (Cepeda, 1991; Cepeda y Venegas, 1991; González, *et al.*, 1987; Luo, 1988).

Los granos pueden ser invadidos en cualquier etapa de desarrollo. El hongo penetra a través del epicarpio del fruto, o por las heridas ocasionadas por pájaros e insectos, los cuales pueden transportar, introducir o facilitar la entrada del hongo en el grano dañado, y así favorecen la **Pudrición de la mazorca** (Smeltzer, 1959; Christensen y Wilcoxson, 1966; Shurtleff, 1977; Nyvall, 1979; Holliday, 1980; Sutton, 1982; De León, 1984; Wicklow, 1988; Drepper y Renfro, 1990).

Los granos afectados presentan síntomas de pudrición, rayas, ruptura, manchas oscuras del epicarpio, muerte del embrión, arrugamiento, y germinación prematura (Agrios, 1985 y González *et al.*, 1987).

El epicarpio puede estar opaco y arrugado, o bien, carecer de síntomas, y la detección del hongo sólo es posible al inducir la germinación de los granos en agar (Walker, 1975).

Los síntomas de pudrición de la mazorca están frecuentemente asociados con la pudrición del tallo, ya que el hongo crece rápidamente de un órgano a otro (Walker, 1975; Miller & Pollard, 1976). En los granos colonizados se desarrolla un crecimiento algodonoso de color rosado (Figura 5).

En postcosecha el hongo invade y contamina severamente al grano que se almacena bajo condiciones de humedad relativa alta y temperatura favorable (Agrios, 1985).



Figura 5. Síntomas de la enfermedad "Pudrición de la mazorca"

Epifitología. La enfermedad causa daños más severos cuando se presentan lluvias fuertes y permanentes, desde la etapa de espigamiento hasta la cosecha; su incidencia se incrementa en las mazorcas que no están bien cubiertas por las brácteas, que están en contacto con el suelo y que sufren daños por insectos y pájaros (Shurtleff, 1977; Sutton, *et al.*, 1980; Heo, *et al.*, 1981; Luo, 1988). En clima seco y cálido puede causar severas pudriciones de tallo de las plantas próximas a la floración (De León, 1984).

Control. La eliminación de los residuos vegetales coadyuva a disminuir a un mínimo el inóculo de primavera. Además, se debe proteger con fungicida la semilla y sembrar variedades resistentes (Walker, 1975). Cuando el patógeno se disemina a través de la semilla, es muy difícil eliminarlo con tratamientos físicos o químicos (Daniels, 1983).

En México se ha observado que el maíz afectado por *F. moniliforme* es rechazado por cerdos, vacas, gansos y pollos, lo que ocasiona pérdidas económicas al productor (Navarrete, 1986; Carvajal, 1994).

2.4 Micotoxinas de *F. moniliforme*

Antecedentes. Las micotoxinas son metabolitos secundarios tóxicos producidos por diversas especies de hongos toxígenos, en medios de cultivo y substratos naturales como granos, forrajes y diversos productos alimenticios, que cuando son ingeridos por los animales o el hombre, pueden provocar enfermedad y la muerte (Cullen y Caldwell, 1983; Hsieh, 1988). Las fusariotoxinas son toxinas producidas por especies del género *Fusarium*.

En Italia, Saccardo (1881) aisló a *F. moniliforme* de granos de maíz contaminados y lo nombró *Oospora verticillioides* Sacc. Al hongo se le involucró en la enfermedad denominada **Pelagra**, producida por el consumo del maíz contaminado en Italia y Rusia. En esta época, en Estados Unidos se presentó una epizootia severa, asociada con la ingestión de maíz contaminado con este hongo descrito como *F. moniliforme* por Sheldon en 1904 (Marasas *et al.*, 1984); por lo que se sospecha que este patógeno ha estado involucrado en enfermedades del hombre y animales, desde el siglo pasado.

Algunas fusariotoxinas como la zearalenona y los tricotecenos se han involucrado en diversas enfermedades del hombre tales como Aleucia Tóxica Alimentaria (ATA), enfermedad Urov, intoxicación por grano roñoso, cáncer del esófago, así como en numerosas enfermedades de animales caracterizadas por síndromes cancerígenos, teratógenos, mutágenos, hemorrágicos, estrogénicos y eméticos (Marasas *et al.*, 1984; Tanaka y Ueno, 1989; F.A.O., 1991).

a. **Zearalenona (ZEA) o toxina F-2.**

Esta toxina contamina al maíz, trigo, cebada, avena, sorgo, ajonjolí, alimento concentrado y piensos (Mirocha *et al.*, 1977; Shotwell, 1977). La producen las especies *Fusarium graminearum* Schw., *F. moniliforme* Sheld., *F. oxysporum* (Schlecht.) Sny. & Han., *F. sporotrichioides* Sherb. [= *F. tricinctum* (Cda.) Sacc. (Mirocha y Christensen, 1974; Mirocha *et al.*, 1977; Gimeno, 1983; O.P.S., 1983); así como por *F. avenaceum* (Fr.) Sacc., *F. chlamydosporum* Woll. & Rein., *F. culmorum* (Smi.) Sacc., *F. equiseti*

(Cda.) Sacc., *F. lateritium* (Nees) en. Sny. & Han., *F. nivale* (Fr.) Ces., *F. poae* (Peck.) Woll., *F. sambucinum* Fuck., *F. semitectum* Berk. & Rav. y *F. solani* (Mart.) Appel & Woll. (Marasas *et al.*, 1984).

De estas especies *F. graminearum* (= *F. roseum*) la produce en mayor cantidad (3 000 a 15 000 mg/kg); mientras *F. moniliforme* rara vez la llega a sintetizar y en cantidades pequeñas (de 1 a 19 mg/kg) (Mirocha *et al.*, 1977).

Propiedades físicas y químicas. Es una lactona del ácido fenólico resorcílico ($C_{18}H_{22}O_5$). Se clasifica como un nonacétido del grupo de policétidos. Es muy estable a la descomposición hidrolítica por su anillo de lactona (Figura 6). Es un compuesto cristalino blanco, con peso molecular de 318 y una temperatura de fusión de 164 a 165°C. Es soluble en éter, benceno, cloroformo, cloruro de metileno, acetato de etilo, alcoholes acetónitrilo y álcalis acuosos; pero es insoluble en agua, tetracloruro de carbono y bisulfuro de carbono.

Presenta sus picos máximos de absorción en alcohol etílico a 236 ($E = 29\ 700$), 274 ($E = 13\ 909$) y 316 nm ($E = 6\ 020$). Emite una fluorescencia azul-verde bajo UV de longitud de onda larga (360 nm) y una fluorescencia verde más intensa bajo luz UV de longitud de onda corta (260 nm). Requiere de baja temperatura (12-14°C) para que se produzca en cantidades elevadas (Mirocha y Christensen, 1974; Mirocha *et al.*, 1977; O.P.S., 1983).

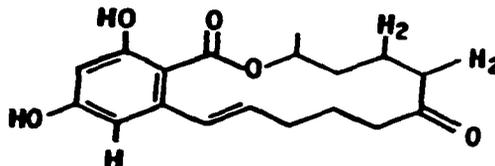


Figura 6. Estructura química de la zearalenona (Pier, 1981)

Efectos patológicos. Afecta a cerdos, bovinos, pollos y pavos. Causa efectos hemorrágicos, estrogénicos, eméticos y de rechazo al alimento (Marasas *et al.*, 1984).

El síndrome estrogénico es frecuente en cerdos (muy susceptibles). Se caracteriza por vulvas y glándulas mamarias edematosas y agrandadas, muerte de las crías, esterilidad y protrusiones rectal y vaginal, lo que a veces precede a la muerte. Los machos jóvenes sufren afeminamiento con orquitis y atrofia de los testículos y agrandamiento de las glándulas mamarias. Las camadas son escasas y los animales débiles y pequeños. La micotoxina se transmite a los lechones a través de la leche materna. Las dosis dañinas son de 1 mg/cerdo adulto por 8 días (Mirocha y Christensen, 1974; Shotwell, 1977; Aucokk *et al.*, 1980; Pier, 1981; Gimeno, 1983; O.P.S., 1983; Plattner y Bennett, 1983; Tong-Xia y Chi, 1988; Carvajal, 1994).

La micotoxina interfiere en el metabolismo de los aminoácidos libres, al promover la síntesis de proteínas uterinas en lugar de las necesarias para el desarrollo del animal; afecta el sistema hormonal, por sus propiedades estrogénicas compiten con las hormonas sexuales, en los receptores celulares del estradiol (Mirocha *et al.*, 1977; O.P.S., 1983).

En bovinos provoca la disminución de la fecundidad y la prolongación del celo. En pavas y gallinas reduce la producción de huevos. En ratas es teratógeno, causa deformación del esqueleto de fetos a dosis de 1 mg/kg de peso corporal (Mirocha *et al.*, 1977; O.P.S., 1983; Carvajal, 1994).

En hongos como *F. roseum*, la ZEA actúa como una hormona reguladora de la producción de peritecios; reduce el número de peritecios de *Cochliobolus carbonum* y *C. heterostrophus* a concentraciones de 50 a 200 µg (Mirocha y Christensen, 1974; Mirocha *et al.*, 1977). Provoca actividad emética en mandriles. En el hombre, la ingestión prolongada de alimentos contaminados puede ser un riesgo para la salud; aunque no existen informes específicos sobre los efectos adversos de esta toxina (O.P.S., 1983; Marasas *et al.*, 1984; Carvajal, 1994).

Biosíntesis. Es favorecida por bajas temperaturas (12-14 °C); aunque se pueden producir cantidades pequeñas a temperatura del laboratorio (22-27 °C). La contaminación de maíz se incrementa cuando se almacena a 6-18 °C y 23% o más de humedad. Puede ser inhibida por Vapona (dimetil-2-2-diclorovinil fosfato) sin que se afecte el crecimiento micelial del hongo (Mirocha *et al.*, 1977; Gimeno, 1983).

b. Tricotecenos.

Los producen hongos de los géneros: *Cephalosporium*, *Cylindrocarpon*, *Myrothecium*, *Stachybotrys*, *Trichothecium*, *Trichoderma*, *Verticimonosporium* y principalmente *Fusarium* (Mirocha y Christensen, 1974; Cole y Cox, 1981; Pier, 1981; Betina, 1989).

Propiedades químicas. Pertenecen al grupo de los sesquiterpenos altamente oxigenados; poseen la estructura tetracíclica 12,13-epoxi-tricotec-9-eno (Figura 7). Tienen una unión olefínica en las posiciones 9 y 10 y un grupo epoxi en las 12 y 13. Se diferencian entre sí, por los tipos de oxidaciones y esterificaciones en las posiciones 3, 4, 7, 8 y 15. Estas variaciones están directamente asociadas con el grado de toxicidad (Eppley, 1979; Pier, 1981; Betina, 1989). Se han identificado más de 90 tricotecenos que se han dividido en cuatro grupos. El primero de estos se caracteriza porque no contiene una función carbonil en el carbón 8 (C-8); incluye a la toxina T-2, toxina HT-2, monoacetoxiscirpenol, diacetoxiscirpenol, tricodermina y scirpentriol. El segundo grupo contiene esta función en el C-8, como la fusarenona-X, desoxinivalenol y tricotecina. Los grupos tercero y cuarto están formados por las roridinas y verrucarinas, respectivamente (Eppley, 1979; Cole y Cox, 1981; Beremand y McCormick, 1992).

Efectos patológicos. Afectan a plantas, animales, bacterias, virus, hongos, insectos y humanos. Son potentes inhibidores de la síntesis de proteína y ADN y causan inmunosupresión (Pier, 1981; Betina, 1989; Beremand y McCormick, 1992). En humanos y animales provocan náusea, vómito, diarrea, anorexia, ataxia, leucocitosis, leucopenia, inflamación del tracto gastrointestinal, degeneración del sistema nervioso central, hemorragia del músculo cardíaco, lesiones en el ganglio linfático, testículos y timo, daños severos en la piel, hígado y riñón, problemas reproductivos, pérdida de peso y muerte

(Cole y Cox, 1981; Betina, 1989). En la patogénesis de las plantas actúan como fitotoxinas no específicas de hospedantes; producen síntomas de clorosis, necrosis y otros, a concentraciones bajas. Se ha encontrado correlación entre la virulencia del hongo y su habilidad para producir estas toxinas *in vitro* (Snijders, 1988; Desjardins, 1992).

Biosíntesis. Los tricotecenos son biosintetizados a partir del farnesil pirofosfato vía el hidrocobón tricodieno (Desjardins, 1992). La producción en cultivo puro depende de la composición de nutrientes, temperatura, aereación, condiciones de fermentación, de la especie y raza del hongo; aunque no se sabe cómo estos factores regulan específicamente este proceso tanto *in vitro* como en las plantas infestadas por *Fusarium* (Desjardins, 1992). En granos de cereales y productos alimenticios contaminados por hongos, se han encontrado con más frecuencia el diacetoxiscirpenol, desoxinivalenol, nivalenol y toxinas T-2 y HT-2 (Eppley, 1979; Pier, 1981; O.P.S., 1983; Betina, 1989).

Toxina T-2

Es producida principalmente por *Fusarium poae* y *F. tricinctum*. Además por *F. avenaceum*, *F. acuminatum* Ell. y Kell., *F. chlamyosporum*, *F. culmorum*, *F. equiseti*, *F. graminearum*, *F. heterosporum* Woll., *F. lateritium*, *F. moniliforme*, *F. nivale*, *F. oxysporum*, *F. rigidiusculum* (Brick.) Sny. y Han., *F. sambucinum*, *F. scirpi* Lamb. y Fautr., *F. semitectum*, *F. solani*, *F. sporotrichioides* y *Trichoderma lignorum* (Cole y Cox, 1981; Pier, 1981; Marasas *et al.*, 1984; Betina, 1989; Carvajal, 1994;). Su peso molecular es 466 y su fórmula molecular es $C_{24}H_{34}O_9$. Su estructura química es similar a la del diacetoxiscirpenol (Figura 7) (Cole y Cox, 1981; Pier, 1981).

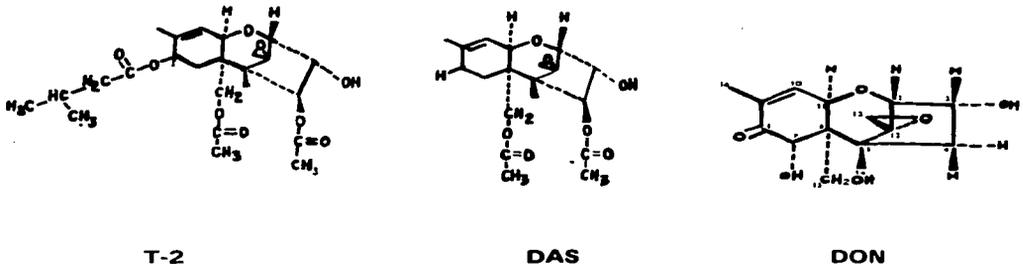


Figura 7. Estructura química de los tricotecenos: toxina T-2, diacetoxiscirpenol (DAS) y desoxinivalenol (DON) (Cole y Cox, 1981; Pier, 1981)

En el hombre la toxina T-2 provoca daños en la piel, hígado y riñón; hemorragias internas, vómitos, diarreas; pérdida de peso y muerte. Fue la responsable de la enfermedad Aleucia Tóxica Alimentaria, que causó estragos en los habitantes rusos (1931-1947) que consumieron alimentos contaminados con *F. sporotrichioides* (*F. tricinctum*) y *F. poae*. Los enfermos presentaban erosiones y ulceraciones en dedos, boca, esófago, estómago e intestino delgado; leucopenia, anemia, hemorragia y disminución del sistema inmunológico (Joffe, 1971; Mirocha y Christensen, 1974; Shank, 1978; Pier, 1981).

En bovinos lecheros provoca hemorragias en las vísceras internas, a dosis de 2 mg/kg de peso. En cerdos, hiperestrogenismo, vómitos y rechazo de alimento (Mirocha y Christensen, 1974). En gansos, necrosis de la mucosa del esófago, proventrículo y mollejas, a dosis de 25 mg/kg (O.P.S., 1983). En patos, vómito a dosis de 0.1 mg/kg. En gatos, vómito, diarrea, anorexia, ataxia de las patas traseras, lagrimeo y evacuación de fluido hemorrágico, a dosis de 0.1-0.2 mg/kg (Cole y Cox, 1981; Betina, 1989). En mandril, actividad emética. En ratas albinas, toxicidad dérmica. En ratones albinos, hiperestrogenismo. En pollos, lesiones orales. En pavos, pérdida de peso (Marasas *et al.*, 1984). Induce necrosis de labios o pico, cavidad oral, esófago y estómago en cerdos, bovinos, aves y gatos (Pier, 1981).

Diacetoxiscirpenol (DAS)

Es producido por los hongos *F. acuminatum*, *F. avenaceum*, *F. culmorum*, *F. equiseti*, *F. graminearum*, *F. lateritium*, *F. moniliforme*, *F. oxysporum*, *F. poae*, *F. sambucinum*, *F. scirpi*, *F. semitectum*, *F. solani*, y *F. sporotrichioides* (Betina, 1989; Cole y Cox, 1981; Marasas *et al.*, 1984; Pier, 1981). Su peso molecular es de 366, su fórmula molecular es $C_{19}H_{26}O_7$ (Cole y Cox, 1981). Su estructura química es similar a la toxina T-2 (Figura 7). Su biosíntesis es favorecida a temperaturas de 6-18°C (Pier, 1981).

Es inhibidor de la síntesis de proteínas; induce necrosis de la piel y las membranas mucosas en diversos animales. Provoca actividad emética en mandril; toxicidad dérmica en ratas albinas, conejo, ratón y cerdo de Guinea; hiperestrogenismo en ratones albinos y rechazo de alimentos en cerdos. En porcinos, bovinos, aves y ratas ocasiona gastroenteritis, pérdida de peso y menor producción de huevos. Es muy fitotóxico (Cole y Cox, 1981; Pier, 1981; Marasas *et al.*, 1984).

Desoxinivalenol (DON) o vomitoxina

Es producido principalmente por *Fusarium graminearum*, así como por *F. acuminatum*, *F. avenaceum*, *F. culmorum*, *F. equiseti*, *F. nivale*, *F. poae* y *F. sporotrichioides* (O.P.S., 1983; Marasas *et al.*, 1984; Carvajal, 1994;). No se han identificado cepas de *F. moniliforme* productoras de esta micotoxina (Marasas *et al.*, 1984). Su peso molecular es 296, su fórmula molecular es $C_{15}H_{20}O_6$ (Cole y Cox, 1981).

Su estructura química se presenta en la Figura 7. Se encuentra con más frecuencia en maíz, trigo, cebada y avena, antes de la cosecha y en el almacén, en las regiones productoras del centro de Estados Unidos y Canadá. En humanos ocasiona anorexia, náusea, vómitos, cefalea, dolor abdominal, diarrea, escalofrío y convulsiones, que pueden

ser los efectos de la interacción de la vomitoxina con el nivalenol, la T-2 y el DAS (Pier, 1981; Carvajal, 1994). Es citotóxico para fetos de rata. Disminuye el tamaño de los lechones. Provoca emesis en cerdos, perros, gatos y patos (Pier, 1981).

2.5 Técnicas para el análisis de micotoxinas

La zearalenona y los tricotecenos presentes en maíz, se pueden extraer, identificar y cuantificar mediante técnicas especiales de cromatografías en capa fina, de líquidos y de gases; espectroscopía infrarroja, espectrometría de masas y otras (Conley, 1979; Scudamore *et al.*, 1988).

En la presente investigación se utilizaron las técnicas de Thomas *et al.* (1975) y de Romer (1986) para la extracción respectiva de ZEA y de tricotecenos (toxina T-2, DAS, DON) de maíz, porque en el laboratorio de Micotoxinas del Instituto de Biología-UNAM, se dispone de la metodología, el material y el equipo necesarios; ambas se describen en forma general, a continuación.

a. Técnica de Thomas *et al.* (1975)

Es específica para extraer y cuantificar aflatoxinas y zearalenona; tiene las ventajas de su alta sensibilidad, es rápida pues una muestra se procesa entre 65 y 70 minutos, es de menor costo y es de riesgo moderado (Campos, 1987; Pereda, 1987). Requiere la aplicación de una mezcla de metanol-agua (6:4 v/v) para disolver la toxina, cloroformo para eliminar grasas, carbonato cúprico para quitar pigmentos y sulfato de sodio anhidro para extraer moléculas de agua de la muestra.

b. Técnica de Romer (1986)

Se desarrolló para extraer específicamente tricotecenos; recupera del 90 al 99% del compuesto; puede detectar concentraciones de $\mu\text{g}/\text{kg}$ (ppb) de fusarenona X, nivalenol, toxina T-2, neosolaniol, toxina HT-2, DON y DAS (Bárceñas, 1988); las cuales se extraen del tejido vegetal aplicando una mezcla de solventes a base de acetato de etilo, metanol-agua, acetonitrilo-metanol. La mezcla metanol-agua se aplica con frecuencia en la extracción, purificación y detección-cuantificación de los tricotecenos producidos por *Fusarium* spp. en granos y productos alimenticios. El extracto de la muestra se purifica al pasarlo a presión por una columna empaquetada con capas sucesivas de fibra de vidrio + papel filtro + alúmina + carbón activado + celite. El extracto se purifica mediante separación líquido-líquido, seguida por la aplicación de columnas de gel de sílice y cromatografía de placa fina (Eppley, 1979).

c. Cromatografía en capa fina (TLC)

Permite separar e identificar los componentes de una mezcla. En ella interactúan tres elementos principales: 1) *La fase estacionaria* (placa con gel de sílice), 2) *La mezcla de los componentes a separar* (muestra y estándar) y 3) *La fase móvil* (desarrollador de micotoxina). En este proceso los componentes de la muestra son separados por la acción de fuerzas físicas y químicas. En la cromatografía sólido/líquido existen la fase estacionaria normal (polar) y la reversa (no polar). Es rápida, sencilla, versátil y reproducible. Requiere volúmenes muy pequeños de muestra.

Se fundamenta en que los componentes de una muestra se distribuyen diferencialmente en las fases fija (estacionaria) y móvil, que están formadas por gel de sílice y el sistema de desarrollo de micotoxinas, respectivamente. La fase móvil transporta los compuestos que se van a separar y se desplaza a través de los espacios de la primera fase (Peckok y Shields, 1983; Campos, 1987; Pereda, 1987; Bárcenas, 1988; Paterson y Bridge, 1994).

En este tipo de cromatografía se utilizan placas de aluminio o de vidrio recubiertas con gel de sílice, con gran capacidad de adsorción, cuyas partículas miden de 1 a 5 μ . En la parte inferior de la placa se deposita una pequeña muestra de la sustancia que se va a analizar; el borde inferior se sumerge en el sistema de desarrollo de micotoxinas dentro de una cámara de vidrio cerrada. El disolvente asciende por capilaridad y arrastra los componentes de la muestra (Masterton y Slowinski, 1979). El compuesto más soluble presenta un mayor desplazamiento y el menos soluble, que se adsorbe con más fuerza, recorre una distancia menor. Cuando el disolvente alcanza la parte superior de la placa, se marca su límite, se saca de la cámara, se deja secar, se marca la ubicación de los compuestos separados, que se hacen evidentes mediante algún proceso de revelado (Pereda, 1987).

d. Cromatografía de líquidos (HPLC)

La cromatografía se utiliza con frecuencia para separar y la espectroscopía UV para identificar metabolitos fungosos secundarios. Se pueden cuantificar los metabolitos removidos de las placas de TLC o directamente por HPLC analítica.

En este tipo de cromatografía, la separación de los compuestos también se efectúa mediante interacciones entre la muestra y la fase estacionaria, la cual está empaquetada en una columna delgada. La fase móvil es un líquido. La *cromatografía de adsorción* se realiza cuando la fase estacionaria es un material adsorbente y la separación se basa en repetidas etapas de adsorción-desorción. Se denomina *cromatografía en fase inversa* cuando el lecho estacionario es de naturaleza apolar (hidrocarburo) y la fase móvil es un líquido polar (agua o alcohol); cuanto más apolar sea la muestra, su retención será mayor. En el proceso de separación se puede aplicar el *método de operación isocrática*, que permite utilizar sólo una sustancia como fase móvil, cuya composición permanece constante durante el análisis de una muestra (Yost *et al.*, 1980).

La HPLC permite realizar análisis rápidos y reproducibles de mezclas complejas. Las partículas que forman la fase estacionaria tienen un diámetro muy pequeño (5-15 μ m), lo que permite que se utilicen columnas (de 25-50 cm x 2-5 mm) con gran capacidad de resolución, que hacen posible el incremento de la velocidad de flujo del eluyente (1-2 mL/min). La presión de entrada y el flujo de la fase móvil a través de la columna son reguladas en forma muy controlada por una bomba. Se pueden utilizar volúmenes de muestra muy pequeños (5 μ l), que se introducen a la fase móvil inyectándolos con una microjeringa de 5 a 50 μ l de capacidad, a través de una válvula (septum). Los componentes (solutos) de la muestra se monitorean mediante algunas de sus propiedades físicas o químicas (fluorescencia, absorbancia, etc.), después de el solvente pasa por el sistema de detección (detector de fluorescencia o espectrofotómetro) conectado después de la columna (Yost, *et al.*, 1980; Paterson y Bridge, 1994).

Se fundamenta en que los componentes de una muestra se distribuyen diferencialmente en las fases fija (estacionaria) y móvil, que están formadas por gel de sílice y el sistema de desarrollo de micotoxinas, respectivamente. La fase móvil transporta los compuestos que se van a separar y se desplaza a través de los espacios de la primera fase (Peckok y Shields, 1983; Campos, 1987; Pereda, 1987; Bárcenas, 1988; Paterson y Bridge, 1994).

En este tipo de cromatografía se utilizan placas de aluminio o de vidrio recubiertas con gel de sílice, con gran capacidad de adsorción, cuyas partículas miden de 1 a 5 μ . En la parte inferior de la placa se deposita una pequeña muestra de la sustancia que se va a analizar; el borde inferior se sumerge en el sistema de desarrollo de micotoxinas dentro de una cámara de vidrio cerrada. El disolvente asciende por capilaridad y arrastra los componentes de la muestra (Masterton y Slowinski, 1979). El compuesto más soluble presenta un mayor desplazamiento y el menos soluble, que se adsorbe con más fuerza, recorre una distancia menor. Cuando el disolvente alcanza la parte superior de la placa, se marca su límite, se saca de la cámara, se deja secar, se marca la ubicación de los compuestos separados, que se hacen evidentes mediante algún proceso de revelado (Pereda, 1987).

d. Cromatografía de líquidos (HPLC)

La cromatografía se utiliza con frecuencia para separar y la espectroscopía UV para identificar metabolitos fungosos secundarios. Se pueden cuantificar los metabolitos removidos de las placas de TLC o directamente por HPLC analítica.

En este tipo de cromatografía, la separación de los compuestos también se efectúa mediante interacciones entre la muestra y la fase estacionaria, la cual está empaquetada en una columna delgada. La fase móvil es un líquido. La *cromatografía de adsorción* se realiza cuando la fase estacionaria es un material adsorbente y la separación se basa en repetidas etapas de adsorción-desorción. Se denomina *cromatografía en fase inversa* cuando el lecho estacionario es de naturaleza apolar (hidrocarburo) y la fase móvil es un líquido polar (agua o alcohol); cuanto más apolar sea la muestra, su retención será mayor. En el proceso de separación se puede aplicar el *método de operación isocrática*, que permite utilizar sólo una sustancia como fase móvil, cuya composición permanece constante durante el análisis de una muestra (Yost *et al.*, 1980).

La HPLC permite realizar análisis rápidos y reproducibles de mezclas complejas. Las partículas que forman la fase estacionaria tienen un diámetro muy pequeño (5-15 μ m), lo que permite que se utilicen columnas (de 25-50 cm x 2-5 mm) con gran capacidad de resolución, que hacen posible el incremento de la velocidad de flujo del eluyente (1-2 mL/min). La presión de entrada y el flujo de la fase móvil a través de la columna son reguladas en forma muy controlada por una bomba. Se pueden utilizar volúmenes de muestra muy pequeños (5 μ l), que se introducen a la fase móvil inyectándolos con una microjeringa de 5 a 50 μ l de capacidad, a través de una válvula (septum). Los componentes (solutos) de la muestra se monitorean mediante algunas de sus propiedades físicas o químicas (fluorescencia, absorbancia, etc.), después que el solvente pasa por el sistema de detección (detector de fluorescencia o espectrofotómetro) conectado después de la columna (Yost, *et al.*, 1980; Paterson y Bridge, 1994).

III. OBJETIVOS

La importancia fitopatológica y toxígena de *Fusarium moniliforme* Sheld. y el lugar preponderante que ocupa el maíz en la alimentación de los mexicanos, motivaron el desarrollo de la presente investigación con los siguientes:

3.1 Objetivo general

- a. Evaluar los efectos patológicos y la capacidad de producción de micotoxinas, de aislamientos monospóricos del hongo *F. moniliforme* inoculados en genotipos de maíz cultivados en campo.

3.2 Objetivos específicos

- a. Observar la pigmentación y las características morfológicas de 94 aislamientos monospóricos del hongo en tres medios de cultivo.
- b. Evaluar la eficiencia del gel de sílice para preservar viables y virulentos a los aislamientos del hongo.
- c. Estudiar la histopatología de granos de maíz con germinación prematura.
- d. Evaluar la patogenicidad de 94 aislamientos monospóricos en dos genotipos de maíz cultivados en campo.
- e. Conocer la respuesta de 18 genotipos de maíz a la colonización y producción de micotoxinas de los cuatro aislamientos más virulentos.
- f. Aislar e identificar las fusariotoxinas producidas por los aislamientos fúngicos que fueron más agresivos al maíz, en dos ciclos de cultivo.
- g. Establecer la correlación entre la patogenicidad de los aislamientos monospóricos y la producción de las fusariotoxinas.
- h. Determinar el grado de asociación entre las enfermedades **Pudrición de la mazorca** y **Germinación prematura** provocadas por esta especie de *Fusarium*.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

De acuerdo con los objetivos propuestos, la investigación se desarrolló en tres etapas sucesivas, que comprendieron aspectos relacionados con la biología, fitopatología y micotoxinas del hongo.

4.1. Biología de *Fusarium moniliforme* Sheld

Esta parte de la investigación comprende la obtención, morfología, identificación y preservación de los aislamientos monospóricos del hongo; así como la histopatología de granos de maíz con germinación prematura. Se utilizaron los materiales y procedimientos que se describen a continuación.

a. Aislamientos monospóricos de *F. moniliforme*

Se realizaron muestreos en una parcela cultivada con un genotipo criollo en Cocula, Gro.; donde se observó el 34% de mazorcas con pudrición apical. Se recolectaron muestras, se trasladaron al Laboratorio de Micotoxinas del Departamento de Botánica del Instituto de Biología de la UNAM (IB-UNAM), y se mantuvieron a 5°C.

En San Jerónimo Ocotitlán, Puebla, se localizó un cultivo de maíz criollo con 20% de mazorcas afectadas con síntomas de germinación prematura. Se tomaron muestras del material y se trasladaron al mismo laboratorio.

Método de obtención. Los cultivos monospóricos se obtuvieron mediante la técnica propuesta por Tuite (1969) y Booth (1971). Así, en el laboratorio se seleccionaron semillas con germinación prematura o pudrición, se desinfectaron con hipoclorito de sodio (1.5%) por 3 minutos, se lavaron con agua destilada esterilizada, se secaron y se sembraron en agua-agar (1:5%), que reduce la contaminación por bacterias (Nelson *et al.*, 1983). Los cultivos se incubaron a 26°C por una semana.

A partir de las colonias desarrolladas en agar, se preparó una suspensión de conidios en agua destilada, sobre un portaobjetos excavado; se tomó una muestra y con una asa se estrió en la superficie de agua-agar (1.5%); se incubaron los cultivos a 26°C por 24 horas. Se localizaron conidios individuales germinados, se cortó el trocito de agar con un conidio y se transfirió a una caja de Petri con medio de cultivo hojas de clavel-agar (1.5%), que favorece la esporulación abundante de esta especie de hongo (Nelson *et al.*, 1983). Los cultivos se incubaron a 26°C.

En el Laboratorio de Fitopatología del Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT) con sede en El Batán, Estado de México, se aplicó esta misma técnica para obtener 34 aislamientos monospóricos, a partir de cepas patógenas de *F. moniliforme* preservadas temporalmente en papel filtro esterilizado, a 5°C. Al final, a cada aislamiento monospórico se le asignó una letra y un número para indicar su origen (C = CIMMYT, G = Guerrero y P = Puebla).

Identificación. Se observaron las principales características taxonómicas del hongo, por medio de técnicas de microscopía óptica y microscopía electrónica de barrido, las cuales se describen a continuación.

Microscopía óptica. Se identificaron los aislamientos monospóricos a nivel de especie, siguiendo el código de colores propuesto por Nelson *et al.* (1983), que considera la pigmentación producida por la colonia fungosa en papa-dextrosa-agar (PDA), como un criterio taxonómico preliminar. Por ello, se transfirieron los 94 aislamientos a tubos de ensayo con PDA, se incubaron 14 días a temperatura ambiente en el laboratorio ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) y se registró la coloración de la colonia de cada uno de ellos.

Los aislamientos se cultivaron en cloruro de potasio-agar (6 g de KCl y 15 g de agar en 1 litro de agua destilada) para observar la formación de cadenas de microconidios típicas de *F. moniliforme*. Asimismo, en el medio de cultivo hojas de clavel-agar -HCA- (1.5 %) donde, de acuerdo con Nelson *et al.* (1983), este hongo produce abundantes esporodoquios y macro y microconidios de forma homogénea y estable.

Se realizó un microcultivo de cada aislamiento en cajas de Petri con HCA; se depositó en la superficie del medio, un trocito de agar de $\pm 1 \text{ cm}^3$, se inoculó con el hongo, se le colocó un cubreobjetos esterilizado, se incubó 10 días a temperatura ambiente en el laboratorio, se desprendió del trocito el cubreobjetos y se hizo una preparación con lactofenol teñido con fuccina ácida.

Se observaron las características taxonómicas del hongo, tales como microconidios en cadena o falsas cabezuelas, forma de macroconidios y de conidióforos y ausencia de clamidosporas, que son las más importantes para la identificación de esta especie de *Fusarium* (Burgess y Liddell, 1983; Nelson *et al.*, 1983). Se tomaron fotografías de estas estructuras fungosas, en un microscopio compuesto (Zeiss. Axioskop, West Germany) provisto de una cámara (Contax, Japan) con película Velvia (Fujichrome, ASA 50).

Microscopía electrónica de barrido. Se realizó para observar con más detalle la morfología de conidióforos, esporodoquios y macroconidios del hongo, en el Instituto de Fitosanidad del Colegio de Postgraduados, con sede en Montecillo, Edo. de México. El procedimiento fue el siguiente:

Se transfirió el aislamiento C-591 al medio de cultivo HCA (1.5%), se incubó por una semana a temperatura ambiente ($22 \pm 1^\circ\text{C}$), se seleccionaron trocitos de hojas de clavel colonizadas, se fijaron por una hora en glutaraldehído al 6.5% en solución amortiguadora de fosfatos (0.2 M pH 7.1), se lavaron con amortiguador de fosfatos, 3 veces por períodos de 15 minutos a 4°C .

El material se post-fijó en tetraóxido de osmio (Os O_4) por una hora a 4°C , se lavó con cacodilato, 3 veces por períodos de 15 minutos a 4°C ; se deshidrató en alcohol etílico al 50, 70, 90 y 100 %, durante 15 minutos por solución; se lavó 3 veces con alcohol absoluto; se colocó en una secadora de punto crítico (marca Samdri-780 A. Tousimis, USA), se recubrió con oro en un ionizador (marca Jeol. Fine Coation Sputter JFC-1100) y se observó en microscopio de barrido (marca Jeol modelo JSM-35 C).

Conservación de los aislamientos monospóricos. Se realizó aplicando la técnica de Windels *et al.* (1988), con algunas modificaciones que se describen a continuación.

Se utilizaron tubos de ensayo de 13 x 100 mm con tapa atornillable, a cada uno se le agregaron 3 cc de gel de sílice (Baker, 60 a 200 mallas), se esterilizaron a 180°C por 1.5 horas, se enfriaron y se guardaron a 5°C . En otros tubos similares, se depositó

1 mL de leche descremada (Svelty Nestlé), se esterilizaron a 120°C por 15 minutos, se enfriaron, cada tubo se inoculó con un aislamiento previamente cultivado en HCA (1.5%), se agitó en un vórtex (Vortex-Genie. Modelo K550G), se formó una suspensión de conidios, se tomaron 600 μ L, con una micropipeta Eppendorf, y se depositaron dentro del tubo de ensayo con gel de sílice, colocado en agua con hielo; se mezcló el gel de sílice, con una espátula delgada, se tapó el tubo y se mantuvo una semana a temperatura ambiente en el laboratorio ($22 \pm 1^\circ\text{C}$); se depositaron partículas de gel de sílice, en medio de cultivo papa-sucrosa-agar, se incubó una semana y se registró la viabilidad de los aislamientos fungosos. Finalmente se selló el tubo con parafilm y se guardó a 5°C. Así se preservaron los 94 aislamientos monospóricos del hongo, antes de utilizarlos en los experimentos de campo de 1994 y 1995.

b. **Histopatología de granos de maíz**

Se realizó en el laboratorio de Histopatología del Instituto de Fitosanidad del Colegio de Postgraduados, siguiendo la técnica de Ureña (1986), que se describe enseguida:

Se seleccionaron granos de maíz con **Germinación prematura**, recolectados en San Jerónimo Ocotitlán, Puebla, se lavaron, se trataron con hipoclorito de sodio (1.5%) por 3 minutos, se enjuagaron en H₂O destilada, se colocaron en un frasco Gerber, se cubrieron con H₂O destilada esterilizada y se incubaron a 18°C por 72 horas.

Se cortaron a la mitad 10 granos hidratados, se fijaron por 24 h en CRAF III compuesto por partes proporcionales de las soluciones A (60 mL de ácido crómico-trióxido de cromo 10%-, 40 mL de ácido acético y 900 mL de agua destilada) y B (228 ml de formaldehído y 772 ml de agua destilada), y se lavaron con agua por 20 minutos.

El material se pasó por soluciones de 50, 70, 96 y 100% de alcohol etílico, de xileno-metanol (1:1 v/v) y de xileno, por períodos de 2 h en cada una. Finalmente, se incluyeron en parafina pura licuada (Paraplast a 50°C) por 48 h. Este proceso se realizó en un procesador automático (Tissue Processor marca Tissue-Tek II).

Se depositó la mitad de un grano en un cajita de papel ($\pm 2 \text{ cm}^3$), se incluyeron en parafina licuada, se dejó solidificar (24 h), se quitó el papel, se fijó la muestra a un bloque de madera (3 x 3 x 1 cm).

Se realizaron cortes de 8 micras en un microtomo rotatorio (820 Spencer American Optical), se colocaron en portaobjetos con adhesivo de Haupt (1 g de gelatina, 2 g de fenol, 13 mL de glicerina y 100 mL de agua destilada); se pusieron 3 gotas de formaldehído (3.5%), se colocaron en una parrilla metálica (Lipshau modelo 374) a $\pm 30^\circ\text{C}$ por 20 minutos y se eliminó el exceso de parafina.

Se colocaron los portaobjetos dentro de una estufa a 50°C por 15 minutos, se desparafinaron en xilol (3 cambios), se pasaron por soluciones de 100, 96, 70 y 50% de alcohol etílico (3 minutos en cada una), se dejaron en safranina por 12 h, se pasaron por soluciones de 50, 70, 96% de alcohol etílico (3 minutos). Se tiñieron con verde rápido, se pasaron por alcohol al 96% y xilol (3 cambios), se montaron en bálsamo de Canadá, se colocaron en la estufa a $\pm 50^\circ\text{C}$ por 24 h, se limpiaron con xilol y se observaron al microscopio compuesto.

4.2 Fitopatología de la interacción *F. moniliforme* - maíz

Se realizaron dos experimentos de campo durante los ciclos agrícolas de primavera-verano (temporal) 1994 y 1995, en el Campo Agrícola Experimental El Batán de CIMMYT, en Metepec, Edo. de México. Se realizó la investigación en condiciones de campo tomando en cuenta que *Fusarium* es un hongo de campo, porque causa los daños más severos durante el desarrollo del grano y antes de la cosecha del maíz.

4.2.1 Experimento de campo 1994

Se realizó en el período mayo-noviembre de 1994, con el propósito de evaluar la patogenicidad de 94 aislamientos y de esta manera se seleccionaron los más virulentos para determinar su capacidad de producción de las micotoxinas ZEA, T-2, DAS y DON, en 2 genotipos de maíz. Para ello, se utilizaron los materiales y la metodología siguientes:

a. Tratamientos

Se estudiaron 94 aislamientos monospóricos del hongo (34 del Laboratorio de Fitopatología de CIMMYT, 20 de Guerrero y 40 de Puebla); así como 3 tratamientos testigo sin herida y 3 con herida hecha con punzón en el elote; por lo que fueron 100 tratamientos (Tabla 1) que se aplicaron en el genotipo 1: TL94A-1977-15 y en el genotipo 2: TL94A-1977-17, proporcionados por CIMMYT, y que en ensayos previos se habían comportado como tolerante y resistente a *F. moniliforme*, respectivamente (Jeffers, 1994). En este primer experimento, se incluyeron casi 100 aislamientos monospóricos del hongo, con el propósito de seleccionar los que resultaran más agresivos para provocar las enfermedades Pudrición de la mazorca y Germinación prematura, y utilizarlos en el segundo experimento de campo en el ciclo siguiente (1995).

b. Diseño y unidades experimentales

En las parcelas de los genotipos 1 y 2, los 100 tratamientos se distribuyeron al azar en un Diseño Experimental Alfa Látilce, que es útil cuando no existe una relación factorial entre tratamientos, estos son muchos (p.e. > 16) y el sitio experimental es muy heterogéneo (Barreto *et al.*, 1992).

La unidad experimental fue un surco de 2.5 m de largo, con 10 plantas. Las distancias respectivas entre surcos y plantas fueron de 0.75 y 0.25 m (Figura 8). Se utilizaron 3 repeticiones y 600 unidades experimentales (Apéndice 3).

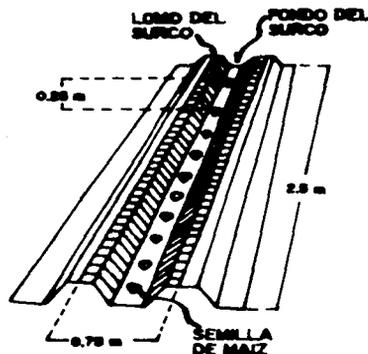


Figura 8. Características de la unidad experimental

Tabla 1. Aislamientos monospóricos de *F. moniliforme* y tratamientos testigo evaluados en el experimento de campo 1994

N°	Tratamiento	N°	Tratamiento	N°	Tratamiento	N°	Tratamiento
1.	Testigo 1-P*	26.	P-8	51.	P-47	76.	C-497
2.	Testigo 2-P*	27.	P-9	52.	P-48	77.	C-501
3.	Testigo 3-P*	28.	P-11	53.	P-49	78.	C-520
4.	Testigo 4-N**	29.	P-12	54.	P-50	79.	C-523
5.	Testigo 5-N**	30.	P-13	55.	P-51	80.	C-555
6.	Testigo 6-N**	31.	G-8	56.	P-52	81.	C-566
7.	G-1	32.	P-22	57.	P-53	82.	C-571
8.	G-2	33.	P-23	58.	P-54	83.	C-574
9.	G-3	34.	P-24	59.	P-61	84.	C-576
10.	G-6	35.	P-26	60.	P-62	85.	C-591
11.	G-7	36.	P-27	61.	P-63	86.	C-599
12.	G-9	37.	P-28	62.	P-64	87.	C-600
13.	G-10	38.	P-29	63.	P-65	88.	C-618
14.	G-11	39.	P-30	64.	P-66	89.	C-624
15.	G-12	40.	P-31	65.	P-67	90.	C-625
16.	G-15	41.	P-33	66.	P-68	91.	C-633
17.	G-16	42.	P-34	67.	C-177	92.	C-634
18.	G-18	43.	P-35	68.	C-266	93.	C-638
19.	G-19	44.	P-36	69.	C-269	94.	C-644
20.	G-20	45.	P-37	70.	C-275	95.	C-675
21.	G-24	46.	P-38	71.	C-298	96.	C-706
22.	G-26	47.	P-39	72.	C-422	97.	C-709
23.	G-28	48.	P-44	73.	C-423	98.	C-713
24.	P-3	49.	P-45	74.	C-474	99.	C-721
25.	P-4	50.	P-46	75.	C-476	100.	C-755

- * = Testigos con herida en el elote T (1, 2 y 3)-P
 ** = Testigo sin herida en el elote T (4, 5 y 6)-N
 G, P y C = Aislamientos fungosos de Guerrero, Puebla y CIMMYT, respectivamente

c. Establecimiento y manejo del cultivo de maíz

La preparación del terreno y demás labores de cultivo se hicieron de acuerdo con las recomendaciones técnicas del Programa de Maíz de CIMMYT, las cuales se describen a continuación.

Preparación del terreno y siembra. Se realizó un barbecho profundo y dos pasos de rastra. Los surcos se trazaron a 0.75 m de distancia. La semilla se trató con una mezcla de furadan 30% (50 mL/kg), arasan 75% PH (2 g) y agua (12 mL) (CIMMYT, 1985); se sembró en terreno seco y en forma manual; se depositaron dos semillas cada 0.25 m en el fondo del surco (Figura 8).

Labores culturales. Se efectuaron las principales labores agronómicas en el cultivo, como son riego para germinación, aclareo, fertilización y control de malezas, de acuerdo con las recomendaciones técnicas de CIMMYT (Jeffers, 1994).

d. Multiplicación de los aislamientos monospóricos

Cultivo en PDA. De los aislamientos monospóricos preservados en tubos de ensayo con gel de sílice (a 5°C), se tomaron muestras de partículas, se depositaron en cajas de Petri con PDA, se incubaron por 5 días a 22°C bajo fotoperíodos de 12 h luz/oscuridad, proporcionados por lámparas tubulares de 39 Watts con intensidad lumínica de 24 micromols/m²/seg. Se utilizaron dos cajas por aislamiento.

Cultivo en glumas de avena. Las glumas verdes de avena, en estado intermedio de desarrollo, favorecen el crecimiento rápido y la esporulación abundante de *F. moniliforme*; por ello, se utilizaron para multiplicar los 94 aislamientos del hongo, de acuerdo con el procedimiento siguiente:

Se remojaron las glumas de avena en agua destilada durante 2 h, se depositaron 9 g de glumas por frasco de vidrio (150 cc), se colocó la tapa sin apretar, se esterilizaron en autoclave (marca Consolidated Stills & Sterilizers) a 120°C (15 libras/pulgada² (por 20 minutos; se repitió este tratamiento a las 24 h. Se utilizaron 2 frascos por aislamiento.

Se preparó una solución de dextrosa (15 g/litro de agua), de la cual se agregaron 20 ml a tubos de ensayo (15 x 2 cm) con tapa atornillable y se esterilizaron en autoclave. Se preparó un tubo de ensayo por aislamiento.

Se cortaron cuadrillos de $\pm 0.5 \text{ cm}^2$ del centro de la colonia de cada aislamiento monospórico cultivado en PDA; se depositaron en el tubo de ensayo con la solución de dextrosa; se agitó en un vortex (marca UL mixer Vortex-Genie. Modelo K55OG) por 1 minuto para formar una suspensión, que se distribuyó en los dos frascos con glumas de avena ($\pm 10 \text{ ml}$ en cada uno); estos se agitaron para distribuir el inóculo, se incubaron 10 días a 22 °C bajo fotoperíodos de 12 h luz/oscuridad. Se inocularon 2 frascos por aislamiento monospórico.

Preparación del inóculo. Al frasco inoculado se le agregaron 50 mL de agua destilada esterilizada y fría (a 5°C), se formó una suspensión, se filtró a través de un cedazo de

manta, se recolectó en un frasco de vidrio (150 cc), se tapó y se guardó en un refrigerador (marca IEM) a 5°C. De cada frasco se preparó una dilución (1:50) de la suspensión de esporas, se homogeneizó, se tomó una muestra, se depositó en los dos campos de un hematocitómetro y se contaron los conidios en un microscopio compuesto (American Optical).

e. Inoculación de las plantas de maíz

Se transportaron al cultivo de maíz los frascos con el inóculo (los 94 aislamientos monospóricos), dentro de una hielera (marca Coleman); se agitó la suspensión de esporas, se tomó una alícuota suficiente para obtener una concentración de 500 000 conidios/mL y se agregó a 500 mL de agua en un frasco de 1 litro.

Cada uno de los 94 aislamientos se inocularon en 60 plantas (6 surcos) de los genotipos 1 y 2 de maíz, a los 7 días después de la floración femenina (95 días después de la siembra), que es la etapa más apropiada (Drepper y Renfro, 1990). Se inocularon ± 5 mL en la parte media del elote, mediante la técnica de punzón (Figura 9).

Se utilizó la misma técnica en los 3 tratamientos testigo con herida, pero sólo se aplicó agua destilada; en los otros 3 testigos sin herida, los elotes estuvieron en estado natural.

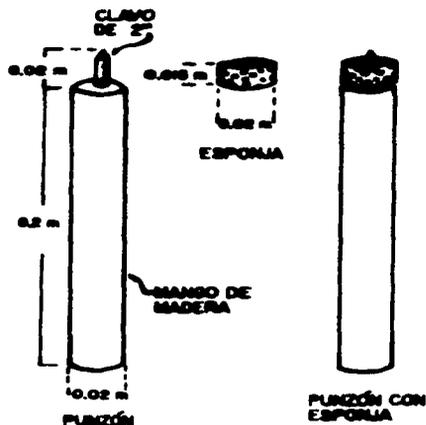


Figura 9. Características del punzón

f. Evaluación de enfermedades foliares, acame de raíz y cobertura de mazorca

Se registraron para conocer el estado fitosanitario del cultivo después de la inoculación de *Fusarium*. Se midió la severidad del tizón foliar (*Helminthosporium turcicum* Pass.) y de la roya (*Puccinia sorghi* Schw.) en 16 surcos de los 2 genotipos, mediante una escala ordinal con valores de 1 a 5, donde 1 = planta sana y 5 = planta afectada severamente por el patógeno (Figura 10).

Se determinó el porcentaje de mazorcas afectadas por carbón común o cuitlacoche [*Ustilago maydis* (DC.) Cda.], en todos los surcos de los genotipos 1 y 2, antes de la cosecha. Se registró el porcentaje de acame de raíz contando las plantas que tenían una inclinación de 30 grados o más, antes de la cosecha. Asimismo, se midió la cobertura de la mazorca, aplicando una escala ordinal con valores de 1 a 5 (Figura 11).

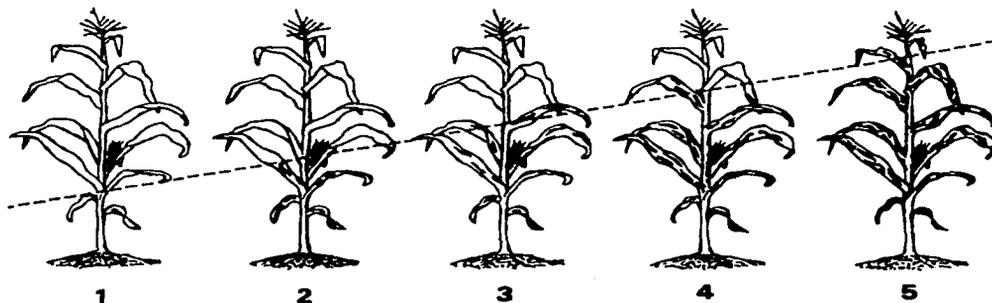


Figura 10. Escala de calificación de enfermedades foliares (CIMMYT, 1985)

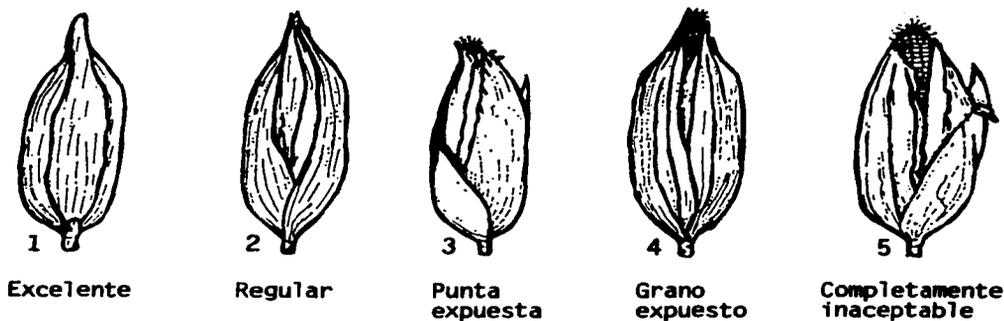


Figura 11. Escala de calificación de cobertura de mazorca (CIMMYT, 1985)

g. Cosecha

Se efectuó en forma manual, las mazorcas cosechadas se colocaron en bolsas de malla de plástico etiquetadas, se trasladaron a mesas de trabajo donde se midieron 5 variables de estudio; se secaron al sol por 10 días, se metieron a un horno secador por 20 días a $\pm 40^{\circ}\text{C}$, se desgranaron en forma manual, se limpió el grano en un aparato con ventilador (Bill's Welding, USA) y se midieron 2 variables de rendimiento.

h. Variables de estudio

Se midieron las variables presentadas en la Tabla 2, para conocer el efecto de los tratamientos en los genotipos 1 y 2.

Tabla 2. Variables de respuesta evaluadas en el experimento de campo 1994

Variable	Abreviatura	Unidad de medida
1. Porcentaje de pudrición de la mazorca	% PM	%
2. Número de granos con germinación prematura	NGGP	Grano
3. Porcentaje de mazorcas con germinación prematura	% MGP	%
4. Longitud de la mazorca	LM	cm
5. Peso total de granos	PTG	g
6. Peso de mil granos	PMG	g
7. Número de mazorcas cosechadas	NMC	Mazorca

Peso de mil granos (PMG). Se separaron 1 000 granos por surco, en un contador eléctrico automático (Electronic Counter. The Old Mill Company. USA), se pesaron en una balanza eléctrica (Casio, K Scale) y se obtuvo el contenido de humedad, que fue de 7.5%, en un determinador Steinlite (modelo G 100 g, Fred Stein Laboratories, USA).

Porcentaje de pudrición de mazorca (%PM). Este término denota el área afectada donde son evidentes los síntomas o signos del hongo; sin embargo, la infección no necesariamente se manifiesta como pudrición o es observable a la vista; a veces, el grano afectado tiene un aspecto normal o sólo presenta manchas opacas, estriado fino o ruptura del epicarpio (Walker, 1975; Jeffers, 1994).

Se midió esta variable aplicando una escala ordinal con valores de 1 a 6, donde: 1 = 0%, 2 = 1-10%, 3 = 11-25%, 4 = 26-50%, 5 = 51-75% y 6 = 76-100% del tejido de la mazorca afectado por el hongo (Figura 12).

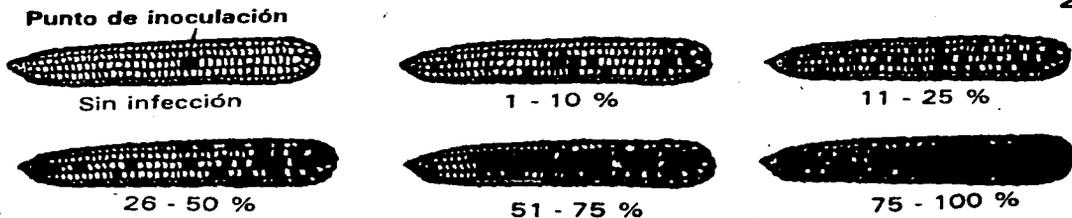


Figura 12. Escala de calificación de pudrición de mazorca por *F. moniliforme* Sheld

i. Análisis estadístico de las variables de estudio

Se elaboró una base de datos y se aplicó el análisis de varianza de acuerdo con el modelo estadístico del Diseño Experimental Alfa Látice. A las variables que presentaron efecto estadísticamente significativo de los tratamientos, a niveles de probabilidad de 1 y 5 %, se les realizó la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$) siguiendo el procedimiento propuesto por Miller (1966). Asimismo, se efectuó un análisis de correlación para determinar el grado de asociación entre las siete variables investigadas. Estos análisis se hicieron por medio del programa JMP versión 95 para Windows de la empresa SAS, en el Instituto de Investigaciones en Matemáticas Aplicadas y Sistemas de la UNAM.

4.2.2 Experimento de campo 1995

Se realizó este segundo ensayo con el propósito de evaluar la respuesta de 18 genotipos de maíz a la infección de mazorca y producción de micotoxinas de las cuatro cepas del hongo que fueron más virulentas en el experimento de campo de 1994.

a. Factores de estudio y tratamientos

Se investigaron los factores: (1) Aislamiento del hongo: 4 cepas monospóricas y un tratamiento testigo (Tabla 3) y (2) Genotipo de maíz: 18 materiales donados por CIMMYT, potencialmente tolerantes al hongo (Tabla 4). La combinación de los niveles de estos dos factores, mediante un arreglo bifactorial 5x18, generó 90 tratamientos.

Tabla 3. Aislamientos monospóricos de *F. moniliforme* Sheld. evaluados en el experimento de campo 1995

Tratamientos	Observaciones
1. Testigo	Planta con elote en estado natural (sin herida)
2. C - 591	Aislamiento utilizado en fitomejoramiento por CIMMYT
3. P - 12	Provocó mayor porcentaje de infección de mazorca
4. P - 44	Causó mayor número de granos con germinación prematura
5. P - 64	Mayor porcentaje de mazorcas con germinación prematura

Tabla 4. Genotipos de maíz cultivados en el experimento de campo 1995

Genotipo	Genealogía*	Origen*
1.	CML 239	BA 94 2159-1
2.	CML 240	BA 94 2159-2
3.	CML 241	BA 94 2159-3
4.	CML 242	BA 94 2159-4
5.	CML 243	BA 94 2159-5
6.	CML 244	BA 94 2159-6
7.	CML 246	BA 94 2159-8
8.	B.P.V.C. BA 90 163-4-1-1-1TL-B-#	TL 95A 1824-1
9.	B.P.V.C. BA 90 185-1-1-2-1TL-1-1TL-B-#	TL 95A 1824-2
10.	B.P.V.C. BA 90 185-1-1-3-2-4TL-B-#	TL 95A 1824-3
11.	B.P.V.C. BA 90 185-2-1-2-2TL-1-1TL-B-#	TL 95A 1824-5
12.	B.P.V.C. BA 90 185-2-4-1-1-2TL-B-#	TL 95A 1824-7
13.	POB. 85 C4 HC 185-2-4-1-1TL-1-1TL-B-#	TL 95A 1824-10
14.	POB. 85 C4 HC 339-1-1-1-1-1-#	TL 95A 1824-11
15.	POB. 800 C5 HC 37-3-4TL-1-1-1TL-B-#	TL 95A 1824-12
16.	POB. 800 C5 HC 37-3-4TL-1-1-2TL-B-#	TL 95A 1824-13
17.	POB. 85 C4 HC 54-1-3-1TL-1-B-#	TL 95A 1824-17
18.	POB. 85 C4 HC 122-1-3-1TL-1-1TL-1-#	TL 95A 1824-18

*. La genealogía y el origen fueron asignados por el Programa de Maíz de CIMMYT.

b. Diseño y unidades experimentales

Los 90 tratamientos se distribuyeron en un diseño experimental de Bloques al Azar con Parcelas Divididas. En la parcela grande (principal) se asignaron los genotipos y en la chica (subparcela), los aislamientos del hongo. Se utilizaron 3 repeticiones y 270 unidades experimentales (Apéndice 4), cuyas características fueron descritas en el experimento de 1994 (Figura 8).

c. Establecimiento y manejo del cultivo de maíz

La preparación del terreno, la siembra y las labores de cultivo se realizaron como en el experimento de campo de 1994.

d. Multiplicación de los aislamientos monospóricos

Se utilizaron 4 aislamientos preservados en tubos de ensayo con gel de sílice, en una incubadora (marca Precision, GCA Corporation) a 5°C; se transfirieron a medio PDA; se pasaron a frascos con glumas de avena, se prepararon suspensiones de conidios, se mantuvieron a 5°C y se determinó la concentración de esporas por mL, siguiendo el mismo procedimiento que en el experimento de 1994.

e. Inoculación de las plantas de maíz

Se preparó medio litro de inóculo (500 mil conidios/mL) de cada aislamiento, se trasladó al cultivo, se inocularon los 18 genotipos mediante la técnica de punzón, a los 7 días después de la floración femenina, en 3 fechas diferentes, porque hubo variabilidad en esta etapa fenológica.

f. Cosecha

Se cosecharon manualmente las mazorcas, se trasladaron a mesas de trabajo donde se midieron 5 variables, se secaron en el horno, se desgranaron a mano, se limpió el grano y se determinaron 2 variables de rendimiento. Se siguió el mismo procedimiento descrito en el experimento de 1994.

g. Variables de estudio

Antes de la inoculación se registraron los días a floración masculina y días a floración femenina, necesarios para establecer las fechas de inoculación. Después de la cosecha se midieron las mismas variables descritas en el experimento de 1994 (Tabla 2).

h. Análisis estadístico

Se elaboró una base de datos de las variables evaluadas, se efectuaron transformaciones matemáticas en las variables: Número de granos con germinación prematura mediante $\log(\text{NGGP} + 1)$, días a floración femenina mediante Box-Cox ($\lambda = -0.6$) y días a floración masculina mediante Box-Cox corregida ($\lambda = 0.2$) eliminándose 11 observaciones discordantes. Estas transformaciones fueron necesarias para hacer que los datos experimentales se ajustaran lo más cerca posible a una distribución normal, que es una de las condiciones que se deben cumplir antes de realizar el análisis de varianza (Miller, 1966), el cual se hizo de acuerdo con el modelo estadístico del diseño de bloques al azar con parcelas divididas.

Los datos de las variables que tuvieron efecto estadísticamente significativo ($P \leq 0.01$ o $P \leq 0.05$), se sometieron a la Prueba de Tukey ($P \leq 0.05$). Además se realizó el análisis de correlación. En estos análisis estadísticos se utilizó el mismo paquete estadístico que en el ensayo de 1994.

4.3 Análisis químico de micotoxinas en maíz del experimento de campo 1994

Preparación de estándares. Se prepararon estándares puros de 4 micotoxinas (Tabla 5); se diluyeron 400 μL de cada una en 200 μL del solvente tolueno-acetonitrilo (97:3 v/v); se aplicó la técnica de cromatografía de capa fina (TLC); se determinó la concentración óptima a utilizarse como referencia en la identificación de las micotoxinas contenidas en las muestras de maíz.

Tabla 5. Número, lote, concentración y dosis de los estándares de ZEA, T-2, DAS y DON analizados mediante cromatografía de capa fina (TLC)

Estándar de micotoxina N° y (Lote) de Sigma, USA	Concentración original (mg/mL*)	Volúmen (μL) aplicado en la placa de TLC	Volúmen óptimo determinado (μL)
1. ZEA Z-2125 (36F-4001)	5.0	50, 100, 150 y 200	40
2. T-2 T-4887 (65F-4008)	1.0	50, 100, 150 y 200	200
3. DAS D-0761 (105F-4018)	1.0	50, 100, 150 y 200	200
4. DON D-2651 (94-01321)	1.25	50, 100 y 200	200

* Los estándares se diluyeron en una solución de benceno-acetonitrilo (9:1 v/v) a 4°C

4.3.1 Aislamiento e identificación de zearalenona (ZEA)

Se seleccionaron 39 muestras de cada genotipo de maíz (78 en total) tomando en cuenta las observaciones anotadas en el Apéndice 5. Se prepararon siguiendo el procedimiento ilustrado en la Figura 13. Se molieron en un molino marca Glenn Mills (Type 11.1) y se realizó el análisis químico aplicando las técnicas que se describen a continuación.

a. Extracción mediante la técnica de Thomas *et al.* (1975)

Se licuaron 50 g de muestra con 150 mL de metanol-agua (60-40 v/v), por 2 minutos, se filtró el extracto en papel Whatman # 4 y se colectó en un embudo de separación de 250 mL. Se agregaron 30 mL de una solución saturada de cloruro de sodio, 50 mL de hexano y se agitó por 1 minuto dejando salir gases.

Al formarse las 2 fases, se transfirió la fracción acuosa de metanol (inferior) a otro embudo de separación, se agregaron 50 mL de cloroformo para extraer el metanol acuoso, se agitó por 1 minuto dejando salir gases.

Al diferenciarse las 2 fases, se drenó la parte inferior de cloroformo en un matraz de 250 mL con 5 g de carbonato cúprico para precipitar los pigmentos. Se agitó por 2 minutos, se dejó asentar, se decantó el cloroformo, se filtró en papel Whatman # 2, que contenía 5 g de sulfato de sodio anhidro, y se colectó en un matraz de 250 mL. Se agregaron 25 mL más de cloroformo para lavar bien el carbonato cúprico en el matraz y se volvió a decantar y a filtrar.

Se evaporó el cloroformo del extracto hasta ± 1 mL, se transfirió a un vial con tapa atornillable (15 x 45 mm) y se evaporó a sequedad en baño maría (BG modelo BM 40 T) a $\pm 60^\circ\text{C}$. Se agregaron 600 μL de cloroformo y se resuspendió el extracto agitando el vial en el vórtex (marca Genie 2 SI) por 1 minuto.

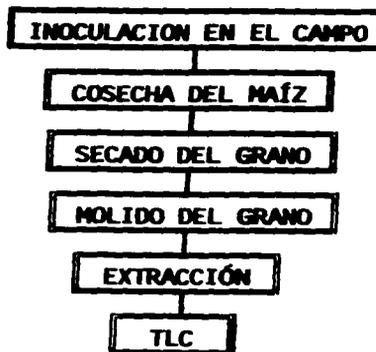


Figura 13. Preparación de las muestras para el análisis químico por cromatografía de capa fina (TLC)

b. Aislamiento e identificación mediante TLC

Se utilizaron placas de aluminio cubiertas con gel de sílice, de 20 x 20 cm (marca Merck 60 F₂₅₄, N° 5554), se les marcó un margen superior de 1.5 cm y otro inferior de 2.5 cm; en estos se marcaron 12 puntos a 1.5 cm de distancia.

Se aplicaron con una pipeta Eppendorf (100 μL), gota a gota, 40 μL (10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) del estándar de ZEA y 300 μL de cada muestra, sobre los puntos marcados donde se formó una mancha concéntrica de ± 1.0 cm de diámetro. Se colocó la placa en el desarrollador de micotoxinas (20 mL de acetona, 40 mL de acetato de etilo y 60 mL de tolueno) dentro de la cámara de desarrollo cerrada, cuidando que el solvente no tocara los puntos de aplicación en la parte inferior de la placa. Se dejó correr el desarrollador con los solutos sobre la placa (40 minutos). Se marcó con un lápiz el límite de avance del solvente, se dejó secar la placa, se observó bajo luz UV de longitud de onda corta y larga (254/366 nm) en un lámpara UV (modelo UVGL-25. UVP. U.S.A.), se marcaron las manchas fluorescentes del estándar y de las muestras. Se calculó la velocidad de flujo o factor de retardación (Rf) dividiendo el valor de la distancia recorrida (cm) por el soluto (muestra o estándar) entre la distancia recorrida por el desarrollador (solvente).

c. Cuantificación por HPLC y espectrofotometría UV/Vis

Se utilizaron los materiales y la metodología siguientes:

Equipo y material

- Cromatógrafo de líquidos con sistema de inyección de solventes (bomba). Series 400 y válvula de inyección de 50 μ L (Perkin Elmer).
- Columna para cromatografía de líquidos C-18 fase inversa (PE/HS 0.258-0.172). Serie 770.
- Integrador de datos LCI-100 (Perkin Elmer).
- Espectrofotómetro en un intervalo de 190-750 nm. Lambda 3A UV/VIS (Perkin Elmer).
- Aparato Kontes para filtrar solventes. N930-1063.
- Agitador con imán (Molda Agitherm. Lindberg).
- Bomba de vacío. EBISA. Modelo FE. 1500. Serie 2431.
- Jeringa de vidrio de 50 μ L para inyección de muestras.
- Papel filtro. Millipore. Cat. N° HVCP 047 00.

Estándar

- Solución "stock" del estándar de ZEA: 42 ppm en 3 ml de metanol grado **HPLC**. De ésta se hicieron diluciones que contenían 1, 2, 3, 4 y 5 ppm de la micotoxina, para hacer la curva de calibración.

Condiciones de análisis

- Fase móvil: Una mezcla de 22% de metanol **HPLC**, 35% de acetonitrilo y 43% de agua. Estos solventes se desgasificaron por agitación y aplicación de vacío.
- Velocidad de flujo: 2.0 mL/min.
- Longitud de onda: 256 nm. Ésta se estableció de la siguiente forma: Se prepararon diluciones de 8, 17, 25, 33 y 42 ppm de ZEA en 3 mL de metanol; se midió la absorbancia de cada una, a intervalos de 5 nm, de 190-750 nm del espectrofotómetro.

Curva de calibración

Se prepararon diluciones conteniendo 1, 2, 3, 4 y 5 ppm (mg/kg) del estándar de **ZEA**; cada una de éstas se analizó por **HPLC** (3 repeticiones); se obtuvieron los cromatogramas con sus áreas respectivas. Estas dos variables mostraron una relación de tipo lineal; de tal manera que a cada concentración de **ZEA** le correspondió una área en el cromatograma. Por ello se midió el grado de asociación o correlación entre estas dos variables, a través del coeficiente de correlación r (Steel y Torrie, 1985) y se utilizó la ecuación de la recta:

$$y = b + mx$$

Donde:

y = Área del cromatograma (variable dependiente).

b = Ordenada al origen.

m = Pendiente de la recta

x = Concentración de la micotoxina (variable independiente).

A partir de los valores conocidos de x y y , se graficó la curva de calibración de **ZEA**, mediante el programa Excel versión 5, y se obtuvieron los parámetros b , m y el coeficiente de correlación, (r); los cuales se utilizaron posteriormente para calcular la concentración de la micotoxina en las muestras analizadas por **HPLC**, como se describe enseguida.

Análisis de ZEA en las muestras de maíz

Las muestras y estándares se prepararon como se ilustra en la Figura 14. Se marcaron uniformemente con una regla perforada (5/16) las superficies de las manchas fluorescentes en la placa de **TLC**. Se raspó con una navaja el gel de sílice dentro de la mancha marcada; se disolvió en 1 mL de metanol; se agitó en el vórtex por 1 minuto; se pasó por filtro de fibra de vidrio # 30 y se colectó el extracto en un vial.

Se agitó el extracto, se extrajo del vial con una jeringa de plástico (10 mL), se pasó a través de un filtro Nucleopore (13 mm, 0.2 μ m); se colectó en el mismo vial lavado con metanol, se evaporó a sequedad en el horno a 30°C y se guardó en un congelador (marca American).

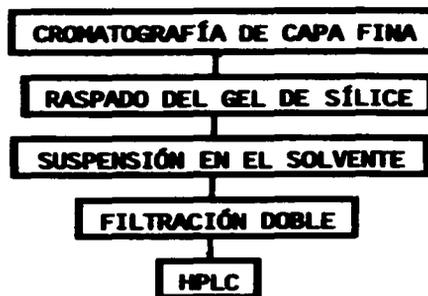


Figura 14. Preparación de las muestras para el análisis químico por cromatografía de líquidos (HPLC)

Se resuspendió en 500 μ L de metanol y se analizó por **HPLC** la muestra que resultó contaminada en el análisis por **TLC**. Se obtuvieron los cromatogramas con sus áreas. Se determinó la concentración de **ZEA** correspondiente a cada área, aplicando la ecuación de la recta; donde se despejó x , quedando la ecuación:

$$x = (y - b)/m$$

donde al sustituir los valores de y , b y m obtenidos previamente (curva de calibración), se determinó el valor de x correspondiente a la concentración de **ZEA** en la muestra.

4.3.2 Aislamiento e identificación de tricotecenos (T-2, DAS y DON)

Se analizaron las mismas 78 muestras utilizadas en el análisis de **ZEA** (Apéndice 5), para extraer y detectar la toxina **T-2**, el **DAS** y el **DON**, que son los contaminantes más comunes en el maíz utilizado para la alimentación del hombre y los animales.

a. Extracción mediante la técnica de Romer (1986)

Se licuaron 50 g de muestra por 1 minuto, con 50 mL de acetato de etilo, 100 mL de metanol-agua (1:1 v/v) y 25 mL de acetonitrilo-agua (21:4 v/v). Se filtró el extracto en papel filtro Whatman # 4 y se colectó en un vaso de precipitado de 250 mL.

Se utilizaron como columnas de cromatografía, jeringas de plástico (10 mL) preparadas con capas sucesivas de papel de fibra de vidrio, papel filtro Whatman # 4, alúmina y una mezcla de 75 g de carbón activado y 30 g de celite.

Se utilizó un volumen de 3 mL de acetonitrilo-agua (21:4 v/v) para preparar la columna. Se vació el extracto en la columna, se presionó con el émbolo de la jeringa, se pasó por goteo a través de la columna, se colectó en un vaso de precipitado de 250 mL, se evaporó a ± 1 mL en baño María a $\pm 60^\circ\text{C}$, se transfirió a un vial y se evaporó a sequedad en un horno (Despatch, Serie 4868, USA) a 50°C .

Se resuspendió en 200 μL de acetona-metanol (2:1 v/v), se agitó en el vórtex, se evaporó a sequedad, se disolvió el residuo en 800 μL de tolueno-acetonitrilo (97:3 v/v) y se agitó en el vórtex.

Se desarrolló la TLC de los tricotecenos tipo A, se aplicaron 200 μL de la muestra y 200 μL de los estándares de DAS (2.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) y de toxina T-2 (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Tabla 5), en la placa para TLC (20 x 20 cm, marca Merck 60 F₂₅₄, N° 5554); se corrieron las micotoxinas en la cámara con un desarrollador de tolueno-acetato de etilo-ácido fórmico al 90% (6:2:1 v/v/v).

Se asperjó a la placa una solución de ácido sulfúrico-metanol (1:10 v/v) y se calentó en el horno a 130°C por 10 minutos para revelar los componentes de la muestra, se observó bajo luz UV (254/366 nm); se marcaron las manchas reveladas y se calcularon los valores de retardación (Rf).

Para los tricotecenos tipo B (DON) se aplicaron en la placa 200 μL del extracto y 300 μL del estándar (Tabla 5); se corrieron las micotoxinas en la cámara con un desarrollador de acetato de etilo-metanol (20:1 v/v).

Se roció a la placa cloruro de aluminio-metanol (1:5 p/v), se calentó en el horno a 130°C por 10 minutos, se observó bajo luz UV, se marcaron las manchas formadas y se obtuvieron los valores de Rf (Figura 17).

b. Cuantificación por HPLC y espectrofotometría UV/Vis

Se utilizó el mismo equipo y material que en el análisis de ZEA. Se prepararon las curvas de calibración para la toxina T-2 y el DAS, de la siguiente manera:

Toxina T-2

Las condiciones de análisis fueron (a) Fase móvil: Una mezcla de 60% de agua destilada, 10% de metanol y 30% de acetonitrilo, (b) Velocidad de flujo: 1.0 mL/min y (c) Longitud de onda: 260 nm, que se estableció al medir la máxima absorbancia en diluciones de 25.2, 33.6 y 50.4 ppm (mg/kg) de T-2 en 3 mL de metanol, a intervalos de 5 nm. Se preparó una solución "stock" de 16.7 ppm (mg/kg) en 3 mL de metanol HPLC, se hicieron diluciones de 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1.0 ppm (mg/kg) de T-2, se realizó la HPLC con 3 repeticiones; se obtuvieron los cromatogramas con sus áreas respectivas; se graficó la curva de calibración, y se calcularon el coeficiente de correlación (r) y los

parámetros de la ecuación de la recta, que después se utilizaron para obtener la concentración de **T-2** en las muestras analizadas por **HPLC**.

Diacetoxiscirpenol (DAS)

Las condiciones de análisis fueron (a) Fase móvil: Una mezcla de 65% de agua destilada, 15% de metanol y 20% de acetonitrilo, (b) Velocidad de flujo: 1.3 mL/min y (c) Longitud de onda: 215 nm, que se estableció al determinar la máxima absorbancia en diluciones de 8.4, 16.8, 25.2 y 33.6 ppm (mg/kg) de **DAS** en 3 mL de metanol, a intervalos de 5 nm en el espectrofotómetro. Se preparó una solución "stock" de 400 ppb ($\mu\text{g}/\text{kg}$) en 550 μL de metanol, se hicieron diluciones de 21.82, 43.64, 65.45, 87.27 y 109.09 ppb ($\mu\text{g}/\text{kg}$) de **DAS**; se aplicó **HPLC** (3 repeticiones) para obtener los cromatogramas con sus áreas; se graficó la curva de calibración; se calcularon los valores de del coeficiente de correlación (*r*) y de los parámetros de la ecuación de la recta, los cuales permitieron determinar la concentración de la micotoxina en cada muestra analizada por **HPLC**.

Análisis de T-2 y DAS en las muestras de maíz

Se aplicó el mismo procedimiento descrito en la cuantificación de **ZEA**. Se raspó el gel de sílice con cada una de la micotoxina en la placa de **TLC**, se disolvió en 1 mL de tolueno-acetonitrilo (97: 3 v/v), se filtró y se analizó por **HPLC**, se obtuvo el área del cromatograma de cada muestra y, con la información de la curva de calibración respectiva, se determinaron las concentraciones de estas micotoxinas en el extracto de la muestra.

4.4 Análisis químico de micotoxinas en maíz del experimento de campo 1995

Se seleccionaron 45 muestras correspondientes a los genotipos 2, 3 y 13 de maíz, tomando en cuenta la respuesta de estos materiales, a la inoculación del hongo *F. moniliforme* (Apéndice 14). Se prepararon las muestras como se indica en la Figura 13 y se sometieron al análisis químico para la extracción, identificación y cuantificación de **ZEA**, toxina **T-2**, **DAS** y **DON**.

4.4.1 Aislamiento e identificación de ZEA

Se realizó la extracción e identificación de esta micotoxina, mediante la misma técnica de Thomas *et al.* (1975), en las 45 muestras de maíz. Los extractos se analizaron mediante **TLC** siguiendo la metodología descrita en el experimento de 1994. Se prepararon las muestras como se indica en la Figura 14 y se efectuó la cuantificación de la micotoxina mediante **HPLC**, utilizando las condiciones de análisis mencionadas.

4.4.2 Aislamiento e identificación de tricotecenos (T-2, DAS y DON)

Se realizó la extracción e identificación de estas micotoxinas, a través de la técnica de Romer (1986) en las 45 muestras de maíz. Los extractos se analizaron mediante **TLC** siguiendo la metodología descrita en el experimento de 1994. Se efectuó la preparación de las muestras (Figura 14) y se llevó a cabo la cuantificación de la micotoxina por **HPLC**, utilizando las condiciones de análisis mencionadas.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se presenta la información obtenida en el estudio de la biología, fitopatología y micotoxinas de *F. moniliforme* Sheld.

5.1 Biología de *F. moniliforme*

Se incluyen las características culturales y morfológicas, la identificación y la preservación de los aislamientos monospóricos originales obtenidos de material enfermo; así como los resultados del estudio de histopatología de granos con síntomas de **Germinación prematura**.

a. Aislamientos monospóricos

Se obtuvieron 94 aislamientos monospóricos: 34 de CIMMYT, 20 de Cocula, Guerrero y 40 de San Jerónimo Ocotitlán, Puebla (Tabla 6). Todos se utilizaron en el experimento de campo de 1994 y sólo 4 en el de 1995.

Los cultivos monospóricos presentaron una apariencia uniforme en HCA en el laboratorio. Las colonias tienden a conservar estables sus características porque cada una de ellas se origina de una espora que representa un genotipo individual y así se asegura la pureza inicial del hongo (Figura 15) (Tuite, 1969; Burgess & Liddell, 1983). Por ello, los cultivos monospóricos deben ser el punto de partida de cualquier investigación relacionada con la taxonomía, fitopatología y micotoxinas de esta especie de *Fusarium*, que cuando se cultiva en forma sucesiva, puede sufrir cambios que alteran su forma y fisiología (Nelson *et al.*, 1983).

Cultivo en medio PDA. Las colonias del hongo produjeron 8 tipos de pigmentaciones, las más frecuentes fueron el rojo carmín (31%), violeta (24%) y anaranjado (20%), como se anotan en la Tabla 6. Estas variaciones de color son típicas de *F. moniliforme*, sobre todo cuando se cultiva en un medio rico en carbohidratos como el PDA; por ello, este substrato se utilizó sólo para observar la pigmentación de la colonia, la cual es una característica secundaria de utilidad en la identificación preliminar de especies de *Fusarium* (Burgess & Liddell, 1983). La tonalidad o intensidad de la coloración varía de acuerdo con el genotipo, la edad de la colonia y las condiciones de luz y temperatura (Booth, 1971). *Fusarium* es un género muy variable, que se adapta mediante cambios morfológicos y fisiológicos a las variaciones del medio donde se desarrolla (Nelson *et al.*, 1983). El 71% de los aislamientos monospóricos formaron esporodoquios, que son fructificaciones de origen asexual donde se producen masas de macroconidios (Figura 16).

Cultivo en hojas de clavel-agar (HCA). Los aislamientos monospóricos formaron abundantes masas de macroconidios agrupados en esporodoquios (Figura 16), en los trocitos de hojas de clavel depositados en la superficie de agar, entre los 7 y 14 días de edad; estas esporas tenían una forma más estable que las originadas sobre fiálides individuales en agar.

Tabla 6. Color y origen de las colonias de 94 aislamientos monospóricos de *F. moniliforme* cultivadas en papa-dextrosa-agar (PDA)

Color*	Origen del aislamiento monospórico	Cantidad
1. Blanco	P (61).	1
2. Bronceado	C (266, 423, 497, 520, 566, 721); G (26); P (35, 44, 53).	10
3. Café oscuro	G (10, 18); P (27, 29, 31, 48).	6
4. Durazno	C (476, 618).	2
5. Anaranjado	C (177, 501); G (2, 7, 8, 9, 11, 12, 15, 20, 24, 28); P (4, 9, 13, 23, 28, 45, 65).	19
6. Carmín	C (269, 275, 523, 574, 591, 600, 633, 634, 638, 644, 706, 755); P (22, 24, 26, 30, 34, 36, 37, 38, 46, 47, 51, 52, 54, 62, 64, 67, 68).	29
7. Rosa	G (1, 3, 16); P (39, 63).	5
8. Violeta	C (298, 422, 474, 555, 571, 576, 599, 624, 625, 675, 709, 713); G (6, 19); P (3, 8, 11, 12, 33, 49, 50, 66).	22
Total		94

* = En base al código de colores de Nelson *et al.* (1983)

Nota: Las letras C, G y P indican CIMMYT, Guerrero y Puebla, respectivamente

Cultivo en cloruro de potasio-agar. Los aislamientos monospóricos formaron abundantes cadenas de microconidios (Figura 15), que es una de las características morfológicas distintivas de esta especie de *Fusarium*. Las cadenas se pudieron distinguir con mayor facilidad en el microscopio estereoscópico, porque este substrato propicia un menor contenido de humedad en la superficie del micelio del hongo (Nelson, *et al.*, 1983).

En el microscopio compuesto se observaron las estructuras morfológicas siguientes: (a) Micelio hialino, de crecimiento rápido, septado con abundantes ramificaciones, (b) Conidióforos simples o ramificados, (c) Microconidios hialinos, unicelulares, ovales, producidos en forma individual, en falsas cabezuelas o en cadenas largas (Figura 15) y (d) Macroconidios hialinos, falcados con 3 a 5 septos producidos en filídes simples o esporodoquios (Figura 16). Asimismo, se notó la formación de esclerocios color negro-azul y no se observaron clamidosporas ni peritecios (cuerpos fructíferos sexuales). Estas características morfológicas y culturales son de valor taxonómico para la identificación de la especie *F. moniliforme*, y coinciden con aquéllas descritas en los manuales ilustrados elaborados por Booth (1977), Burgess y Liddell (1983) y Nelson *et al.* (1983).

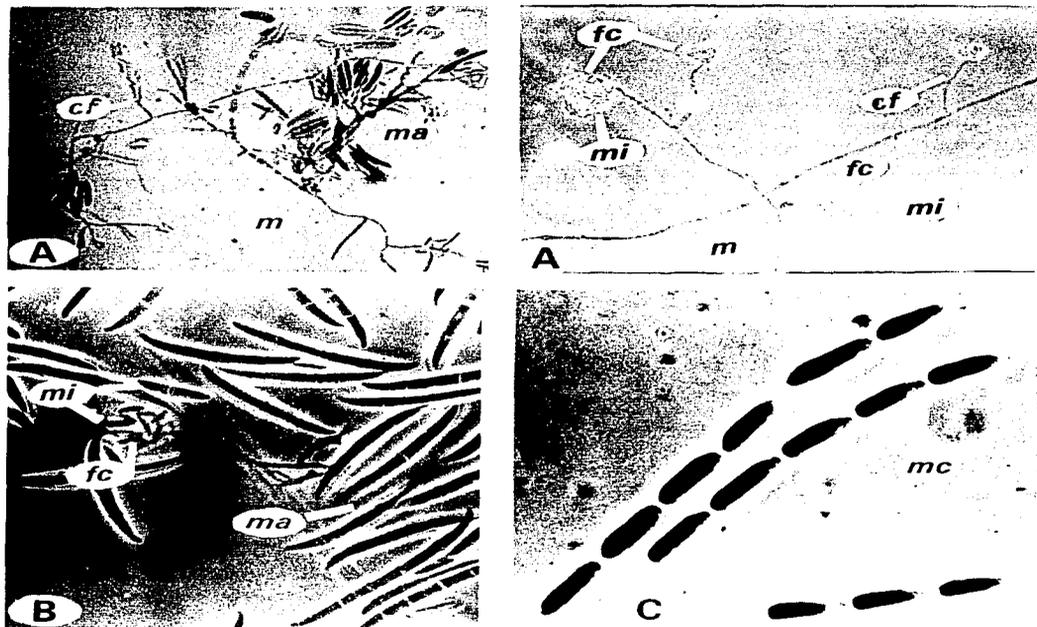


Figura 15. Características del micelio (m), conidióforos (cf), macroconidios (ma), microconidios individuales (mi), en cadena (mc) y en falsas cabezuelas (fc), de *F. moniliforme* Sheld. observadas en el microscopio compuesto (A = 320 x; B = 1 000 x; C: 1 000 x).

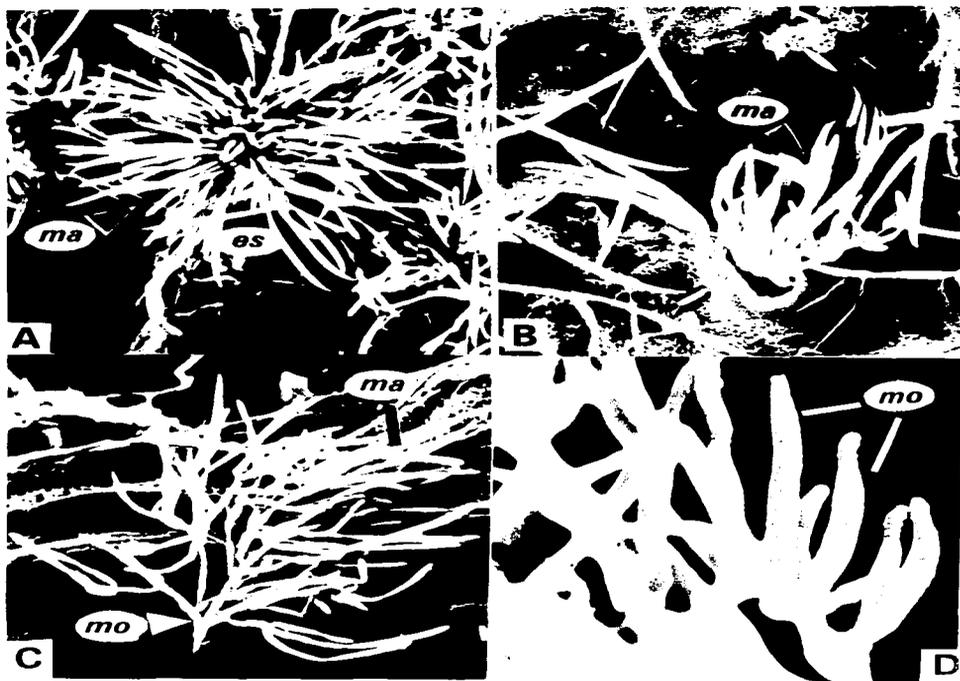


Figura 16. Características de esporoducios (es), macroconidios (ma) y macroconidióforos (monofilídes, mo) de *F. moniliforme* Sheld. observadas en el microscopio de barrido (A = 900 x; B = 950 x; C = 920 x; D = 1 050 x).

b. Conservación de *F. moniliforme* en el laboratorio

Todos los aislamientos monospóricos de *F. moniliforme* mantuvieron su viabilidad por 5, 16 y 28 meses en tubos de ensayo con gel de sílice. Asimismo, en los ensayos realizados en campo se confirmó que, los 94 aislamientos monospóricos causaron síntomas severos de **Pudrición de mazorca** (Apéndices 7 y 9) y **Germinación prematura** (Apéndices 8, 10 y 11) y algunos de ellos conservaron su capacidad para producir las micotoxinas **ZEA, T-2 y DAS** (Apéndices 15, 17 y 19), después de preservarlos por 5 meses. También los aislamientos monospóricos **C-591, P-12, P-44 y P-64** fueron capaces de provocar los síntomas de estas dos enfermedades (Tabla 14 y Apéndice 14) y de producir estas 3 micotoxinas (Apéndices 16, 18 y 20) después de preservarlos 1 año y 4 meses. Con estos resultados se confirma que, los aislamientos monospóricos del hongo se pueden conservar viables, patógenos y con capacidad para producir micotoxinas, durante períodos prolongados de almacenamiento en el gel de sílice. Asimismo, estos resultados validan la información reportada por Windels *et al.* (1988), quienes lograron mantener viables por 5 años, el 100% de los aislamientos de esta especie de *Fusarium*; sin embargo, ellos no realizaron pruebas de patogenicidad, después del almacenamiento prolongado de los hongos estudiados.

c. Histopatología de granos de maíz

El micelio de *F. moniliforme* se localizó principalmente en el embrión de granos con **Germinación prematura**. Estas observaciones confirman los resultados reportados por diversos investigadores tales como Navarrete (1986), que aisló al hongo en el 20% de embriones y el 16% de cotiledones separados de semillas maduras y sembrados en PDA; Lawrence *et al.* (1981) quienes detectaron micelio de este hongo en la parte basal del embrión; Styer y Cantliffe (1984) que localizaron al patógeno en el embrión y el endospermo de semillas de maíz. No obstante, en estos trabajos no se utilizaron semillas afectadas por esta enfermedad, como se hizo en la presente investigación.

Por otro lado, en cortes longitudinales del embrión, se observó que la colonización fungosa causó separación y colapso de las células infectadas en los tejidos de la radícula y el escutelo (Figura 17); este efecto se puede explicar porque durante el proceso de invasión inter o intracelular, las hifas del hongo secretan enzimas (pectolíticas, celulolíticas, proteolíticas y lipolíticas), que degradan los compuestos de la pared y el protoplasma de la célula y provocan el colapso de la estructura celular, tal como lo señalan Foley (1962), Kenaga (1974), Bauer (1984) y Agrios (1985).

Asimismo, en estos cortes se localizaron micelio y condios en la capa interna del pericarpio (Figura 17), y se notaron células con núcleos anormales, un engrosamiento de la capa de aleurona y la presencia de estructuras globulares. Estos resultados coinciden con los reportados por Lawrence *et al.* (1981), aunque las semillas estudiadas por estos investigadores no presentaban **Germinación prematura**. Además, las observaciones de este estudio de histopatología, permiten confirmar la información reportada por Foley (1962), Nyvall y Kommedahl (1970) y Lawrence *et al.* (1981), quienes encontraron micelio del hongo en las capas externas del pericarpio y en el endospermo, pero no localizaron esporas.

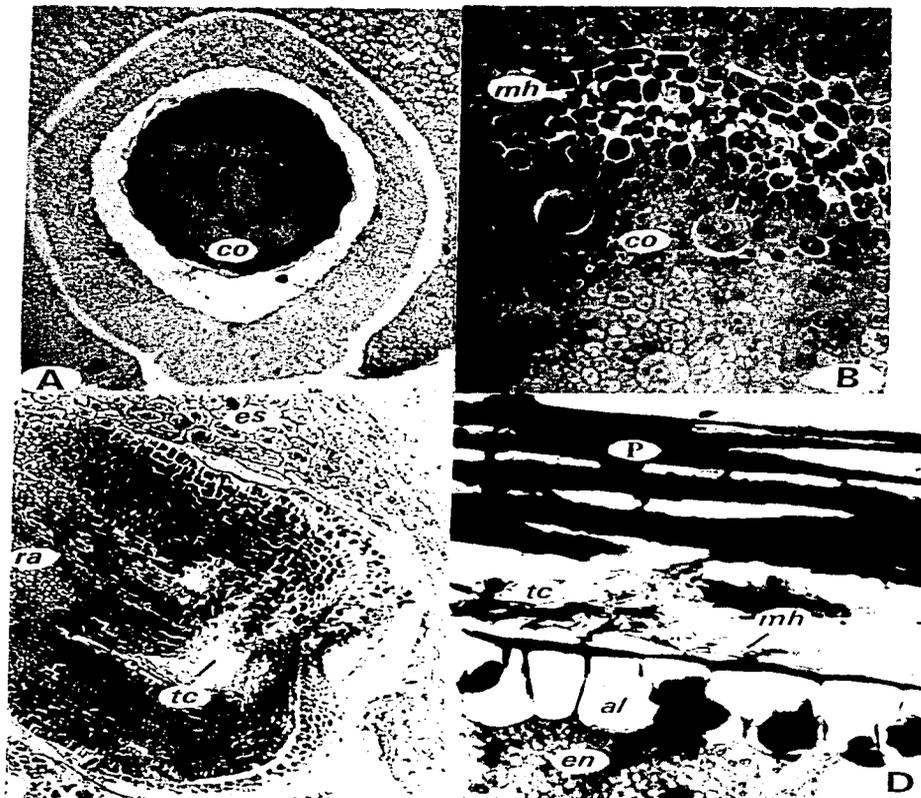


Figura 17. Cortes transversales del coleóptilo (A = 50 x. B = 320 x) y longitudinales de la radícula del embrión (C = 200 x) y en el pericarpio (D = 400 x) de granos de maíz infectados por *F. moniliforme*. Aleurona (al), coleóptilo (co), endospermo (en), radícula (ra), escutelo (es), tejido colapsado (tc), pericarpio (p) y micelio del hongo (mh)

En este estudio histopatológico se observaron conidios de *F. moniliforme* sólo en las capas externas del carióspside; quizás porque la infección del hongo ocurrió en esta porción reducida (mancha) del grano; pues cuando estos maduran pueden sufrir infección externa y/o sistémica, tal como lo han indicado Koehler (1942) y Lawrence *et al.* (1981).

En algunos cortes transversales del coleóptilo se observaron hifas intercelulares, pero no hubo separación del tejido colonizado, lo que sugiere que en la semilla infectada de apariencia normal, el hongo puede invadir sistémicamente al tejido (Navarrete, 1986), sin afectar el poder germinativo, el desarrollo y producción de la planta, como lo citan en sus trabajos Foley (1962) y Naik *et al.* (1982).

La observación de micelio, conidios y estructuras globulares de *F. moniliforme* dentro de granos afectados por **Germinación prematura**, permiten confirmar que este hongo es capaz de sobrevivir y diseminarse en la semilla enferma, tal como se ha mencionado en los trabajos de Booth (1971), Walker (1985) y Shurtleff (1977). Sin embargo, la semilla afectada por esta enfermedad no se considera una fuente importante de inóculo, como lo demuestran los resultados obtenidos por Navarrete (1986), quien no encontró relación entre el porcentaje de infección por *F. moniliforme* en la semilla cosechada en el primer año y la incidencia de la **Germinación prematura** en el siguiente ciclo de cultivo. Asimismo, se debe tomar en cuenta lo señalado por Kucharek y Kommedahl (1966), en el sentido de que la semilla infectada por *F. moniliforme*, no es una fuente de inóculo tan importante como el aire y el suelo, para el desarrollo de la pudrición del tallo y mazorca en el cultivo de maíz. Contrariamente, Foley (1962) señala que la semilla contaminada contribuye en forma considerable a las infecciones sistémicas de *F. moniliforme* en plantas de maíz.

5.2 Fitopatología de la interacción *F. moniliforme* - maíz

Se presenta la información de los experimentos de campo de 1994 y 1995.

5.2.1 Experimento de campo 1994

Se describe primero la información relacionada con el estado fitosanitario del cultivo experimental después de la inoculación; enseguida, se exponen los resultados de las variables estudiadas, primero en el genotipo 1 y después en el genotipo 2, porque el análisis estadístico de cada uno de ellos, se efectuó por separado.

a. Enfermedades foliares, acame de raíz y cobertura de mazorca

La parcela experimental cultivada con los genotipos 1 y 2 no presentó problemas serios de enfermedades foliares. Se registraron daños ligeros de tizón (*H. turcicum*) y roya (*P. sorghii*) que afectaron sólo las hojas inferiores y algunas de la parte intermedia de las plantas. Cuando estas dos enfermedades causan daños severos, destruyen el área fotosintética y, por consiguiente, hacen que disminuyan el desarrollo de la raíz y la productividad de la planta (Shurtleff, 1977; Agrios, 1985).

El carbón común (*U. maydis*) tuvo una incidencia menor de 15%. Con base en esta información, se infiere que estas 3 enfermedades del follaje, no afectaron el desarrollo de las plantas experimentales inoculadas con el hongo, ni el rendimiento de grano. El cultivo no fue afectado en forma considerable por el acame de raíz, que fue de $\pm 11\%$.

En los genotipos 1 y 2 la cobertura de mazorca fue de 3, que indica, de acuerdo con la escala aplicada, que las mazorcas se caracterizaron por tener la punta expuesta y cubierta flojamente por las brácteas, lo cual se considera agronómicamente desfavorable, porque bajo esta condición, la mazorca está más expuesta a daños por penetración de humedad, ataque de plagas y pudrición por hongos (Bauer, 1984).

b. Genotipo 1 de maíz

Se incluyen los resultados del análisis de varianza, la prueba de Tukey y el análisis de correlación de las variables que se midieron en este genotipo.

Análisis de varianza. En la Tabla 7 se muestra un resumen de los resultados de los análisis de varianza obtenidos en las 7 variables estudiadas.

El efecto de los tratamientos fue estadísticamente significativo ($P \leq 0.05$) sólo sobre el %MGP (CM = 1902.6*), y altamente significativo ($P \leq 0.01$) sobre el % PM (CM = 235.4**); mientras que estos efectos no se detectaron (ns) en las variables **NGGP**, **PMG**, **PTG**, **NMC** y **LM**, probablemente porque hubo mucha variación dentro de los tratamientos, y por ello no fue posible detectar el impacto que produjo la inoculación de los aislamientos fúngos, sobre estas variables evaluadas.

Con base en estos resultados, se analizan sólo las dos primeras variables que fueron afectadas significativamente por los tratamientos y, en consecuencia, se sometieron a la Prueba de Tukey.

Porcentaje de pudrición de mazorca (%PM)

Se registraron síntomas de pudrición de mazorca en todos los tratamientos evaluados, cuyos valores fluctuaron de 35.04 a 82.52% (Apéndice 7); esto significa que todos los aislamientos monospóricos de *F. moniliforme* fueron patógenos en menor o mayor grado; los más virulentos fueron de Puebla (**28**, **34**, **36** y **63**) y CIMMYT (**474** y **574**), cuyos daños fluctuaron de 82.5 a 76.4; en comparación con la menor severidad manifestada por las plantas inoculadas con las cepas de CIMMYT (**266**, **566**, **638**, **644** y **755**) y la **P-11**, con daños entre 51.97 y 47.33% **PM**. Los demás tratamientos se ubicaron en una posición intermedia.

Estos resultados corroboran la amplia variación patógena expresada por *F. moniliforme*, tal como lo han indicado Booth (1971), Walker (1975), Burgess y Liddell (1983), Nelson *et al.* (1983) y otros investigadores. Esta gran variabilidad justifica que en el presente trabajo se hayan probado casi 100 aislamientos monoconidiales, pues entre mayor sea la muestra, se tienen más probabilidades de detectar genotipos del hongo virulentos, y así, prevenir los problemas de trabajar con aislamientos avirulentos o que son poco virulentos, como lo indican las experiencias de otros investigadores que han trabajado con *F. moniliforme* en maíz (Félix y Romero, 1981; Navarrete, 1986). La patogenicidad exhibida por los 94 aislamientos, es una evidencia clara de que el gel de sílice y la baja temperatura (5 °C) son condiciones apropiadas para conservarlos viables y virulentos.

Tabla 7. Valores de los cuadrados medios (CM) y probabilidad (P) obtenidos de los análisis de varianza de las variables evaluadas en el genotipo 1 de maíz cultivado en el experimento de campo 1994

Fuentes de variación	Grados de libertad	Variables de estudio						
		% PM	NGGP	% MGP	PMG	PTG	NMC	LM
Repetición	2	CM = 9731.4 P = 0.000	CM = 111.6 P = 0.384	CM = 1217.6 P = 0.000	CM = 246.8 P = 0.193	CM = 309.1 P = 0.968	CM = 0.003 P = 0.995	CM = 6.801 P = 0.000
Bloque dentro de Repetición	27	CM = 165.4 P = 0.078	CM = 128.0 P = 0.341	CM = 232.0 P = 0.011	CM = 114.3 P = 0.786	CM = 9116.8 P = 0.517	CM = 0.679 P = 0.434	CM = 0.575 P = 0.759
Tratamiento	99	CM = 235.4 P = 0.000 **	CM = 122.5 P = 0.376 <u>ns</u>	CM = 1902.6 P = 0.014 *	CM = 179.6 P = 0.139 <u>ns</u>	CM = 9587.9 P = 0.457 <u>ns</u>	CM = 0.490 P = 0.948 <u>ns</u>	CM = 0.791 P = 0.310 <u>ns</u>
Error	171	CM = 113.3	CM = 116.1	CM = 126.2	CM = 148.5	CM = 9432.9	CM = 0.661	CM = 0.726
Total	299	CM = 242.4	CM = 117.9	CM = 161.3	CM = 163.2	CM = 9389.8	CM = 0.619	CM = 0.802

* = Significativo ($P \leq 0.05$)

** = Altamente significativo ($P \leq 0.01$)

ns = No significativo

Variables: %PM = Porcentaje de pudrición de mazorca, NGGP = Número de granos con germinación prematura, %MGP = Porcentaje de mazorcas con germinación prematura, PMG = Peso de mil granos, PTG = Peso total de granos, NMC = Número de mazorcas cosechadas y LM = Longitud de mazorca

Por otro lado, en los tres tratamientos testigo T (4, 5 y 6)-N sin herida, se registraron daños de 43.42 a 35.04 %PM, que son más ligeros, si se comparan con grados de 48.32 a 73.30% de pudrición desarrollados en las mazorcas de los otros testigos T (1, 2 y 3)-P, con herida (Apéndice 7). Es decir, las mazorcas con herida fueron afectadas más severamente por el hongo, que las que se desarrollaron en su estado natural. En las dos categorías de testigos, las mazorcas sufrieron infección natural, posiblemente porque estuvieron expuestas a una alta densidad de inóculo procedente de las plantas vecinas inoculadas con los diversos aislamientos monospóricos. Incluso, se encontró que en estos testigos la enfermedad causó más daños que en plantas que fueron inoculadas con algunos aislamientos del hongo (Apéndice 7).

La herida por sí sola es un factor que favorece el desarrollo de la pudrición. Esto significa que el punzón es una técnica eficiente para la inoculación de aislamientos monospóricos de *F. moniliforme*, porque la herida que provoca (± 3.6 mm) al momento de introducir el inóculo, propicia el desarrollo más severo de la enfermedad. Es la técnica de inoculación utilizada por CIMMYT para seleccionar materiales resistentes a la pudrición de mazorca provocadas por ésta y otras especies de *Fusarium*; se utilizó en la presente investigación, porque está demostrado que la inoculación mediante una herida artificial, simula los daños naturales ocasionados por los insectos perforadores, al alimentarse del tejido vegetal (Drepper y Renfro, 1990).

La infección natural sufrida por los testigos sin herida, indica que el hongo tiene la capacidad de penetrar en forma directa en la mazorca; o bien, a través de heridas provocadas por granizo, pájaros, insectos u otros agentes naturales, tal como ha sido citado por Smeltzer (1959), Christensen y Wilcoxson (1966), Shurtleff (1977), Nyvall (1979), Holliday (1980), Sutton (1982) y Drepper y Renfro (1990).

Porcentaje de mazorcas con germinación prematura (%MGP)

Se encontraron síntomas de **Germinación prematura** en las mazorcas cosechadas en todos los tratamientos utilizados en el genotipo 1 (Apéndice 8). Se determinó un intervalo de variación de 0.45 a 41.14 %MGP. En las mazorcas inoculadas con los aislamientos de Puebla (38 y 34) y de CIMMYT (476 y 520), se obtuvieron las mayores incidencias, de 41.1 a 33.5% de mazorcas dañadas. La enfermedad se presentó con menor frecuencia, en los tratamientos C-634 (0.5%) y C-618 (0.45%). Sin embargo, al realizar la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$), estas diferencias no fueron significativas estadísticamente, quizás porque esta característica tuvo una variación elevada dentro de los tratamientos; es decir, hubo varios de ellos con valores de cero, mientras que en otros se registraron más de 40 mazorcas afectadas; esta amplia variabilidad no permitió que se detectaran en forma clara los efectos provocados por la inoculación de los aislamientos fúngicos.

Análisis de correlación. En éste y en los análisis posteriores, se analizó la correlación sólo del %PM, NGGP y %MGP contra las demás variables, porque son las de mayor interés, de acuerdo con los objetivos de la investigación. El %PM se asoció en forma positiva y significativa ($P \leq 0.05$) con el NGGP ($r = 0.1561^*$), y altamente significativa ($P \leq 0.01$) con el %MGP ($r = 0.3266^{**}$), como se muestra en la Tabla 8.

Tabla 8. Análisis de correlación (valores de r) de las variables evaluadas en el genotipo 1 de maíz cultivado en el experimento de campo 1994

Variables	NGGP	%MGP	LM	PMG	PTG	NMC
%PM	0.1561 *	0.3266 **	0.0726 ns	- 0.2505 **	- 0.2589 **	- 0.0011 ns
NGGP		0.6036 **	- 0.0711 ns	- 0.0739 ns	- 0.1944 ns	- 0.0423 ns
%MGP			- 0.0343 ns	- 0.0379 ns	- 0.1640 ns	0.0450 ns

* = Significativo ($P \leq 0.05$)

** = Altamente significativo ($P \leq 0.01$)

~~ns~~ = No significativo

Variables: %PM = Porcentaje de pudrición de mazorca, NGGP = Número de granos con germinación prematura, %MGGP = Porcentaje de mazorcas con germinación prematura, LM = Longitud de mazorca, PMG = Peso de mil granos, PTG = Peso total de granos y NMC = Número de mazorcas cosechadas

La relación entre estas variables indica que a medida que el hongo invade y pudre el tejido de la mazorca, se incrementa la cantidad de granos germinados, consecuentemente, aumenta el porcentaje de mazorcas con **Germinación prematura**. Estos resultados coinciden con los reportados por González *et al.* (1987), quienes encontraron una correlación positiva de $r = 0.71^{**}$ entre la **Pudrición de la mazorca** y el número de granos con **Germinación prematura**.

Asimismo, estos datos experimentales corroboran la estrecha relación que existe entre la enfermedad **Pudrición de la mazorca (%PM)** y la **Germinación prematura (NGGP y %MGP)**, cuyos síntomas son manifestaciones patológicas de la actividad parasitaria, que el mismo agente causal ejerce sobre un mismo hospedante; pero la expresión de estos síntomas, en forma individual o combinada, puede ser el resultado de la interacción entre las condiciones ambientales (temperatura, humedad relativa, fotoperíodo, etc.), el genotipo tanto de maíz como de *Fusarium moniliforme* y las prácticas culturales que se apliquen en el cultivo de maíz (fecha de siembra, tipo de fertilización, riegos, época de cosecha, etc.), tal como lo han observado en períodos anteriores Félix y Romero (1981), Navarrete (1986) y Galindo (1996).

Por otra parte, el %PM se correlacionó en forma negativa y altamente significativa ($P \leq 0.01$) con el PMG ($r = -0.2505^{**}$) y el PTG ($r = -0.2589^{**}$), lo que sugiere que si ocurre una severa infección de la mazorca, en consecuencia, se produce una disminución del tamaño y el peso del grano. Esta premisa es evidente si se toma en consideración que en este experimento, los elotes de las plantas de maíz se inocularon a los 7 días después de la floración, que es una etapa temprana en la formación del grano, de tal manera que la infección del hongo puede interferir, el proceso de desarrollo y llenado final del grano.

c. Genotipo 2 de maíz

Análisis de varianza. En la Tabla 9 se puede ver que los tratamientos aplicados en este genotipo provocaron efectos significativos ($P \leq 0.05$) sobre el %MGP (CM = 354.1*), y altamente significativos ($P \leq 0.01$) sobre las variables %PM (CM = 158.4**), NGGP (CM = 262.3**), PMG (CM = 901.3**) y PTG (CM = 15597.5**). En las variables NMC y LM no hubo efecto significativo (ns) de los tratamientos; por ello, se presentan sólo los resultados de las 5 variables que exhibieron el efecto significativo de los tratamientos.

Porcentaje de pudrición de mazorca (%PM)

En todos los tratamientos se registraron daños de 100 a 54.7% de pudrición de mazorca (Apéndice 9). Estos resultados indican que los 94 aislamientos fueron capaces de atacar, en mayor o menor grado, a este genotipo de maíz y que también presentaron infección natural, las mazorcas no inoculadas (testigos).

Los aislamientos que destacaron por provocar los mayores grados de pudrición, fueron: P-62 (100%), P-36 (100%), P-67 (99.3%), P-35 (99.1%), P-24 (98.1%) y P-(66, 48, 49 y 28), con más de 97%. En forma comparativa, las cepas menos agresivas fueron: C-618 (83.1%), G-16 (82.6%), G-9 (82%), C-423 (79.6%) C-634 (78.3%), C-755 (76.6%) y P-3 (69.2%). Estos valores promedio indican que las mazorcas del genotipo 2 sufrieron una pudrición más severa que las del genotipo 1 (Apéndice 7).

La infección natural del hongo fue menos severa, como se esperaba, en las mazorcas de los tratamientos testigo sin herida en el elote; así, en el testigo T 5-N causó 54.4% de pudrición de mazorca, en T 6-N, 57.2% y en T 4-N, 68.7%; comparativamente, los daños de pudrición fueron más graves en los testigos con herida, pues el T 2-P presentó 87.8%, el T 3-P, 88.1% y el T 1-P, 91.6%. Estos resultados vuelven a confirmar, que la herida provocada en forma artificial o por agentes naturales (insectos, granizo, etc.) es un factor favorable para la infección y el desarrollo de la pudrición del tejido inoculado, tal como lo han informado Littlefield (1964); Shurtleff (1977), Nyvall (1979), Navarrete (1986) y Drepper y Renfro (1990).

Número de granos con germinación prematura (NGGP)

En todos los tratamientos se observaron granos afectados por la enfermedad, al menos un grano por mazorca (Apéndice 10). Los aislamientos mostraron amplia variación en su capacidad para causar germinación prematura.

La mayor frecuencia de granos afectados se observó en las mazorcas inoculadas con los aislamientos P-64 (72.2 granos), C-599 (30.6), P-27 (27.8), P-11 (27.4) y P-34 (27.3). Comparativamente, en los tratamientos de CIMMYT (275, 721 y 269), así como en los de Guerrero (26 y 3) los daños de esta enfermedad fueron muy ligeros, cuyos valores promedio fueron equivalentes a cero, después de ajustarlos durante el análisis estadístico, a través de los cuadrados mínimos (Miller, 1966).

La infección natural de *F. moniliforme* provocó diferentes grados de germinación de granos en los tratamientos testigo con herida T 1-P (26.5 granos afectados), T 3-P (12.1 granos) y T 2-P (5.4 granos); mientras que en los testigos sin herida T 4-N, T 6-N y T 5-n se obtuvieron 7.5, 5.0 y 3.3 granos germinados, respectivamente (Apéndice 10).

Tabla 9. Valores de cuadrados medios (CM) y probabilidad (P) obtenidos de los análisis de varianza de las variables evaluadas en el genotipo 2 de maíz cultivado en el experimento de campo 1994

Fuentes de variación	Grados de libertad	Variables de estudio						
		% PM	NGGP	% MGP	PMG	PTG	NMC	LM
Repetición	2	CM = 148.3 P = 0.063	CM = 101.7 P = 0.478	CM = 246.1 P = 0.389	CM = 1360.9 P = 0.008	CM = 36407.4 P = 0.018	CM = 4.053 P = 0.037	CM = 9.869 P = 0.000
Bloque dentro de repetición	27	CM = 34.2 P = 0.909	CM = 191.5 P = 0.106	CM = 320.9 P = 0.206	CM = 599.9 P = 0.001	CM = 8016.8 P = 0.610	CM = 2.359 P = 0.006	CM = 1.060 P = 0.391
Tratamiento	99	CM = 158.4 P = 0.000 **	CM = 262.3 P = 0.000 **	CM = 354.1 P = 0.037 *	CM = 901.3 P = 0.000 **	CM = 15597.5 P = 0.001 **	CM = 1.214 P = 0.485 ns	CM = 0.959 P = 0.581 ns
Error	171	CM = 52.9	CM = 137.3	CM = 258.9	CM = 272.1	CM = 8895.4	CM = 1.210	CM = 0.998
Total	299	CM = 89.0	CM = 181.6	CM = 298.8	CM = 555.7	CM = 11140.3	CM = 1.307	CM = 1.082

* = Significativo ($P \leq 0.05$)

** = Altamente significativo ($P \leq 0.01$)

ns = No significativo

Variables: %PM = Porcentaje de pudrición de mazorca, NGGP = Número de granos con germinación prematura, %MGP = Porcentaje de mazorcas con germinación prematura, PMG = Peso de mil granos, PTG = Peso total de granos, NMC = Número de mazorcas cosechadas y LM = Longitud de mazorca

Las mazorcas de las plantas testigo fueron más afectadas que aquellas inoculadas con aislamientos monospóricos que resultaron menos virulentos, principalmente de Guerrero y CIMMYT. Estos resultados coinciden con la información reportada por Navarrete (1986), quien encontró que la infección natural de *F. moniliforme* provocó germinación de granos y desarrollo de plántulas en elotes de la variedad V-424, que no fueron inoculados (testigos); este investigador argumenta que la infección, quizás fue propiciada por la presencia de un alto nivel de inóculo en el ambiente; tal como había ocurrido en esa región agrícola, en 1984 cuando se detectó entre el 40 y 50% de infección natural en cultivos experimentales establecidos en El Horno, Edo. de México.

Porcentaje de mazorcas con germinación prematura (%MGP)

En todas las unidades experimentales se encontraron mazorcas afectadas por esta enfermedad (Apéndice 11). Hubo variación en la virulencia de los aislamientos fungosos, como ocurrió en la variable anterior (NGGP), la cual está relacionada en forma directa con el %MGP (Apéndice 10). En las plantas afectadas los daños variaron de 68.7 a 3.8% de mazorcas enfermas. La mayor severidad se observó en las mazorcas inoculadas con el aislamiento **P-64**, que logró atacar al 68.7% de las mazorcas; en cambio, las cepas de CIMMYT **C-501** (10.1% MGP), **C-634** (6.5%), **C-266** (6.4%) y **C-269** (3.8%), resultaron menos agresivas junto con **P-39** (6.3 %) y **G-3** (5.8%), pues afectaron al 10% o menos de las mazorcas inoculadas. El tratamiento testigo **T 5-N** con 6.0%, también se ubicó entre los menos afectados por esta enfermedad.

Peso de mil granos (PMG)

El tamaño del grano, en peso, es una característica cuantitativa del rendimiento, la cual fluctuó de 248.5 a 172.6 g (Apéndice 12). Las mazorcas de las plantas inoculadas con los aislamientos **P-3**, Guerrero (**8** y **26**) y CIMMYT (**266**, **755**, **634** y **555**), produjeron los granos más pesados. Al comparar estos resultados con los reportados en el Apéndice 9, se nota claramente, que algunos de los tratamientos indicados fueron más productivos porque se inocularon con las cepas que resultaron menos agresivas para inducir la germinación de granos. Es decir, es evidente que a menor tejido dañado, el vegetal presenta una mayor capacidad de rendimiento; o bien, éste es menor conforme se incrementa la severidad de las dos enfermedades (Tabla 10).

Asimismo, se cosecharon granos con mayor peso, como se esperaba, en las plantas de los tres tratamientos testigo sin herida **T (4, 5 y 6)-N**, pues aunque estos sufrieron infección natural del hongo, su desarrollo no fue afectado en forma severa. En los testigos con herida **T (1, 2 y 3)-P** se obtuvieron rendimientos de 228.5 a 198.44 g, intermedios a los indicados. En las plantas inoculadas con los aislamientos de Puebla (**27**, **63**, **49**, **48** y **54**) produjeron los granos de menor peso.

Peso total de granos (PTG)

El rendimiento total de grano fue afectado por la inoculación de los aislamientos monospóricos de *F. moniliforme*; fue superior a los 530 g, en las plantas inoculadas con **P-23**, **C-555** y **C-423**, las cuales sufrieron menos Pudrición de la mazorca (Apéndice 9). Comparativamente, las plantas de los tratamientos **P-12**, **P-66** y **P-36** tuvieron

rendimientos inferiores a 250 g, porque fueron de las más afectadas por esta enfermedad. Por otro lado, las plantas de los tratamientos testigo sin herida T (4, 5 y 6)-N destacaron porque produjeron más de 440 g (Apéndice 13); a pesar de que sufrieron la infección natural de este hongo (Apéndices 9-11).

Análisis de correlación. En la Tabla 10 se puede constatar que el **%PM** se correlacionó en forma positiva y altamente significativa ($P \leq 0.01$) con el **NGGP** ($r = 0.1701^{**}$) y el **%MGP** ($r = 0.2642^{**}$); esto significa que la incidencia de la **Germinación prematura** se incrementó a medida que ocurrió una mayor colonización y pudrición de la mazorca.

Tabla 10. Análisis de correlación (valores de r) de las siete variables evaluadas en el genotipo 2 de maíz cultivado en el experimento de campo 1994

Variables	NGGP	%MGP	LM	PMG	PTG	NMC
%PM	0.1701 **	0.2642 **	- 0.1549 <u>ns</u>	- 0.4769 **	- 0.5079 **	- 0.0976
NGGP		0.5957 **	- 0.0807 <u>ns</u>	- 0.1351 *	- 0.0397 <u>ns</u>	0.1164 *
%MGP			- 0.0601 <u>ns</u>	- 0.1388 <u>ns</u>	- 0.1807 **	- 0.1052

* = Significativo ($P \leq 0.05$)

** = Altamente significativo ($P \leq 0.01$)

ns = No significativo

Variables: **%PM** = Porcentaje de pudrición de mazorca, **NGGP** = Número de granos con germinación prematura, **%MGP** = Porcentaje de mazorcas con germinación prematura, **LM** = Longitud de mazorca, **PMG** = Peso de mil granos, **PTG** = Peso total de granos y **NMC** = Número de mazorcas cosechadas

Asimismo, el **%PM** manifestó una asociación de tipo negativo y altamente significativa con el **PMG** ($r = -0.477^{**}$) y el **PTG** ($r = -0.508^{**}$); lo que sugiere que a medida que la infección de la mazorca se vuelve más severa, se produce una disminución considerable en el tamaño y rendimiento de grano; sobre todo si se toma en cuenta, que el hongo se inoculó en la etapa inicial de desarrollo de la mazorca, a los 7 días después de la floración femenina.

El **NGGP** se correlacionó en forma positiva y altamente significativa con el **%MGP** ($r = 0.5957^{**}$); esta asociación resulta obvia porque el porcentaje de mazorcas enfermas (al menos con un grano germinado), tiende a crecer a medida que se incrementa la frecuencia de granos de maíz afectados. Esta misma variable manifestó una correlación negativa y significativa con el **PMG** ($r = -0.1351^{*}$); de manera que las mazorcas atacadas por esta enfermedad, antes de completar su madurez fisiológica, tienden a producir granos de menor tamaño. El **%MGP** prematura mostró una asociación negativa y altamente significativa con el peso total de granos ($r = -0.1807^{**}$).

d. Análisis general de la respuesta de los genotipos 1 y 2 de maíz

Los valores promedios de la Tabla 11 no fueron comparados mediante la prueba de Tukey, porque en cada genotipo se hizo un análisis estadístico independiente.

Los dos genotipos de maíz fueron susceptibles al ataque de *F. moniliforme*, bajo las mismas condiciones de cultivo, clima y suelo. En el genotipo 1 los daños producidos por las dos enfermedades, evaluados mediante el %PM, NGGP y el %MGP, fueron ligeramente menos severos que en el genotipo 2; quizás por esta razón produjo una mayor cantidad de mazorcas (NMC), presentó el rendimiento de granos más alto (PMG) y desarrolló mazorcas de mayor longitud (LM). El genotipo 2 superó al genotipo 1, sólo en el tamaño de grano (Tabla 11).

Tabla 11. Valores promedio de las variables evaluadas en el experimento de campo 1994

Variable	Genotipos	
	1	2
1. % de mazorcas con pudrición	63.0	88.9
2. Número de granos con germinación prematura	8.9	10.9
3. % de mazorcas con germinación prematura	16.0	25.3
4. Longitud de mazorca (cm)	15.0	11.5
5. Peso de mil granos (g)	186.7	209.2
6. Peso total de granos (g)	572.6	347.3
7. Número de mazorcas cosechadas	9.6	8.7

El genotipo 1 es una línea avanzada de ± 4 ciclos de selección para mejorar resistencia a *F. moniliforme* (Jeffer, 1996); se utilizó en la presente investigación porque era un material prometedor, que en ensayos de campo realizados con anterioridad (ciclo p/v 1993), se había comportado tolerante a la infección del hongo; sin embargo, en este experimento de 1994 mostró una respuesta distinta, pues produjo mazorcas con 63% de pudrición, el cual es un nivel de daño severo y cercano a 88.9% registrado en el genotipo 2, el cual está caracterizado como muy susceptible al hongo y se utilizó en este trabajo, con el propósito de que permitiera la expresión de los diversos grados de patogenicidad de los 94 aislamientos monospóricos y, así, poder seleccionar los más agresivos, en condiciones de campo.

Para comprender mejor la respuesta de estos dos genotipos de maíz, al ataque del hongo *F. moniliforme*, es importante tener en mente, que el desarrollo de una enfermedad, está determinado por la presencia de un patógeno virulento y de condiciones ambientales favorables para el desarrollo de la enfermedad, tal como lo han señalado Blanchard y Tattar (1981) y Bauer (1984). Por ello, es posible que la variación en la respuesta del genotipo 1 a la infección del hongo, pudo haber sido determinada por las condiciones de suelo y clima, principalmente por la precipitación y la temperatura (Tabla 12), así como por la humedad relativa y el viento, que se presentaron en el campo agrícola 'El Batán' de CIMMYT, donde se realizó el experimento.

Tabla 12. Precipitación pluvial (pp) y temperaturas máxima (máx.) y mínima (mín.) mensuales durante el período mayo-diciembre de 1993-1995 en El Batán, CIMMYT, Edo. de México

Meses	1993			1994			1995		
	pp (mm)	Temperatura (°C)		pp (mm)	Temperatura (°C)		pp (mm)	Temperatura (°C)	
		Máx.	Mín.		Máx.	Mín.		Máx.	Mín.
1. Mayo	24.8	26.9	7.1	77.6	27.7	8.9	80.5	30.5	10.4
2. Junio	182	25.7	10.4	176.8	25.1	10.2	112.5	27.3	10.5
3. Julio	140	23.7	9.6	157.5	24.6	8.4	125.7	24.7	9.8
4. Agosto	118.8	24.6	9	243.6	23.8	10.1	150.0	23.9	11.2
5. Septiembre	146.4	23.3	9.9	106.1	23.4	8.6	87.7	24.7	9.4
6. Octubre	17	24.6	6	67.3	24.1	7.5	72.1	24.7	5.9
7. Noviembre	10.5	24.5	2.8	34	25.8	2.4	34.3	23.3	4.6
8. Diciembre	-	-	-	2.5	23.5	3.5	52.9	22.3	3.1

En 1994 hubo más precipitación que en 1993 y 1995 (Tabla 12); la mayor cantidad de lluvias ocurrió en el mes de agosto, que fue cuando se presentó la floración femenina en el cultivo experimental y se realizó la inoculación de los aislamientos monospóricos del hongo.

Es obvio que la presencia de días nublados frecuentes propiciaron lluvias abundantes, temperaturas de frescas a cálidas, humedad relativa alta y una mayor humedad en el suelo; estas condiciones climáticas tuvieron un efecto favorable en los procesos de invasión, colonización, reproducción y diseminación del hongo, durante las etapas fenológicas de floración de las plantas y el desarrollo y maduración del grano, durante el período de agosto a octubre de 1994, tanto en las plantas inoculadas con los 94 aislamientos monospóricos de *F. moniliforme*, como en las plantas testigo.

En la etapa de fructificación del cultivo, la precipitación mensual varió de 243.6 a 67.3 mm, y la temperatura, de 7.5 a 24.1°C, que son condiciones favorables para el desarrollo de las dos enfermedades, como lo consignan los resultados reportados por Navarrete (1986), quien observó que la mayor incidencia de **Germinación prematura** se presentó cuando la temperatura fluctuó entre 6-23 y 6-28°C, y concluyó que éste fue el factor climático que tuvo una mayor influencia en el desarrollo de esta enfermedad.

5.2.2 Experimento de campo 1995

Análisis de varianza. Los resultados de las variables medidas antes y después de la cosecha, se presentan en forma resumida en la Tabla 13; donde se puede notar, que hubo diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0.05$) en las variables **NGGP** y **DFP**, y altamente significativas en **PMG** y **PTG** ($P \leq 0.01$) por efecto del genotipo de maíz (GM).

La inoculación de los aislamientos del hongo (AH), provocó variaciones altamente significativas en el **%PM**, **NGGP**, **%MGP**, **PMG** y, significativas en el **PTG**. El efecto de la interacción genotipo de maíz-aislamiento de hongo (GM-AH) fue significativo sólo en los **DFM**.

Con base en los resultados estadísticos, se presenta la información de estas variables que fueron afectadas por los dos factores de estudio mencionados.

a. Porcentaje de pudrición de mazorca (%PM)

Los aislamientos del hongo tuvieron diferente capacidad para provocar pudrición de mazorca. Los más agresivos fueron los de Puebla (**64** y **12**), cuyos daños fueron superiores a 62%; en comparación con el testigo, donde la severidad fue de $\pm 46\%$ (Tabla 14).

La infección natural registrada en las mazorcas no inoculadas (en estado natural), de nuevo confirman la gran capacidad patogénica que tiene *F. moniliforme* en la naturaleza, la cual se incrementa cuando las condiciones ambientales propician un alto potencial de inóculo y una amplia diseminación del hongo en el cultivo. En las plantas testigo, los ápices de las mazorcas presentaron daños ligeros provocados por insectos barrenadores, los cuales pudieron haber contribuido al desarrollo de la infección.

b. Número de granos con germinación prematura (NGGP)

En todas las unidades experimentales (surcos) se encontraron granos, al menos uno por surco, con daños de **Germinación prematura**. No hubo interacción entre los factores de estudio genotipo de maíz (GM) y aislamiento del hongo (AH); es decir, sus efectos fueron independientes sobre esta variable de estudio (Tabla 13). Es decir, los genotipos presentaron una respuesta variable al ataque de esta enfermedad, y los aislamientos inoculados mostraron diferencias en su virulencia para ocasionar este tipo de daño.

Las mazorcas de los genotipos **3**, **6**, **12**, **13** y **17** produjeron más granos afectados por germinación (Apéndice 14); se nota que algunos de éstos (**12** y **13**) fueron de los materiales más precoces para iniciar floración femenina (**DFP**).

Tabla 13. Valores del cuadrado medio (CM) y probabilidad (P) obtenidos de los análisis de varianza de las variables evaluadas en el experimento de campo 1995

Fuentes de variación	G.L.	Variables de estudio								
		% PM	NGGP	% MGP	LM	PMG	PTG	NMC	DFM	DFE
Repetición	2	CM=1491.4 P=0.429	CM=1.0 P=0.801	CM=336.6 P=0.769	CM=0.95 P=0.91	CM=1108.6 P=0.595	CM=18524.6 P=0.4475	CM=8.7 P=0.459	CM=227.2 P=0.081	CM=62.84 P=0.597
Genotipo de maíz (GM)	17	CM=3042.2 P=0.077 _{ns}	CM=11.0 P=0.013*	CM=2258.6 P=0.076 _{ns}	CM=13.2 P=0.26 _{ns}	CM=6062.7 P=0.004**	CM=73286.2 P=0.002**	CM=15.9 P=0.171 _{ns}	CM=139.2 P=0.097 _{ns}	CM=272.9 P=0.020*
Error A	34	CM=1720.6	CM=4.5	CM=1272.6	CM=10.3	CM=2097.2	CM=22497	CM=10.9	CM=85.2	CM=120.0
Aislamiento del hongo (AH)	4	CM=4271.1 P=0.000**	CM=13.6 P=0.000**	CM=2918.5 P=0.000**	CM=0.3 P=0.80 _{ns}	CM=1935.9 P=0.000**	CM=7841.3 P=0.046*	CM=3.2 P=0.106 _{ns}	CM=1.5 P=0.223 _{ns}	CM=6.17 P=0.374 _{ns}
Interacción GM-AH	68	CM=216.7 P=0.235 _{ns}	CM=1.1 P=0.365 _{ns}	CM=321.3 P=0.728 _{ns}	CM=0.5 P=0.86 _{ns}	CM=293.4 P=0.307 _{ns}	CM=2806.7 P=0.704 _{ns}	CM=1.7 P=0.484 _{ns}	CM=2.3 P=0.00**	CM=5.31 P=0.646 _{ns}
Error B	144	CM=187.6	CM=153.68	CM=366.9	CM=0.64	CM=265.7	CM=3158.1	CM=1.65	CM=1.0	CM=5.77
Total	269	CM=639.5	CM=2.34	CM=627.2	CM=2.6	CM=901.6	CM=10129.3	CM=3.80	CM=23.7	CM=37.41

G.L. = Grados de libertad

***** = Significativo ($P \leq 0.05$)

****** = Altamente significativo ($P \leq 0.01$)

ns = No significativo

Variables: **%PM** = Porcentaje de pudrición de mazorca, **NGGP** = Número de granos con germinación prematura, transformado mediante Log. ($NGGP+1$), **%MGP** = Porcentaje de mazorcas con germinación prematura, **PMG** = Peso de mil granos, **PTG** = Peso total de granos, **NMC** = Número de mazorcas cosechadas, **LM** = Longitud de mazorca, **DFM** = Días a floración masculina, transformados mediante Box-Cox ($\lambda = -2.0$) y **DFE** = Días a floración femenina, transformados mediante Box-Cox ($\lambda = -0.6$).

Estos resultados indican que los genotipos más precoces fueron más afectados por la enfermedad y sugieren que durante las etapas de formación y maduración del grano en los maíces precoces, se presentaron las condiciones de precipitación y temperatura óptimas para la expresión de la **germinación prematura**, como ha sido observado en otros experimentos de campo realizados por Félix y Romero (1981), Ortíz-Cereceres (1983) y Navarrete (1986), en Tlaxcala, Puebla y Estado de México.

La enfermedad fue menos frecuente en los genotipos **1, 2 y 8**; en los demás presentó una incidencia intermedia (Apéndice 14). No obstante, estas diferencias no fueron significativas cuando se analizaron mediante la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$), quizás porque hubo gran variabilidad en la incidencia de la enfermedad dentro de los tratamientos, incluso con una mayor variación entre unidades experimentales o parcelas chicas donde se asignaron los aislamientos del hongo, que entre parcelas grandes donde se ubicaron los genotipos de maíz.

Es natural que diversos genotipos se comporten de manera distinta a la infección de *F. moniliforme*, cuando se cultivan bajo las mismas condiciones de clima y suelo; porque esta reacción diferencial puede estar determinada principalmente por la naturaleza genética de la planta (Ortíz-Cereceres, 1983). Sin embargo, cuando se han cultivado diversos híbridos, variedades y genotipos criollos de maíz, en localidades que difieren en tipo de suelo y clima, se ha observado que las condiciones ambientales influyen en el grado de susceptibilidad del cultivo a la **Germinación prematura** (Félix y Romero, 1981; Navarrete, 1986).

En relación a la patogenicidad de los aislamientos del hongo, en la Tabla 14 se puede confirmar que las mazorcas inoculadas con el aislamiento **P-64** produjeron la mayor cantidad de granos germinados (2.6); mientras que en aquellas infectadas por **C-591** se registró la menor incidencia de la enfermedad (1.3 granos), la cual afectó también a las plantas testigo, por efecto de la infección natural del hongo. Sin embargo, estas diferencias no fueron significativas al analizarlas mediante la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$); quizás por la variación que hubo en el número de granos cosechados en cada surco (parcela chica).

c. **Porcentaje de mazorcas con germinación prematura (%MGP)**

Los aislamientos monospóricos exhibieron variación en su capacidad para provocar esta enfermedad en las mazorcas inoculadas. El más virulento de los cuatro probados, fue el **P-64** que afectó a más del 36% de las mazorcas (Tabla 14). Las plantas testigo sufrieron una infección natural de $\pm 22\%$, la cual fue superior a las registradas en las plantas inoculadas con **P-44** (21.6%) y **C-591** (17%). Es evidente que el aislamiento **C-591** de CIMMYT fue el menos agresivo para reproducir los síntomas de **germinación prematura**; no obstante que en el Programa de Fitomejoramiento de Maíz desarrollado en esta Institución, esta cepa se ha utilizado para inocular y seleccionar genotipos de maíz resistentes a *F. moniliforme*, porque se ha comportado muy agresiva en ensayos realizados con anterioridad en campo (Jeffers, 1996); pero en este experimento y en el de 1994, siempre fue menos virulenta que algunos aislamientos monospóricos de CIMMYT, Puebla y Guerrero (Apéndices 7-11).

Tabla 14. Prueba de Tukey de los valores promedio de 5 variables evaluadas en los genotipos de maíz inoculados con cuatro aislamientos monospóricos de *F. moniliforme*, en el experimento de campo 1995

% PM		Log (NGGP+1)		% MGP		PMG		PTG	
AH	Media	AH	Media	AH	Media	AH	Media	AH	Media
P-64	69.9 a	P-64	2.55 a	P-64	36.6 a	T*	172.7 a	T*	211.3 a
P-12	62.7 ab	P-12	1.58 a	P-12	25.2 b	C-591	170.0 ab	C-591	206.2 a
P-44	58.9 b	T*	1.49 a	T*	22.3 b	P-44	165.8 abc	P-12	201.5 a
C-591	55.5 b	P-44	1.49 a	P-44	21.6 b	P-64	161.9 bc	P-44	188.8 a
T*	45.9 c	C-591	1.26 a	C-591	17.0 b	P-12	157.9 c	P-64	182.5 a

T* = Tratamiento testigo.

Nota: Las medias con las misma letra dentro de la columna son estadísticamente iguales (Tukey $P \leq 0.05$).

Variables: %PM = Porcentaje de infección de mazorca, NGGP = Número de granos con germinación prematura, %MGP = Porcentaje de mazorcas con germinación prematura, PMG = Peso de mil granos y PTG = Peso total de granos.

d. Peso de mil granos (PMG)

El tamaño del grano, en peso, es una característica del rendimiento de maíz que está sujeta a variación por efecto del genotipo, de las condiciones ambientales y la interacción genotipo-ambiente (Poey, 1972; Brauer, 1978).

Las diferencias en el peso de grano que muestran los valores promedios anotados en el Apéndice 14, se deben al efecto del genotipo; de los cuales, el número 13 produjo los granos con mayor peso (216 g), y superó con más de 65 g, el peso registrado en los materiales 2, 6, 10, 15 y 16. Los demás genotipos produjeron granos de tamaño intermedio.

De igual forma, el peso de mil granos fue afectado por la infección de *F. moniliforme*. Las plantas testigo produjeron los granos con mayor peso (Tabla 14), porque sufrieron los menores daños de **podrición de mazorca**; en forma comparativa, el peso de los granos fue menor en las mazorcas inoculadas con el aislamiento de Puebla P-12, porque fue más agresivo para causar esta enfermedad e inducir una disminución de 8.6% del peso del grano, en relación con las plantas testigo. El tratamiento P-44 se ubicó en una posición intermedia (Tabla 14).

e. Peso total de granos (PTG)

El rendimiento de grano es una característica cuantitativa cuya variabilidad está determinada por el genotipo y su interacción con el ambiente. Esta variación se manifestó en los 18 genotipos evaluados; de los cuales, el **13** tuvo el mayor potencial de rendimiento, pues produjo 4.5 veces más grano, que los genotipos **1** y **7** caracterizados como los menos productivos (Apéndice 14).

El rendimiento total también fue afectado por la infección del hongo; el más alto se obtuvo de las plantas no inoculadas (testigo); comparativamente, la producción fue más afectada en las plantas que fueron inoculadas con el aislamiento **P-64** (Tabla 14), cuyo rendimiento de grano fue 13.6% inferior al del testigo. Sin embargo, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas al analizarlas mediante la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$); quizás por la variación presentada dentro de las unidades experimentales (parcelas chicas) afectadas por el ataque de los aislamientos del hongo.

Las pérdidas en el rendimiento y el tamaño de grano, causadas por el ataque del hongo, son importantes, si se toma en cuenta que en algunas regiones agrícolas de Puebla, se han reportado disminuciones de 25 a 35% del rendimiento de grano, en los cultivos atacados por **Germinación prematura** (Márquez, 1985). Sin embargo, en este ensayo se esperaba que la infección de *F. moniliforme* debería haber afectado en forma más drástica el desarrollo y la maduración de los granos; sobre todo si se considera que el hongo se inoculó en una etapa muy temprana de fructificación del cultivo. A pesar de ello, los resultados obtenidos demuestran que, más que el peso, se afectó la calidad, pues los granos enfermos presentaron manchas, epicarpio dividido, tamaño menor, embrión germinado y desarrollo incompleto.

f. Días a floración masculina (DFM) y a floración femenina (DFF)

Los genotipos exhibieron variación en su capacidad para iniciar floración masculina. En la Tabla 13 se puede notar que se manifestó un efecto significativo de la interacción genotipo de maíz-aislamiento del hongo (GM-AH). Sin embargo, esta respuesta no se considera de importancia, porque los aislamientos monospóricos del hongo, se inocularon después de la floración de las plantas experimentales y, por lo tanto, no tuvieron un efecto directo en el desarrollo de esta etapa fenológica del cultivo.

Por otro lado, los genotipos presentaron floración femenina en diferentes fechas; esto significa, que cada uno de ellos tuvo un ciclo vegetativo diferente, antes de la floración. Los más precoces fueron el **13** y **14** y estuvieron entre los que se inocularon primero, porque fueron de los primeros que florecieron. Asimismo, fueron los que presentaron los mayores rendimientos, en cantidad (**PTG**) y tamaño de grano (**PMG**). En forma comparativa, es notable que los genotipos **1** y **7** fueron los más tardíos, los menos productivos y los últimos que se inocularon (cuarta fecha de floración). Los demás materiales fueron de ciclo intermedio, y se inocularon en la segunda y tercera fechas de floración.

g. **Análisis de correlación**

En la Tabla 15 se puede verificar el grado de asociación que presentaron el **%IM**, **NGGP** y **%MGP** con las demás variables de estudio. Es evidente que el porcentaje de pudrición de mazorca se correlacionó de manera positiva y altamente significativa ($P \leq 0.01$) con el **NGGP** ($r = 0.462^{**}$), **%MGP** ($r = 0.498^{**}$), **DFM** ($r = 0.395^{**}$) y **DFM** ($r = 0.494^{**}$), y en forma negativa con **PMG** ($r = -0.587^{**}$).

Tabla 15. Análisis de correlación (valores de r) de las variables evaluadas en el experimento de campo 1995

Variables	NGGP	%MGP	LM	PMG	PTG	NMC	DFM	DFD
%PM	0.462**	0.498**	-0.140 _{ns}	-0.587**	-0.219 _{ns}	0.172 _{ns}	0.494**	0.395**
NGGP		0.779**	0.021 _{ns}	-0.004 _{ns}	0.199 _{ns}	0.330 _{ns}	-0.119 _{ns}	-0.178 _{ns}
%MGP			0.094 _{ns}	0.063 _{ns}	0.350 _{ns}	0.486**	-0.093 _{ns}	-0.227 _{ns}

- * = Significativo ($P \leq 0.05$)
 ** = Altamente significativo ($P \leq 0.01$)
ns = No significativo

Variables: **%PM** = Porcentaje de pudrición de mazorca, **NGGP** = Número de granos con germinación prematura, **%MGP** = Porcentaje de mazorcas con germinación prematura, **LM** = Longitud de mazorca, **PMG** = Peso de mil granos, **PTG** = Peso total de granos, **NMC** = Número de mazorcas cosechadas, **DFM** = Días a floración masculina y **DFD** = Días a floración femenina

Con estos resultados se corrobora por tercera vez que, a medida que se incrementó la severidad de la infección y pudrición de la mazorca, se manifestó una tendencia a aumentar la frecuencia de granos y mazorcas con síntomas de germinación prematura; es decir, que los síntomas de las 2 enfermedades tienen una estrecha relación entre sí, porque son provocados por el mismo agente fitopatógeno en el substrato donde éste está creciendo y multiplicándose.

Asimismo, el **%PM** tuvo correlación negativa y altamente significativa con el **PMG** ($r = -0.587^{**}$); esto significa que el tamaño del grano, exhibió una tendencia a disminuir conforme aumentó el tejido podrido de la mazorca. En esta variable se manifiesta el daño económico que provoca el ataque de este hongo.

Los genotipos que tardaron más en florecer tendieron a producir mazorcas más afectadas como lo muestra la correlación positiva que tuvo el **%PM** con los **DFM** ($r = 0.494^{**}$) y **DFD** ($r = 0.395^{**}$). Esta asociación se explica porque la floración de estos materiales ocurrió cuando en el lote experimental se presentaron condiciones ambientales favorables para la infección, colonización y reproducción del hongo, tanto en las plantas testigo, como en las inoculadas.

5.3 Análisis químico de micotoxinas en maíz

Los resultados de los análisis de varianza aplicados a las concentraciones de las micotoxinas zearalenona (**ZEA**), toxina **T-2** y diacetoxiscirpenol (**DAS**) encontradas en las muestras de maíz de los dos experimentos de campo (Tablas 17, 20), indican que los tratamientos de estudio no influyeron en el comportamiento de esta variable. Por esta razón, para cada micotoxina, el análisis se hizo con base en los valores numéricos obtenidos.

5.3.1 Aislamiento y cuantificación de zearalenona (ZEA)

a. Experimento de campo 1994

Se analizan los resultados obtenidos mediante las técnicas **TLC** y **HPLC**, de esta micotoxina detectada en las muestras de los genotipos 1 y 2 de maíz.

En la Figura 18 se presenta una placa con algunas muestras y el estándar de **ZEA**, después de haberlas analizado mediante **TLC**. De las 78 muestras estudiadas sólo 62 (79.5 %) presentaron signos de contaminación por esta micotoxina, con un valor promedio de R_f de 0.73, muy aproximado al de 0.75 registrado en el estándar (Apéndice 15).

En la Tabla 16 se reporta la información que se utilizó para elaborar la gráfica que se ilustra en la Figura 20.

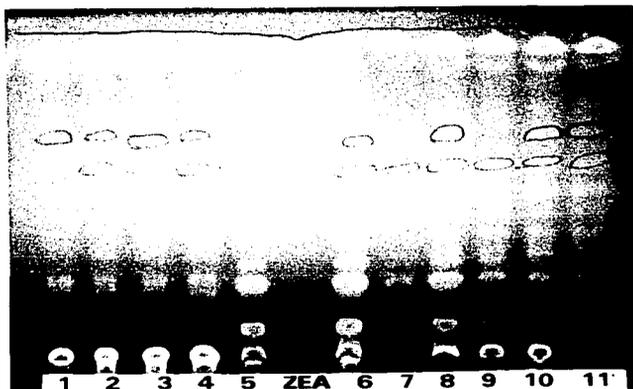
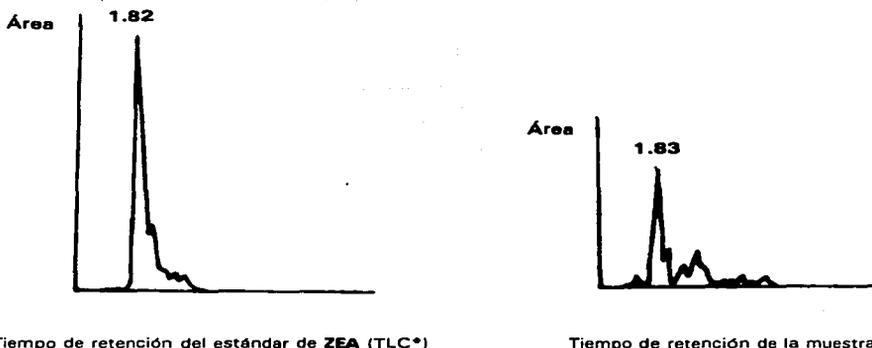


Figura 18. Cromatografía de placa fina (TLC) de muestras y estándar de **ZEA**

El coeficiente de correlación ($r = 0.9941677$) demuestra la estrecha relación presentada entre la concentración del estándar de **ZEA** y el área del cromatograma. En el análisis de las muestras por **HPLC** se obtuvieron cromatogramas como los que se presenta en la Figura 19, donde se puede notar que los tiempos de retardación (T_r) en el estándar y en la muestra fueron de 1.82 y 1.83, respectivamente.



* El estándar se analizó previamente junto con la muestra, mediante TLC.

Figura 19. Cromatogramas del estándar de ZEA y de la muestra 40

Se detectaron niveles variables de ZEA en las muestras (Apéndice 15); la máxima concentración fue de $2\,039.474\ \mu\text{g}/\text{kg}$ y se obtuvo en la repetición I del tratamiento **P-44**; mientras que la mínima cantidad fue de $11.996\ \mu\text{g}/\text{kg}$ y se detectó en la repetición II del tratamiento **P-64**, en el genotipo 1. Los valores obtenidos en el genotipo 2 fluctuaron de 16.258 a $1\,990.488\ \mu\text{g}/\text{kg}$ y se ubican dentro del intervalo indicado para el genotipo 1. A pesar de esta amplia variación, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas en la cantidad de ZEA producida en las plantas testigo y las inoculadas con los 4 aislamientos, en los 2 genotipos (Tabla 17).

El efecto de los tratamientos sobre la concentración de ZEA no se manifestó en forma clara, quizás porque dentro de estos, hubo variaciones muy marcadas, como se puede verificar en el Apéndice 15, donde en el tratamiento **P-44** del genotipo 1, la repetición II tuvo 0 y la I, más de $2\,000\ \mu\text{g}/\text{kg}$ del compuesto. Además de esta variabilidad, es importante considerar que se analizó sólo el 13% de las 600 muestras. No fue posible aumentar el tamaño de la muestra porque el análisis químico es costoso.

En el genotipo 1 el índice más alto de ZEA se detectó en las muestras del aislamiento **P-34** (Tabla 18), que también resultó el más virulento para provocar **Pudrición de mazorca** (Apéndice 7); comparativamente, la cantidad más baja del compuesto se obtuvo en las muestras del aislamiento **C-269**, que fue de los menos agresivos para ocasionar **Germinación prematura** (Apéndice 8). Estos resultados dan una idea, de que el grado de virulencia tiende a asociarse en forma positiva con la mayor o menor toxigenicidad de *F. moniliforme*; sin embargo, estos dos eventos no mostraron una relación significativa cuando se sometieron al análisis de correlación (Tabla 19); que tampoco estableció asociaciones entre ZEA y las micotoxinas **T-2** y **DAS**.

Tabla 16. Áreas del cromatograma y valores de la ecuación de la recta de regresión utilizados para graficar la curva de calibración de ZEA

Nº	Concentraciones del estándar de ZEA (mg/kg) (X)	Áreas del cromatograma (Y)
1.	1	653 692 *
2.	2	1 566 093.7
3.	3	2 139 956.7
4.	4	2 641 145.3
5.	5	3 536 376.7

Ecuación de la recta de regresión: $Y = 55326.5 + 684042.1 X$
 Coeficiente de correlación: $r = 0.9941677$

* = Media de 3 repeticiones

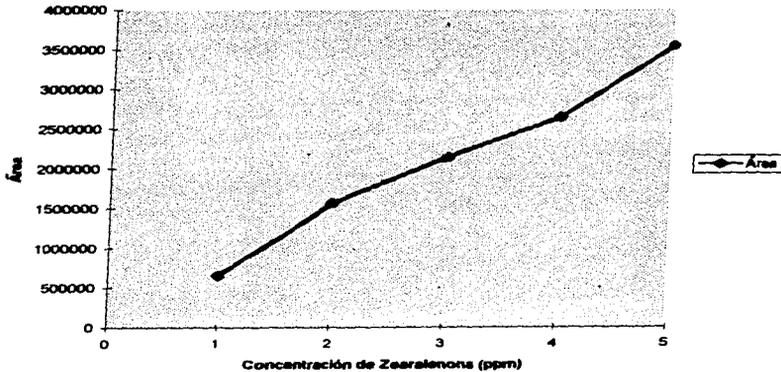


Figura 20. Curva de calibración para la cuantificación de zearalenona

Tabla 17. Valores del cuadrado medio (CM) y probabilidad (P) de los análisis de varianza de la concentración de las micotoxinas zearalenona (ZEA), toxina T-2 y diacetoxiscirpenol (DAS) en los genotipos 1 y 2 de maíz del experimento de campo 1994

Genotipo 1

Fuentes de variación	G.L.	ZEA		T-2	
		CM	P	CM	P
Repetición	2	737816.3	0.3282	28423.3	0.5663
Bloque dentro de repetición	22	234408.5	0.7629	25965.5	0.7391
Tratamiento	12	158742.2	0.8542 ns	39135.07	0.5853 ns
Error	2	360415		37106.4	
Total	38	254167		24456.3	

Genotipo 2*

Fuente de variación	G.L.	ZEA		T-2		DAS	
		CM	P	CM	P	CM	P
Repetición	2	161961.9	0.3297	39879	0.7921	109893.3	0.0623
Tratamiento	12	243661.9	0.1179 ns	143915.9	0.6037 ns	23125.6	0.7733 ns
Error	24	139342		169447		35181.0	
Total	38	4736.2		154564.9		35306.2	

* = La selección de parcelas para determinación en los bloques incompletos, provocó que no fuera estimable el efecto de bloques, por lo que el análisis de varianza se hizo ignorando estos.

G.L. = Grados de libertad

ns = No significativo ($P \leq 0.05$)

Nota. No se detectó **DAS** en ninguna muestra del genotipo 1

El efecto de los tratamientos sobre la concentración de **ZEA** no se manifestó en forma clara, quizás porque dentro de estos, hubo variaciones muy marcadas, como se puede verificar en el Apéndice 15, donde en el tratamiento **P-44** del genotipo 1, la repetición II tuvo 0 y la I, más de 2 000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ del compuesto. Además de esta variabilidad, es importante considerar que se analizó sólo el 13% de las 600 muestras. No fue posible aumentar el tamaño de la muestra porque el análisis químico es costoso.

En el genotipo 1 el índice más alto de **ZEA** se detectó en las muestras del aislamiento **P-34** (Tabla 18), que también resultó el más virulento para provocar **Pudrición de mazorca** (Apéndice 7); comparativamente, la cantidad más baja del compuesto se obtuvo en las muestras del aislamiento **C-269**, que fue de los menos agresivos para ocasionar **Germinación prematura** (Apéndice 8).

Tabla 18. Concentraciones de **ZEA**, **T-2** y **DAS** ($\mu\text{g}/\text{kg}$) en los genotipos 1 y 2 de maíz del experimento de campo 1994

Tratamientos	Genotipo 1			Genotipo 2		
	ZEA	T-2	DAS	ZEA	T-2	DAS
T1-P*	641.401	45.156	0	350.226	811.843	202.986
T2-P*	580.737	119.520	0	955.336	54.893	139.881
T3-P*	372.024	0	0	609.092	0	241.852
T4-N**	619.035	84.886	0	529.999	0	0
T5-N**	729.268	48.422	0	0	0	184.977
T6-N**	525.832	52.019	0	168.331	0	63.666
P-3	430.457	141.144	0	79.817	0	210.127
P-34	876.055	117.713	0	180.957	131.726	0
P-44	743.040	338.742	0	266.187	131.162	36.449
P-64	596.428	28.578	0	504.599	113.53	0
C-269	364.745	58.467	0	0	270.59	51.069
C-591	674.338	0	0	27.539	106.745	44.59
C-634	405.083	111.271	0	168.578	115.978	106.091
Media	581.419	88.176	0	295.443	133.574	98.591

* = Tratamientos testigo con herida en el elote T (1, 2 y 3)-P

** = Tratamientos testigo sin herida en el elote T (4, 5 y 6)-N

Nota: Cada valor es la media de 3 repeticiones

Estos resultados dan una idea, de que el grado de virulencia tiende a asociarse en forma positiva con la mayor o menor toxigenicidad de *F. moniliforme*; sin embargo, estos dos eventos no mostraron una relación significativa cuando se sometieron al análisis de correlación (Tabla 19); que tampoco estableció asociaciones entre ZEA y las micotoxinas T-2 y DAS.

En el genotipo 2 los niveles más altos de ZEA se encontraron en las muestras de los testigos (T 2 y 3-P) que, a pesar de que no se inocularon, sufrieron una infección natural importante (Apéndice 9) propiciada por la herida causada con el punzón. De las siete cepas inoculadas, la C-591 y P-3 fueron las menos tóxicas; esta última fue la menos agresiva para causar pudrición de mazorca (Apéndice 9). Esto indica una cierta relación entre la agresividad ligera del hongo y su menor capacidad para sintetizar esta toxina en el sustrato contaminado. Aunque esta asociación no fue significativa, al realizar el análisis de correlación (Tabla 19). No obstante, la concentración de ZEA mostró una asociación positiva y significativa ($P \leq 0.05$) con la longitud de mazorca; esto indica que a mayor tamaño de la mazorca, existe más tejido vegetal susceptible de ser colonizado por el hongo y utilizado como sustrato para producir este metabolito.

Tabla 19. Análisis de correlación (valores de r) de la concentración de las micotoxinas zearealenona (ZEA), toxina T-2 y diacetoxiscirpenol (DAS), con las demás variables evaluadas en los genotipos 1 y 2 del experimento de campo 1994

Variables	Genotipo 1		Genotipo 2		
	ZEA	T-2	ZEA	T-2	DAS
%PM	-0.1280ns	-0.0273ns	0.1825ns	0.2392 *	0.0161
NGGP	0.1283ns	-0.0924ns	0.1538ns	0.0463	-0.0961
%MGP	-0.1101ns	-0.1979ns	0.0417ns	0.0158	0.0133
LM	-0.2217ns	0.0982ns	0.2948 *	-0.1764	-0.0403
PMG	0.0670ns	-0.1571ns	-0.0864ns	-0.0454	0.0350
PTG	0.0430ns	0.1672ns	0.1768ns	-0.0274	-0.1048
NMC	-0.0053ns	-0.0446ns	0.0489ns	0.0656	-0.1653
ZEA		0.2423*			

* = Significativo ($P \leq 0.05$)

ns = No significativo

Los valores promedios de la Tabla 18 muestran que *F. moniliforme* fue capaz de producir casi el doble de ZEA (581.419 µg/kg) en el genotipo 1 que en el 2 (295.443 µg/kg); no obstante, que en este último fueron más severos los daños de **Pudrición de mazorca** y **Germinación prematura**, como se puede constatar en la Tabla 11. Asimismo, estos resultados confirman que este hongo fitopatógeno es capaz de producir ZEA en condiciones naturales; y sugieren que la ZEA puede estar como contaminante en las cosechas de maíz, que se destinan al mercado para la alimentación humana y de los animales. Pero esta toxina no está relacionada con los síntomas de las 2 enfermedades.

b. Experimento de campo 1995

Se detectó la presencia de ZEA en 31 (68.9%) de las 45 muestras de maíz analizadas. Se determinó un valor promedio de Rf de 0.72, que es igual al obtenido en el estándar (Apéndice 16). Las concentraciones variaron en un intervalo de 19.05 a 386.489 µg/kg. Los factores: genotipo de maíz (GM) y aislamiento del hongo (AH) no influyeron en la cantidad de micotoxina contenida en los granos; como lo demuestra el análisis de varianza de la Tabla 20.

Tabla 20. Valores del cuadrado medio (CM) y de probabilidad (P) de la concentración de las micotoxinas zearalenona (ZEA), toxina T-2 y diacetoxiscirpenol (DAS), en el experimento de campo 1995

F. V.	G.L.	ZEA		T-2		DAS	
		CM	P	CM	P	CM	P
Repetición	2	51054.0	0.330	4533.8	0.842	1225.8	0.930
Genotipo de maíz (GM)	2	6172.9	0.842ns	5091.1	0.825ns	3426.1	0.821ns
Error A	4	34440.5		25261.6		16501.7	
Aislamiento del hongo (AH)	4	14648.3	0.115ns	4138.4	0.722ns	12333	0.390ns
Interacción GM-AH	8	4083.3	0.785ns	6120.3	0.633ns	9483.8	0.586ns
Error B	24	7053.8		7955.9		11450.7	
Total	44	11653.8		8562.6		10803	

F.V. = Fuentes de variación

G.L. = Grados de libertad

ns = No significativo ($P \leq 0.05$)

Nota: El **DAS** no se detectó en ninguna muestra del genotipo 1

Los valores promedios de la Tabla 21 permiten confirmar que hubo poca variación en la cantidad de **ZEA** producida en los tres genotipos, de los cuales, el número 2 fue el más afectado. Por otro lado, se encontró que en las plantas testigo, que sufrieron infección natural (Tabla 14), tuvieron mayores niveles del compuesto (105.386 $\mu\text{g}/\text{kg}$), que todas las que se inocularon con los aislamientos monospóricos de *F. moniliforme*; lo que demuestra la capacidad que tiene este hongo para infectar al maíz y contaminarlo con micotoxinas, en condiciones naturales de cultivo. De los 4 aislamientos, el **P-44** fue el más toxígeno; el aislamiento **C-591** mostró una virulencia intermedia (Tabla 14).

Tabla 21. Concentraciones de **ZEA** ($\mu\text{g}/\text{kg}$) en 3 genotipos de maíz inoculados con aislamientos monospóricos de *F. moniliforme*, en el experimento de campo 1995

Genotipo de maíz	Aislamiento del hongo					Media
	Testigo	C-591	P-12	P-44	P-64	
2	98.576	128.83	39.213	99.486	23.695	77.96
3	116.515	0	0	121.327	0	47.569
13	101.066	32.751	0	32.423	31.192	39.487
Media	105.386	53.86	13.071	84.412	18.296	

La producción de **ZEA** no se correlacionó con las demás variables de estudio (Tabla 22). De esto se puede inferir que esta toxina no está directamente involucrada en los daños de **Pudrición de mazorca** y **Germinación prematura** provocados por *F. moniliforme*.

Los resultados de este estudio, indican que la capacidad toxígena de *F. moniliforme* para producir **ZEA**, es una característica que no es controlada en forma considerable por el genotipo o la variedad de maíz, sino que tiende a asociarse con el grado de patogenicidad del hongo.

En el experimento de 1994 el hongo produjo niveles más altos del compuesto (11.996 a 2 039.474 $\mu\text{g}/\text{kg}$), que en el ensayo de 1995 (19.05 a 386.489 $\mu\text{g}/\text{kg}$); sin embargo, estas cantidades de **ZEA** se estiman moderadas, considerando que este hongo está ubicado dentro de las especies de *Fusarium*, que no tienen gran capacidad para producir este compuesto químico (Marasas *et al.*, 1984).

Tabla 22. Análisis de correlación (valores de r) de la concentración de las micotoxinas zearalenona (ZEA), toxina T-2 y diacetoxiacirpenol (DAS), con las demás variables evaluadas en el experimento de campo 1995

Variable	ZEA	Toxina T-2	DAS
1. % PM	-0.0030	0.2853 *	0.0817
2. NGGP	-0.0504	0.0971	-0.0311
3. % MGP	-0.0185	0.2443	-0.0487
4. LM	0.2163	0.0879	-0.0007
5. PMG	-0.0686	-0.0277	-0.0673
6. PTG	0.1191	0.1524	-0.0268
7. NMC	0.034	0.1476	-0.0704
8. DFM	-0.1261	-0.0381	0.0965
9. DFF	0.1235	-0.0452	-0.0194
10. ZEA		0.3631 *	-0.1998
11. T-2			0.0939

* = Significativo ($P \leq 0.05$)

Variables: %PM = Porcentaje de pudrición de mazorca, NGGP = Número de granos con germinación, %MGP = Porcentaje de mazorcas con germinación prematura, LM = Longitud de mazorca, PMG = Peso de mil granos, PTG = Peso total de granos, NMC = Número de mazorcas cosechadas, DFM = Días a floración masculina y DFF = Días a floración femenina

En condiciones favorables, una cepa toxígena puede llegar a producir cantidades mínimas del orden de 1 a 19 mg/kg, equivalentes a 1 000-19 000 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ (Mirocha *et al.*, 1977), que están muy por encima de las detectadas en las muestras de maíz de los ensayos de 1994 y 1995. No obstante, se debe tomar en cuenta que esta micotoxina es fisiológicamente activa en cantidades inferiores a los 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$; como se ha observado recientemente en Mérida, Yucatán donde los cerdos alimentados con maíz contaminado con ZEA y otras fusariotoxinas, presentan efectos patológicos muy graves, principalmente protusión vaginal en hembras y orquitis pronunciada en machos (Carvajal, 1997). Estas experiencias sugieren que el alimento para porcinos debe de contener cantidades permisibles, inferiores a 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$, tomando en cuenta que estos son de los mamíferos más susceptibles a este compuesto y a que se ingiere el alimento durante 4 meses.

5.3.2 Aislamiento y cuantificación de la toxina T-2

a. Experimento de campo 1994

En la placa de gel de sílice presentada en la Figura 21 se pueden apreciar las distancias recorridas tanto por el estándar de T-2, como por los compuestos contenidos en las muestras contaminadas, que fueron sólo 25 (44%) de las 78 analizadas, en los dos genotipos. En las muestras se registró un Rf promedio de 0.19, cercano al valor de 0.18, obtenido en el estándar (Apéndice 17). En la Tabla 23 se anotan los datos utilizados para graficar la curva de calibración ilustrada en la Figura 23,

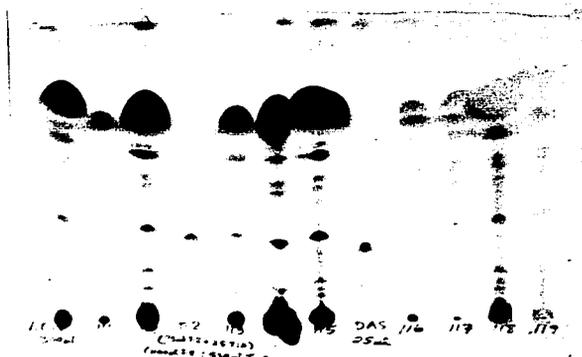
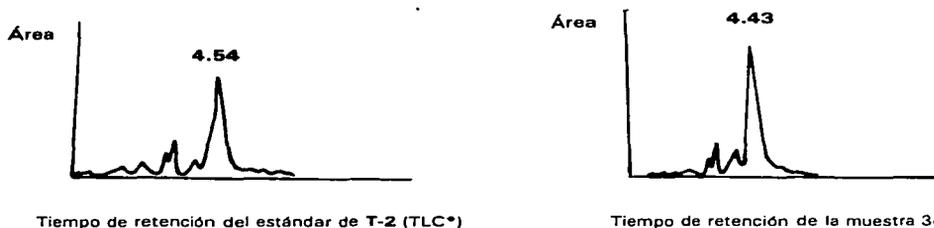


Figura 21. Cromatografía de placa fina (TLC) de muestras y estándares de T-2 y DAS

donde se puede notar que el valor de $r = 0.99594651$, indica que hubo una correlación estrecha y positiva entre la concentración de T-2 y el área del cromatograma. Se registraron tiempos de retención (Tr) de 4.54 en el cromatograma del estándar, y de 4.43 en el de la muestra 34 (Figura 22).



Tiempo de retención del estándar de T-2 (TLC*)

Tiempo de retención de la muestra 34

* El estándar se analizó previamente junto con la muestra, mediante TLC

Figura 22. Cromatogramas del estándar de T-2 y de la muestra 34

Tabla 23. Áreas del cromatograma y valores de la ecuación de la recta de regresión utilizados para graficar la curva de calibración de T-2.

Nº	Concentraciones del estándar de T-2 (mg/kg) (X)	Áreas del cromatograma (Y)
1.	0.2	1 413 669*
2.	0.4	2 645 697
3.	0.6	4 757 307
4.	0.8	6 403 267
5.	1.0	8 663 668

Ecuación de la recta de regresión: $Y = - 700\ 548.8 + 9\ 128\ 784\ X$
 Coeficiente de correlación: $r = 0.99594651$

* = Media de 3 repeticiones

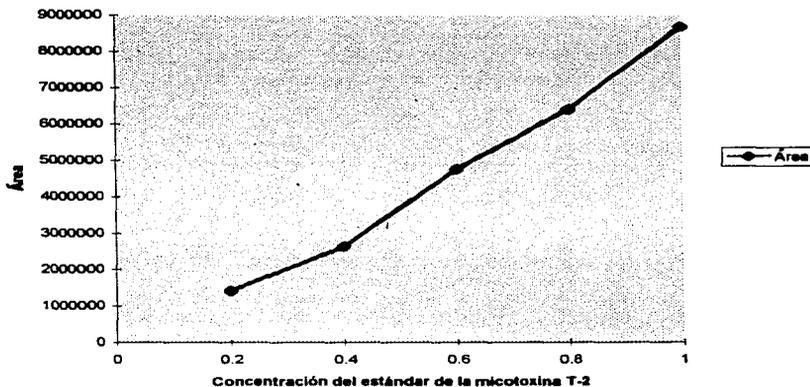


Figura 23. Curva de calibración para la cuantificación de toxina T-2

Los niveles de **T-2** variaron desde 85.735 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (repetición I de **P-64**) hasta 2 399.222 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (repetición II de **T 1-P**), como se puede constatar en el Apéndice 17. Sin embargo, estas diferencias entre las plantas inoculadas y las testigo, no fueron estadísticamente significativas, como lo demuestran los resultados del análisis de varianza de la Tabla 17.

En el genotipo 1, la mayor cantidad de **T-2** fue producida en las muestras del aislamiento **P-44** (Tabla 18), que mostró una agresividad intermedia para causar pudrición de mazorca (Apéndice 7); mientras que en los tratamientos **T 3-P** y **C-591** no se detectó este compuesto. En los demás testigos, que no se inocularon pero presentaron infección natural (Apéndice 7), se encontraron niveles variables, de 45.156 a 119.52 $\mu\text{g}/\text{kg}$. En este genotipo, la cantidad de **T-2** se asoció en forma positiva y significativa ($P \leq 0.05$) con la concentración de **ZEA** ($r = 0.2423^*$); lo que sugiere que *F. moniliforme* es capaz de producir estos dos metabolitos en forma simultánea cuando se desarrolla en el mismo tejido vegetal infectado.

En el genotipo 2, las muestras del testigo **T 1-P** estuvieron más contaminadas que los demás tratamientos (Tabla 18); no obstante que este tratamiento no fue inoculado y sólo sufrió la infección natural del hongo (Apéndice 9). Después del testigo, los mayores índices de contaminación se encontraron en las muestras de los aislamientos **C-269**, **P-34** y **P-44**. En estos dos últimos, se registraron daños severos de pudrición y germinación prematura (Apéndices 9, 10 y 11); de esta forma, la toxina **T-2** manifestó una tendencia a una mayor concentración en las mazorcas más afectadas por estas dos enfermedades. En este genotipo se encontró que la concentración de **T-2** se correlacionó en forma positiva y significativa ($P \leq 0.05$) con los daños de **Pudrición de la mazorca** ($r = 0.2392^*$), pero no con los de **Germinación prematura** (Tabla 19); de donde se infiere que este compuesto está involucrado en la capacidad que tiene el hongo para causar la pudrición del tejido, pues al incrementarse la severidad de la enfermedad, aumenta el contenido de la toxina **T-2** en el tejido afectado.

Con estos resultados se confirma la importancia que tiene la toxina **T-2** en la patogénesis de la **Pudrición de la mazorca** en el cultivo de maíz; pues con anterioridad se ha señalado que compuestos de este tipo, actúan como fitotoxinas no específicas de hospedantes y son capaces de producir diversos síntomas como clorosis, necrosis y otros, cuando se aplican a bajas concentraciones (Snijders, 1988; Desjardins, 1992).

El hongo produjo **T-2** en los dos genotipos de maíz, pero en el genotipo 1, los niveles fueron ligeramente menores (88.176 $\mu\text{g}/\text{kg}$) que en el 2 (133.574 $\mu\text{g}/\text{kg}$) y es probable que esto explique el comportamiento que tuvo el desarrollo de la enfermedad **Pudrición de la mazorca**, que fue más severa en el genotipo 2 que en el genotipo 1, como se puede constatar al analizar las medias generales de cada uno de ellos, que se presentan en la Tabla 18.

b. Experimento de campo 1995

Se encontró **T-2** en 33 (73.3%) de las 45 muestras evaluadas. El **Rf** fue de 0.33 y en el estándar, de 0.30 (Apéndice 18).

En el Apéndice 18 se observa que la concentración del compuesto varió de 157.217 a 278.767 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Sin embargo, esta variación no fue producida por el efecto de los factores de estudio (genotipo de maíz y aislamiento del hongo) ni por la interacción entre ellos; pues en ningún caso, los efectos fueron significativos desde el punto de vista estadístico (Tabla 20).

Al analizar las medias de la Tabla 24, se nota que el genotipo 3 permitió una mayor producción de este metabolito, que los cultivos 2 y 13, donde se registraron niveles cercanos de T-2. Por otra parte, el aislamiento P-64 destacó de los demás por su mayor capacidad para producir este compuesto.

Tabla 24. Concentraciones de T-2 ($\mu\text{g}/\text{kg}$) en 3 genotipos de maíz inoculados con aislamientos monospóricos de *F. moniliforme*, en el experimento de campo 1995

Genotipos de maíz	Aislamientos del hongo					Medias
	Testigo	C-591	P-12	P-44	P-64	
2	53.663	62.311	0	65.43	111.919	58.665
3	85.734	110.494	121.34	150.564	0	93.627
13	53.677	56.722	53.847	109.391	56.728	66.073
Medias	64.358	76.509	58.396	108.462	56.216	

Es importante recordar que el aislamiento monospórico P-64 fue el más agresivo para provocar daños severos de las enfermedades **Pudrición de la mazorca** (69.94 %PM) y **Germinación prematura** (36.27 % MGP), y consecuentemente, fue el que más afectó el rendimiento de grano (Tabla 14). Por ello, este tipo de asociación positiva entre la producción de T-2 y la patogenicidad del hongo, resultaron significativas en el análisis de correlación efectuado (Tabla 22); de tal forma que se produce más toxina a medida que existe una mayor cantidad de sustrato colonizado por el hongo. Asimismo, se confirmó por segunda ocasión, que la producción de T-2 se asoció en forma positiva y significativa con la concentración de ZEA ($r=0.3631^*$), como se indicó en el genotipo 1 del ensayo de 1994; lo que significa que estos dos metabolitos son producidos por el hongo en forma simultánea por *F. moniliforme*.

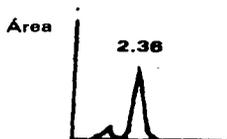
Este hongo produjo T-2 en cantidades variables en los genotipos 1, 2 (experimento 1994), 2, 3 y 13 (experimento 1995). En el ciclo de 1994 produjo cantidades superiores (85.735 a 2 399.222 $\mu\text{g}/\text{kg}$) en comparación con el de 1995 (157.217 a 278.767 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Estas cantidades son importantes, porque la T-2 provoca efectos patológicos a concentraciones inferiores, como lo demuestran los datos reportados con anterioridad por diversos investigadores.

5.3.3 Aislamiento y cuantificación de diacetoxiscirpenol (DAS)

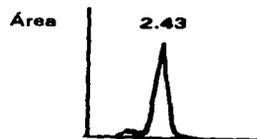
a. Experimento de campo 1994

Es notable que este compuesto no se detectó en ninguna muestra del genotipo 1; en cambio, estuvo presente en 16 (41%) de las 39 muestras del genotipo 2, cuyos valores de R_f promediaron 0.14, igual que la media del estándar de **DAS** (Apéndice 19) utilizado como referencia (Figura 21).

En la Tabla 25 se encuentran los datos que se utilizaron, tanto para elaborar la gráfica ilustrada en la Figura 25, como para calcular las concentraciones de la micotoxina, que se anotan en el Apéndice 19. Los tiempos de retención (T_r) en los cromatogramas del estándar y de la muestra 85, fueron de 2.36 y 2.43 (Figura 24).



Tiempo de retención del estándar de **DAS** (TLC*)



Tiempo de retención de la muestra 85

* El estándar se analizó previamente junto con la muestra, mediante TLC.

Figura 24. Cromatogramas del estándar de **DAS** y de la muestra 85

En el genotipo 2 de maíz, este compuesto presentó una variación entre 52.114 y 673.443 $\mu\text{g}/\text{kg}$, la cual no fue afectada de manera estadísticamente significativa por los tratamientos aplicados (Tabla 17).

Los valores promedio de la Tabla 18 indican que los niveles más altos del compuesto se encontraron en granos de maíz producidos por plantas que no fueron inoculadas (**T 3-P**), pero que sufrieron síntomas severos de pudrición y germinación prematura (Apéndices 9-11) por la infección natural de *F. moniliforme*. De los 7 aislamientos inoculados en el genotipo 2, resultaron más toxígenos el **P-3** y el **C-634**; los cuales se clasificaron como los menos virulentos para provocar daños de pudrición de mazorca (Apéndice 9). Sin embargo, esta tendencia de asociación entre la menor patogenicidad del hongo y su mayor capacidad para producir **DAS** no resultó significativa en el análisis de correlación presentado en la Tabla 22.

Es notable la reacción de resistencia a la producción de **DAS** manifestada por el genotipo 1; sin embargo, ésta no es de utilidad, porque este material no es resistente a la infección del hongo, como se muestra en la Tabla 11. Lo más deseable hubiera sido encontrar resistencia tanto a la pudrición como a la producción de esta micotoxina.

Tabla 25. Áreas del cromatograma y valores de la ecuación de la recta de regresión utilizados para graficar la curva de calibración de DAS

Nº	Concentraciones del estándar de DAS ($\mu\text{g}/\text{kg}$) (X)	Áreas del cromatograma (Y)
1.	21.8	259 075*
2.	43.6	264 427
3.	65.5	338 601
4.	87.3	403 623
5.	109.1	580 184

Ecuación de la recta de regresión: $Y = 150\,746.6 + 3\,215 X$
 Coeficiente de correlación: $r = 0.95327385$

* = Media de 3 repeticiones.

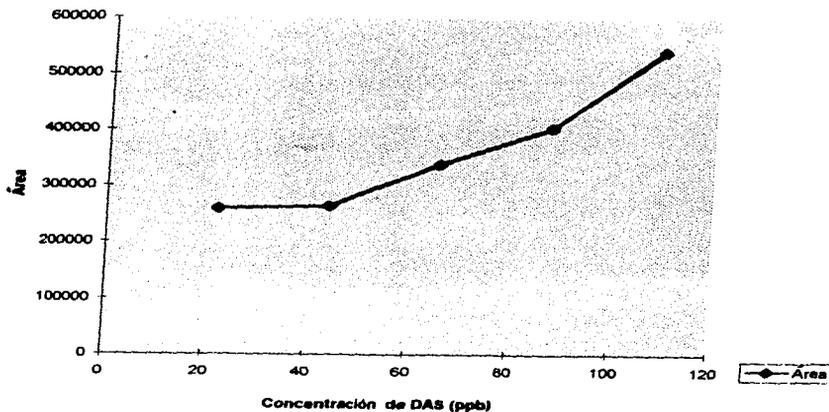


Figura 25. Curva de calibración para la cuantificación de diacetoxiscirpenol

Estas evidencias permiten inferir que el **DAS** probablemente no tiene relación con los efectos patológicos que provoca *F. moniliforme* en la planta de maíz enferma.

b. Experimento de campo 1995

Se detectó **DAS** en 33 (73.3%) de las 45 muestras evaluadas. Se determinó un **Rf** de 0.25 tanto en las muestras como en el estándar (Apéndice 20). Los niveles fluctuaron desde 32.251 hasta 453.148 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Apéndice 20). De nuevo se confirmó que los tratamientos aplicados no tuvieron efecto significativo sobre la cantidad de micotoxina producida en las plantas inoculadas, como se observó en el análisis de varianza de la Tabla 20. Al analizar los valores promedios de la Tabla 26, se nota que el hongo produjo **DAS** en los 3 genotipos de maíz; de los cuales resultó menos afectado el genotipo 2, como ocurrió con la toxina T-2 (Tabla 24). En forma comparativa, hubo mayor concentración de **DAS** en las mazorcas del genotipo 3, en el cual también se detectaron los niveles más altos de la toxina T-2 (Tabla 24). En las plantas testigo y en las inoculadas con los 4 aislamientos, se identificaron niveles variables de **DAS**; el aislamiento P-12 produjo cantidades cercanas a 160 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Tabla 26. Concentraciones de DAS ($\mu\text{g}/\text{kg}$) en 3 genotipos de maíz inoculados con aislamientos monospóricos de *F. moniliforme*, en el experimento de campo 1995

Genotipo de maíz	Aislamientos del hongo					Media
	Testigo	C-591	P-12	P-44	P-64	
2	161.799	18.558	115.507	71.102	109.938	95.381
3	110.833	132.906	127.713	183.998	71.151	125.32
13	87.708	67.06	235.5	107.797	35.699	106.753
Media	120.113	72.841	159.573	120.966	72.263	

Los datos de los 2 experimentos confirman que *F. moniliforme* es capaz de producir este compuesto en diversos genotipos de maíz en condiciones naturales de cultivo y en cantidades variables, de 32.251 a 673.443 $\mu\text{g}/\text{kg}$. En el primer ensayo se produjeron cantidades ligeramente superiores (52.114 y 673.443 $\mu\text{g}/\text{kg}$), que en el segundo (32.251 hasta 453.148 $\mu\text{g}/\text{kg}$); se manifestó una reacción diferencial clara entre los dos cultivos, pues el genotipo 1 permitió la infección del hongo (63 %PM) pero no la producción de **DAS**; en cambio, en el 2 hubo infección (88.9 %PM) y producción del compuesto (98.591 $\mu\text{g}/\text{kg}$). En el ensayo de 1995 los materiales exhibieron un comportamiento similar ante la infección y producción de la micotoxina.

Estos resultados indican que el **DAS** no está involucrado en los síntomas de Germinación prematura ni en los de Pudrición de la mazorca.

VI. CONCLUSIONES

Los resultados de la presente investigación correspondientes a las fases de biología, fitopatología y producción de micotoxinas del hongo *F. moniliforme*, permiten deducir las conclusiones siguientes:

6.1 Biología de *F. moniliforme*

- Los medios de cultivo papa-dextrosa-agar, hojas de clavel-agar y cloruro de potasio-agar favorecen en forma eficiente la producción de pigmentos, macroconidios en esporodoquios y microconidios en cadena de los cultivos monospóricos de *F. moniliforme*.
- Los aislamientos monospóricos cultivados en papa-dextrosa-agar son capaces de producir diversas coloraciones que varían del blanco o bronceado al violeta o rojo carmín.
- Todos los aislamientos monospóricos conservan su viabilidad y patogenicidad cuando se les almacena en gel de sílice a baja temperatura por períodos prolongados de tiempo.
- El hongo se localizó en el embrión, escutelo y membrana de la nucela de granos afectados por **Germinación prematura**.
- La colonización fungosa provoca la separación y el colapso de las células en el tejido interno del grano infectado.
- El hongo puede sobrevivir como micelio y diseminarse a través de la semilla enferma.

6.2 Fitopatología de *F. moniliforme*

6.2.1 Experimento de campo 1994

- Todos los aislamientos monospóricos de *F. moniliforme* inoculados en los genotipos 1 y 2 de maíz, provocaron síntomas de las enfermedades **Pudrición de la mazorca** y **Germinación prematura**.
- El hongo presentó un alto potencial infectivo en las plantas testigo con y sin heridas, en condiciones naturales.
- La técnica de punzón fue eficiente para inocular al hongo *F. moniliforme* y la herida provocada en el elote, favoreció la infección y el desarrollo de estas dos enfermedades en las plantas inoculadas y en las testigo, en los 2 genotipos de maíz.

- Los 2 genotipos de maíz fueron susceptibles al ataque del hongo, y la producción de grano del genotipo 2 resultó más afectada por las dos enfermedades.
- Los aislamientos monospóricos de *F. moniliforme* procedentes de Puebla fueron más agresivos para provocar **Pudrición de la mazorca** y **Germinación prematura**, que los de CIMMYT y Guerrero, en los dos genotipos de maíz estudiados.
- Los síntomas más severos de las dos enfermedades fueron provocados por los aislamientos de Puebla (**12, 28, 34, 38, 46 y 64**) y de CIMMYT (**474, 476, 497, 520, 574, 576, 591, 624,**) en los dos genotipos de maíz.
- Los daños provocados por **Pudrición de la mazorca** mostraron una estrecha asociación positiva con los de **Germinación prematura** en los dos genotipos de maíz.

6.2.2 Experimento de campo 1996

- El hongo *F. moniliforme* mostró una gran capacidad para causar infección natural en las plantas testigo y afectar el tamaño y el rendimiento de grano.
 - El genotipo de la planta y el aislamiento monospórico del hongo actuaron en forma independiente sobre las variables de estudio. No hubo interacción entre estos dos factores estudiados.
 - No hubo variación significativa entre los daños de **Pudrición de mazorca** presentados por los 18 genotipos inoculados con el hongo.
 - Los genotipos **1, 2 y 8** fueron los menos afectados por la **Germinación prematura**.
- Los genotipos **13 y 14** fueron los más precoces para iniciar la floración femenina y también, los más productivos en cantidad y tamaño de grano; pero tendieron a producir mazorcas más afectadas por **Germinación prematura**.
- El aislamiento monospórico **P-64** provocó los síntomas más severos de **Pudrición de mazorca** y **Germinación prematura**, y fue el más agresivo para disminuir el rendimiento de las plantas inoculadas.
 - Los síntomas provocados por las dos enfermedades mostraron una correlación positiva y significativa.
 - El rendimiento de las plantas inoculadas con los aislamientos monospóricos del hongo, presentó una tendencia a la disminución a medida que se incrementó la severidad de la **Pudrición de mazorca**.

6.3 Micotoxinas producidas por *F. moniliforme*

- El hongo es capaz de producir las micotoxinas **ZEA**, **T-2** y **DAS** en genotipos de maíz cultivados en condiciones de campo.
- *F. moniliforme* no produjo la micotoxina **DON** en ningún genotipo de maíz cultivado en condiciones de campo.
- Los aislamientos monospóricos del hongo no mostraron variaciones significativas en su capacidad para producir **ZEA**, **T-2** y **DAS** en maíz bajo condiciones de campo.
- El genotipo 1 fue susceptible a la infección de *F. moniliforme*, pero mostró resistencia a la producción de **DAS**. Es posible que esta micotoxina no esté involucrada en los daños de **Germinación prematura** ni en los de **Pudrición de mazorca**.
- La **ZEA** se encontró con mayor frecuencia en las muestras de los genotipos 1 y 2; pero los niveles más altos de contaminación fueron de la toxina **T-2**.
- Los genotipos **2**, **3** y **13** de maíz fueron susceptibles a la infección del hongo y a la contaminación por **ZEA**, **T-2** y **DAS**.
- Las muestras de los genotipos **2**, **3** y **13** de maíz presentaron mayor contaminación de **DAS** que de **T-2** y **ZEA**.
- La concentración de las micotoxinas **ZEA** y **DAS** en los granos contaminados no se correlacionó con los daños provocados por las dos enfermedades, ni con las variables del rendimiento de grano, en los dos experimentos.
- La severidad de la **Pudrición de mazorca** se correlacionó en forma positiva con la capacidad del hongo para producir la toxina **T-2**. Por lo tanto, de las 3 toxinas identificadas, ésta es la única involucrada en la patogénesis de la enfermedad.
- El hongo tiene capacidad de producir las toxinas **T-2** y **ZEA** en forma simultánea en los mismos granos de maíz colonizados.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ayvar, S., Michel, A., Durán, A. y Hernández, O. 1990. Control cultural y químico de la escoba de bruja (*Fusarium oxysporum*) del mango var. Haden, en Iguala, Gro. **Memorias del XVII Cong. Nac. de la Soc. Mex. de Fitop.** Del 26 al 30 de marzo de 1990. Culiacán, Sinaloa, México. 111.

Agrios, J. 1985. **Fitopatología**. Primera edición. Ed. Limusa. 382-412.

Aucock, H. W., Marasas, W. F. O., Meyer, C. J. and Chalmers, P. 1980. Field outbreak of hyperestrogenism vulvo vaginitis in pigs consuming maize infected by *Fusarium graminearum* and contaminated with zearalenone. *J. S. Afr. Vet. Assoc.* 51 (3): 163-166.

Bárceñas, G.E. 1988. Relación del hongo *Fusarium* spp. con la leucoencefalomalacia y edema cerebral de equinos. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 105 pp.

Barreto, H. J., Edmeades, G. O., Chapman, S. C. y Crossa, J. 1992. El diseño Alfa-Látice en Fitomejoramiento y Agronomía: Generación y Análisis. En: **Síntesis de resultados experimentales del Programa Regional de Maíz para Centroamérica y el Caribe 1992**. Vol. 4. CIMMYT. 273-283.

Bauer, M. L. 1984. **Fitopatología**. Futura. México, D. F. 377 pp.

Beremand, M. N. and McCormick, S. P. 1992. Biosynthesis and regulation of trichothecene production by *Fusarium* species. *In: Handbook of Applied Mycology. Mycotoxins in Ecological Systems*. Volume 5. Bhatnagar, D., Lillehoj, E. B & Arora, D. K. Eds. Marcel Dekker, Inc. U.S.A. 359-384.

Betina, V. 1989. **Mycotoxins. Chemical, biological and environmental aspects. Bioactive molecules**. Volume 9. Elsevier. Bratislava, Czechoslovakia. 438 pp.

Blanchard, R. O. and Tattar, T. A. 1981. **Field and laboratory guide to tree pathology**. Academic Press. U.S.A. 285 pp.

Booth, C. 1971. **The genus *Fusarium***. Commonwealth Mycological Institute. Kew, Surrey, England. 237 pp.

Brauer, O. 1978. **Fitogenética aplicada**. Tercera reimpresión. Limusa. México, D.F.

Burgess, L. W. and Liddell, C. M. 1983. **Laboratory Manual for *Fusarium* Research**. *Fusarium* Research Laboratory. Department of Plant Pathology and Agricultural Entomology. The University of Sydney. 162 pp.

Calvert, O. H., Zuber, M. S. and Neuffer, M. G. 1969. Vivipary in *Zea mays* induced by *Diplodia maydis*. (Phytopathological notes). *Phytopathology*, 59: 239-240.

Campos, L. 1987. Estudio comparativo de tres métodos de extracción de zearalenona, micotoxina producida por *Fusarium* spp. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 57 pp.

Carvajal, M. 1987. Premature germination of maize and the related mycotoxin. *In: Aflatoxin in maize: A Proceeding of the Workshop*. Zuber, M.S., Lillehoj, E. B. and Renfro, B. L. Eds. CIMMYT. El Batán, Edo. de México. 71-73.

Carvajal, M. 1994. Micotoxicosis. En: **Microbiología y Parasitología Médicas**. Tay, Z. J. Editor. Segunda edición. Méndez Editores. México. 4.141-4.151.

Carvajal, M. 1997. Comunicación personal. Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. México.

Cepeda, M. 1991. Métodos de inoculación de *Fusarium moniliforme* en tallo de maíz. **Memorias del 18 Cong. Nac. de la Soc. Mex. de Fitop.** Del 24 al 26 de julio de 1991. Puebla, Puebla, México. 143.

Cepeda, M. y Orozco, G. 1989. Enfermedades del maíz en Michoacán. **Memorias del XVI Cong. Nac. de la Soc. Mex. de Fitop.** Del 24-28 de julio de 1989. Montecillo, México. 1.

Cepeda, M. y Venegas, E. 1991. Selección de genotipos de maíz tolerantes a *Fusarium moniliforme*. **Memorias del 18 Cong. Nac. de la Soc. Mex. de Fitop.** Del 24 al 26 de julio de 1991. Puebla, Puebla. 100.

Cepeda, M. y Venegas, E. 1992. Control de *Fusarium moniliforme* (Sheld.) Snyder y Hansen, en tallos de maíz de riego en Tarímbaro, Michoacán. **Memorias del XIX Cong. Nac. de la Soc. Mex. de Fitop.** Buenavista Saltillo, Coahuila. Del 19 al 21 de agosto de 1992. 105.

Cepeda, M., Castrejón, A. y Arroyo, C. L. 1994. Efecto de *Fusarium moniliforme* (Sheld.) Snyder & Hansen sobre el rendimiento de 21 genotipos de maíz. **Memorias del XXI Cong. Nac. de la Soc. Mex. de Fitop.** Del 20 al 22 de julio de 1994. Cuernavaca, Mor. México. 100.

Christensen, J.J., and Wilcoxson, R.D. 1966. **Stalk rot of corn**. Monograph 3. Am. Phytopathological Soc. Heffernan Press, Inc. Worcester, MA., U.S.A. 59 pp.

CIMMYT. 1985. **Manejo de ensayos e informe de datos de ensayos internacionales de maíz del CIMMYT**. Segunda reimpresión. Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo. México, D. F. 23 pp.

- Cole, R. J. and Cox, R. H. 1981. **Handbook of toxic fungal metabolites**. Academic, New York, U.S.A. 152-263.
- Commonwealth Mycological Institute. 1963. **Distribution maps of plant diseases**. Map N° 102. Edition 3. England.
- Conley, R. T. 1979. **Espectroscopía infrarroja**. Ed. Alhambra. España. 346 pp.
- Correa, F. R., Meirelles, M. A., Soares, J. M., Machado, J. J. and Zambrano, A. F. 1982. Equine leukoencephalomalacia associated with ingestion of moldy corn in three countries in southern Brazil. *Pesq. Vet. Bras.* 2 (1): 27-30.
- Covarrubias, C. 1989. Asociación de *Fusarium* sp. a la escoba de bruja del mango *Mangifera indica* L. en Tecomán, Colima. **Memorias del XVI Cong. Nac. de la Soc. Mex. de Fitop.** Del 24-28 de julio de 1989. Montecillo, México. 35.
- Cullen, D. and Caldwell, R. W. 1983. *Fusarium* toxins and their importance in mycotoxicology. *Phytopathology*, 73 (5): 767.
- Daniels, B. A. 1983. Elimination of *F. moniliforme* from corn seed. *Pl. Dis.*, 67: 609-611.
- De León, C. 1984. **Enfermedades del maíz. Una guía para su identificación en el campo**. Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo. Tercera edición. 114 pp.
- Díaz, V. 1979. Etiología de la deformación o escoba de bruja del mango en el Estado de Morelos. Tesis de Maestría en Ciencias. Universidad Autónoma Chapingo, México. 54 pp.
- Desjardins, A. E. 1992. Genetic approaches to the chemical ecology of phytopathogenic *Fusarium* species. *In: Handbook of Applied Mycology. Mycotoxins in Ecological Systems*. Volume 5. Bhatnagar, D., Lillehoj, E. B. & Arora, D. K. Eds. Marcel Dekker, Inc. USA. 333-357.
- Drepper, W.J. and Renfro, B.L. 1990. Comparison of methods for inoculation of ears and stalks of maize with *Fusarium moniliforme*. *Pl. Dis.* 74: 952-956
- Eppley, R. M. 1979. Trichothecenes and their analysis. *Journal of American Oil Chemists' Society*, 56: 824-829.
- F.A.O. 1991. **Manuales para el control de calidad de los alimentos 10. Capacitación en el análisis de micotoxinas**. Estudio F.A.O.: Alimentación y nutrición. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma, Italia. 144 pp.
- Félix, G. y Romero, S. 1981. Etiología de la germinación prematura del maíz en Huamantla, Tlaxcala. *Agrociencia*, 43: 81-87.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DEL INSTITUTO

- Flores, O. y Delgado, L. 1991. Evaluación de la técnica de inoculación '*in vitro*' e invernadero de progenitores de híbridos de maíz (*Zea mays* L.) para determinar tolerancia a *Fusarium moniliforme*. **Memorias del 18 Cong. Nac. de la Soc. Mex. de Fitop.** Del 24 al 26 de julio de 1991. Puebla, México. 142.
- Foley, D.C. 1962. Systemic infection of corn by *Fusarium moniliforme*. *Phytopathology* 52: 870-872.
- Fong, F., Smith, J. O. and Koehler, D. E. 1983. **Early events in maize seed development.** *Pl. Physiol.* 73: 899-901.
- Frederiksen, R. A. 1986. **Compendium of sorghum diseases.** American Phytopathological Society and Department of Plant Pathology. Texas A & M University. 27-29.
- Galindo, J. and Romero, S. 1982. *Fusarium moniliforme* as the cause of preharvest sprouting in maize in México. **III International Symposium on Preharvest Sprouting in Cereals.** Winnipeg, Canada.
- Galindo, J. 1983. Evidencia adicional para confirmar a *Fusarium moniliforme* como causa de la germinación prematura del maíz. Informe de Actividades 1979-1983. Convenio de Colaboración Académica. Colegio de Postgraduados. Universidad Nacional Autónoma de México. 4-8.
- Galindo, J. 1996. Comunicación personal. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Edo. de México. México.
- Gimeno, A. 1983. Rapid thin layer chromatographic determination of zearalenone in corn, sorghum and wheat. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 66(3): 565-569.
- González, S., Leyva, G. y Villaseñor, M. 1987. Evaluación de técnicas y fechas de inoculación de *Fusarium moniliforme* S. y H. causante de la pudrición de la mazorca y el germinado prematuro del maíz. **Memorias del XIV Cong. Nac. de la Soc. Mex. de Fitop.** Del 15 al 17 de julio de 1987. Morelia, Mich. México. 105.
- Haliburton, J. C., Vesonder, R. F., Lock, T. F. and Buck, W. B. 1979. Equine leucoencephalomalacia (ELEM): A study of *Fusarium moniliforme* as an etiologic agent. *Vet. Human Toxicol.* 21: 348-351.
- Headrick, J. M. and Pataky, J. K. 1989. Resistance to kernel infection by *F. moniliforme* in inbred lines of sweet corn and the effect of infection on emergence. *Pl. Dis.*, 73: 887-892.
- Heo, N. Y., Chung B. K. and Kim, K. S. 1981. Incidence and control of corn ear rot. *Soil Fert. Crop. Prot. and Mycol.* 23: 80-85.

- Hernández, M., Mendoza, L., Ortíz-Cereceres, J. y Osada, S. 1987. Efecto del tizón de la panoja *Fusarium moniliforme* (Sheld.) S. & H. en el rendimiento de grano en sorgo. **Memorias del XIV Cong. Nac. de la Soc. Mex. de Fitop.** Del 15-17 de julio de 1987. Morelia, Mich. México. 89.
- Herrera, T. y Ulloa, M. 1990. **El reino de los hongos. Micología básica y aplicada.** Universidad Nacional Autónoma de México y Fondo de Cultura Económica. México. 552 pp.
- Holliday, P. 1980. **Fungus diseases of tropical crops.** Cambridge University Press. Great Britain. 203-215.
- Holliday, P. 1989. **A dictionary of plant pathology.** Cambridge University Press. Great Britain. 369 pp.
- Hsieh, D. P. H. 1988. Potential human health hazards of mycotoxins. *In: Mycotoxins and Phycotoxins* '88. Natori, S., Hashimoto, H. and Ueno, Y. Eds. Vol. 10. **Elsevier Science Publisher B. V.** Amsterdam, The Netherlands. 69-80.
- Jeffers, D. 1994. Comunicación personal. Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo. El Batán, Edo. de México. México.
- Joffe, A. Z. 1971. Alimentary Toxic Aleukia. *In: Fungal toxins.* Vol. VIII. Kadis, S., Ciegler, A. and Ajl, S. J. Eds. Academic Press. U.S.A. 400 pp.
- Kenaga, C.B. 1974. **Principles of phytopathology.** Edition 2. **Balt Publishers.** Lafayette, Indiana. U.S.A. 402 pp
- Koehler, B. 1942. Natural mode of entrance of fungi into corn ears and some symptoms that indicate infection. *J. Agric. Res.* 64:421-442.
- Kriek, N. P. J., Marasas, W. F. O. and Thiel, P. G. 1981. Hepato and cardiotoxicity of *Fusarium verticillioides* (*F. moniliforme*) isolates from Southern African Maize. *Fd. Cosmet. Toxicol.* 19: 447-456.
- Kucharek, T.A., and Kommedahl, T. 1966. Kernel infection and corn stalk rot caused by *Fusarium moniliforme*. (Phytopathological notes). *Phytopathology*, 56: 983-984.
- Lawrence, E. B., Nelson, P. E. and Ayers, J. E. 1981. Histopathology of sweet corn and plants infected with *Fusarium moniliforme* and *F. oxysporum*. *Phytopathology*, 71: 379-386.
- Littlefield, W.E. 1964. Effect of hail damage on yield and stalk rot infection in corn. *Pl. Dis. Repr.*, 48: 169.

- Lugo, B. L. E. y Cajuste, L. J. 1983. Efecto de la concentración de microelementos en grano de maíz en relación con la germinación prematura. Informe de Actividades 1979 - 1983. Convenio de Colaboración Académica. Colegio de Postgraduados-Universidad Nacional Autónoma de México. 9 -12.
- Luo, X. Y. 1988. *Fusarium* toxins contamination of cereals in China. IUPAC'88 and ICPP'88. Mycotoxins and Phycotoxins. Proceed. Jap. Assoc. Mycot. 97-98.
- Mangelsdorf, P. C. 1930. The inheritance of dormancy and premature germination in maize. *Genetics*, 40: 745-760.
- Marasas, W. F. O., Nelson, P. E. and Toussoun, T. A. 1984. **Toxigenic *Fusarium* species. Identity and mycotoxicology.** The Pennsylvania State University. 328 pp.
- Marijanovic, D. R., Holt, P., Norred, W. P., Bacon, C. W., Voss, K. A. and Stancel, P. C. 1991. Immunosuppressive effects of *Fusarium moniliforme* corn cultures in chicken. *Poultry Science*. 70 (9): 1895-1901.
- Márquez, O. J. 1985. Germinación prematura del maíz (*Zea mays* L.) en la zona centro de Puebla. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Edo. de México.
- Masterton, W. L. y Slowinski, E. J. 1979. **Química general superior.** Interamericana. México, D.F. 760 pp.
- Miller, R.G. 1966. **Simultaneous statistical inference.** Mc Graw-Hill Book Co. 272 pp.
- Miller, P. R. and Pollard, H. L. 1976. **Multilingual Compendium of Plant Diseases.** American Phytopathological Society, United States of America. 457 pp.
- Mirocha, C. J. and Christensen, C. M. 1974. Fungus metabolites toxic to animals. *Ann. Rev. Phytopathol.* 303-330.
- Mirocha, C. J. Pathre, S. V. and Christensen, C. M. 1977. Zearalenone. *In: Mycotoxins in human and animal health.* Rodricks, J. V., Hesselstine, C. W. & Mehlman, M. A. Eds. Pathotox Publishers, Inc. Park Forest South, Illinois. U.S.A. 345-364.
- Naik, D.M., Nama, F.N., and Raemaekers, R.H. 1982. Absence of an effect from internally seed borne *Fusarium moniliforme* on emergence plant growth and yield of maize. *Seed Sci. & Technol.*, 10: 347-356.

- Narro, S. y Vega, G. 1993. Estudios fitopatológicos relacionados con mohos del grano e intemperismo de granos de sorgo [*Sorghum bicolor* (L.) Moench.] en seis fechas de siembra, en Celaya, Guanajuato. **Memorias del XX Cong. Nac. de la Soc. Mex. de Fitop.** Del 4 al 6 de agosto de 1993. Zacatecas, Zac. México. 14.
- Navarrete, R. 1986. Factores ambientales y biológicos que influyen en el desarrollo de la enfermedad "Germinación Prematura" del maíz, causada por *Fusarium moniliforme* Sh. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Méx. 97 pp.
- Navarrete, R., Galindo, J. y Sosa-Moss, C. 1987. Relación entre la germinación prematura del maíz y la temperatura ambiental. **Memorias del XIV Cong. Nac. de la Soc. Mex. de Fitop.** Del 15-17 de julio de 1987. Morelia, Mich., México. 20.
- Nelson, P. E., Toussoun, T. A. and Marasas, W. F. O. 1983. ***Fusarium* species. An illustrated manual for identification.** The Pennsylvania State University. USA. 193 pp.
- Noriega, D., Téliz, D., Zavaleta, E., Cárdenas, E., Rodríguez, J. y Otero, G. 1995. Escoba de bruja del mango: Epidemiología y manejo integrado del cultivo. **Memorias del XXII Cong. Nac. de la Soc. Mex. de Fitop.** Del 9-11 de agosto de 1995. Guadalajara, Jalisco. México. Resumen 106.
- Nyvall, R.F., and Kommedahl. 1970. Saprophytism and survival of *Fusarium moniliforme* in corn fields. *Phytopathology.*, 60: 1233-1235.
- Nyvall, R.F. 1979. **Field crop diseases handbook.** AVI Publishing Company, Inc. Wesport, Connecticut, U.S.A. 58-80.
- O. P. S. 1983. **Criterios de salud ambiental II. Micotoxinas.** Publicación científica N° 453. Organización Panamericana de la Salud. Organización Mundial de la Salud. Washington, D.C. E. U. A. 99-105.
- Ortega, A. and De León, C. 1971. Plant protection. *In: Proceeding of the First Maize Workshop.* Carballo, A. and Bork, D. Eds. El Batán, CIMMYT, Edo. de México. 95-102.
- Ortega, M. L. y Vega, O. 1983. Carbohidratos e inhibidores de la germinación y crecimiento durante el desarrollo y germinación inmadura del grano de maíz (*Zea mays* L.). Informe de Actividades 1979 - 1983. Convenio de Colaboración Académica. Colegio de Postgraduados-Universidad Nacional Autónoma de México. 31-33.
- Ortíz-Cereceres, J. 1983. Algunos aspectos agronómicos y genotécnicos de la germinación prematura en maíz. Informe de Actividades 1979-1983. Convenio de Colaboración Académica. Colegio de Postgraduados-Universidad Nacional Autónoma de México. 19-25.

- Paterson, R. R. M. and Bridge, P. D. 1994. **Biochemical techniques for filamentous fungi**. IMI Technical Handbooks N° 1. International Mycological Institute. CAB International. UK. 125 pp.
- Peckok, R. L. y Shields, D. 1983. **Métodos modernos de análisis químicos**. Limusa. México. D. F. 487 pp.
- Pereda, M. P. 1987. Estudio analítico de tres técnicas de recuperación de aflatoxina B₁. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F. 91 pp.
- Pier, A. C. 1981. Mycotoxins and animal health. *In: Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine*. Vol. 25. Academic Press. USA. 185-243.
- Pittet, A., Parisod, V. and Schellenberg, M. 1992. Occurrence of fumonisins B₁ and B₂ in corn and products from the Swiss market. *In: Recent advances in toxinology research*. Vol. 3 (Gopalakrishnakone, P. and Tan, C. K. Eds.). Venom & Toxin Research Group. National University of Singapore. 259-265.
- Plattner, R. D. and Bennett, G. A. 1983. Rapid detection of *Fusarium* mycotoxins in grains by quadruple mass spectrometry/mass spectrometry. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 66 (6): 135.
- Poey, F.R. 1972. Mejoramiento de la calidad nutritiva del maíz. **Memorias del Simposio sobre desarrollo y utilización de maíces de alto valor nutritivo**. Junio 29 y 30 de 1972. Colegio de Postgraduados. Escuela Nacional de Agricultura, Chapingo, Edo. de México. 69-78.
- Reyes, P. 1990. **El maíz y su cultivo**. AGT Editor, S.A. México, D.F. 460 pp.
- Robertson, D. S. 1955. The genetic of vivipary in maize. *Genetics*, 40: 745-760.
- Romer, T. R. 1986. Use of small charcoal/alumina cleanup columns in determination of trichothecene mycotoxins in foods and feed. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 69: 699-703.
- Romero, S. 1988. **Hongos fitopatógenos**. Universidad Autónoma Chapingo. Edo. de México. 347 pp.
- Routchenko, W. and P. J. Soyer. 1971. Sur les causes de la germination sur plante des grains immatures de maïs. Résultats préliminaires. *Ann. Agron.* 22 (2): 241-255.
- Saccardo, P.A. 1881. **Fungi italici autographice delimitati**. Fig. 789. Pataxii.

- Sánchez, E., Albores, M., Galindo, J. y Ortiz-Cereceres, J. 1983. Informe de actividades 1979-1983. Convenio de Colaboración Académica. Colegio de Postgraduados-Universidad Nacional Autónoma de México. 22 pp.
- Scudamore, K. A., Hetmanski, M. T. and Weatherby, P. M. 1988. Advances in methodology for the detection of mycotoxins occurring in cereals and animal feed. Mycotoxins and Phycotoxins. Proceed. Jap. Assoc. Mycot. 55-56.
- Shank, R. C. 1978. Mycotoxicoses of man: Dietary and epidemiological conditions. *In: Mycotoxic fungi, mycotoxins, mycotoxicoses. An Encyclopedic Handbook*. Vol. 3. Wyllie, T. D. and Morehouse, L. G.. Eds. Marcel Dekker, Inc. 1-19.
- Shotwell, O. L. 1977. Assay methods for zearalenone and its natural occurrence. *In: Mycotoxins in human and animal health*. Rodricks, J. V., Hesseltine, C. W. & Mehlman, M. A. Eds. Pathotox Publishers, Inc. Park Forest South, Illinois. U.S.A. 345-364.
- Shurtleff, M. C. 1977. **Compendium of corn diseases**. Third Edition. American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota. U.S.A. 64 pp.
- Sleesman, J. P., and Leben, C. 1978. Preserving phytopathogenic bacteria at -70°C or with silica gel. *Plant Dis. Rep.*, 62: 910-913.
- Smeltzer, D.G. 1959. Relationship between *Fusarium* ear rot and corn earworm infestation. *Agron. J.*, 41: 347-348.
- Smith, J. D., Mc Daniel, S. and Lively, S. 1978. Regulation of embryo growth by abscisic acid '*in vitro*'. *Maize Gen. Crops Newlet.* 52 pp.
- Snijders, C. H. A. 1988. The phytotoxic action of deoxynivalenol and zearalenone on wheat seedling. IUPAC'88 and ICPP'88. Mycotoxins and Phycotoxins. **Proceed. Jap. Assoc. Mycot.** 103-104.
- Steel, R. y Torrie, J. 1985. **Bioestadística: Principios y procedimientos**. Segunda edición. McGraw-Hill. México, D.F. 622 pp.
- Styer, R.C. and Cantliffe, D. 1984. Infection of two endosperm mutants of sweet corn by *Fusarium moniliforme* and its effect on seedling vigor. *Phytopathology*, 74: 189-194.
- Sutton, J. C., Liu, H. J. and Baliko, W. 1980. Fungal colonization and zearalenone accumulation in maize *Zea mays* ears injured by birds. *Can. J. Plant. Sci.*, 60 (2): 453-462.
- Sutton, J.C. 1982. Epidemiology of wheat head blight and maize ear rot caused by *Fusarium graminearum*. *Can. J. Plant Pathol.*, 4: 195-209.

- Tanaka, T., and Ueno, Y. 1989. Worldwide natural occurrence of *Fusarium* mycotoxins, nivalenol, deoxynivalenol and zearalenone. *In: Mycotoxins and Phycotoxins'88*. Vol. 10. Natori, S., Hashimoto, H. and Ueno, Y. Eds. Elsevier Science Publisher. Amsterdam, The Netherlands. 69-80.
- Thomas, F., Eppley, R. M. and Trucksess, M. W. 1975. Rapid screening method for aflatoxins and zearalenone in corn. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 58 (1): 114-116.
- Tong-Xia, Z. and Chi, Z. 1988. Distribution and characteristic of zearalenone-producing *Fusarium* in Mainland China. IUPAC'88 and ICPP'88. *Mycotoxins and Phycotoxins. Proceeding of Jap. Assoc. Mycot. Supplement N° 1. 39-40.*
- Tuite, J. 1969. **Plant pathological methods. Fungi and bacteria.** Burgess Publishing Company. Minneapolis, Minn. USA. 239 pp.
- Ureña, F. C. 1986. **Manual de técnicas básicas para microscopía electrónica.** Unidad de Microscopía Electrónica. Universidad de Costa Rica. 55 pp.
- U.S.D.A. 1960. **Index of plant diseases in the United States.** Agriculture Handbook N° 165. Crop Research Division. Agricultural Research Service. United States Department of Agriculture. 531 pp.
- Walker, J. 1975. **Patología vegetal.** Tercera edición. Omega. Barcelona, España. 818 pp.
- Wicklow, D. T. 1988. Patterns of fungal association within maize kernel harvested in North Carolina. *Pl. Dis.*, 72: 113-115.
- Windels, C. E., Burnes, P. M. and Kommedahl, T. 1988. Five-years preservation of *Fusarium* species on silica gel and soil. *Phytopathology*, 78 (1):107-109.
- Wollenweber, H. W. and Reinking, O. A. 1935. **Die Fusarien, ihre Beschreibung, Schadwirkung und Bekämpfung.** Berlin: Paul Parey. 355 pp.
- Yost, R. W., Ettore, L. S. y Conlon, R. D. 1980. **Introducción a la Cromatografía Líquida Práctica.** Perkin-Elmer. U. S. A. 263 pp.
- Zenteno-Zevada, M. y Muñoz, O.A. 1968. Estudio sobre hongos parásitos de gramíneas de la República Mexicana. VII. Segunda prueba de inoculación en mazorcas de maíz con *F. moniliforme*. *An. Inst. Biol. Univ. Nal. Autón. de México* 39. Ser. Botánica (1): 111-116.

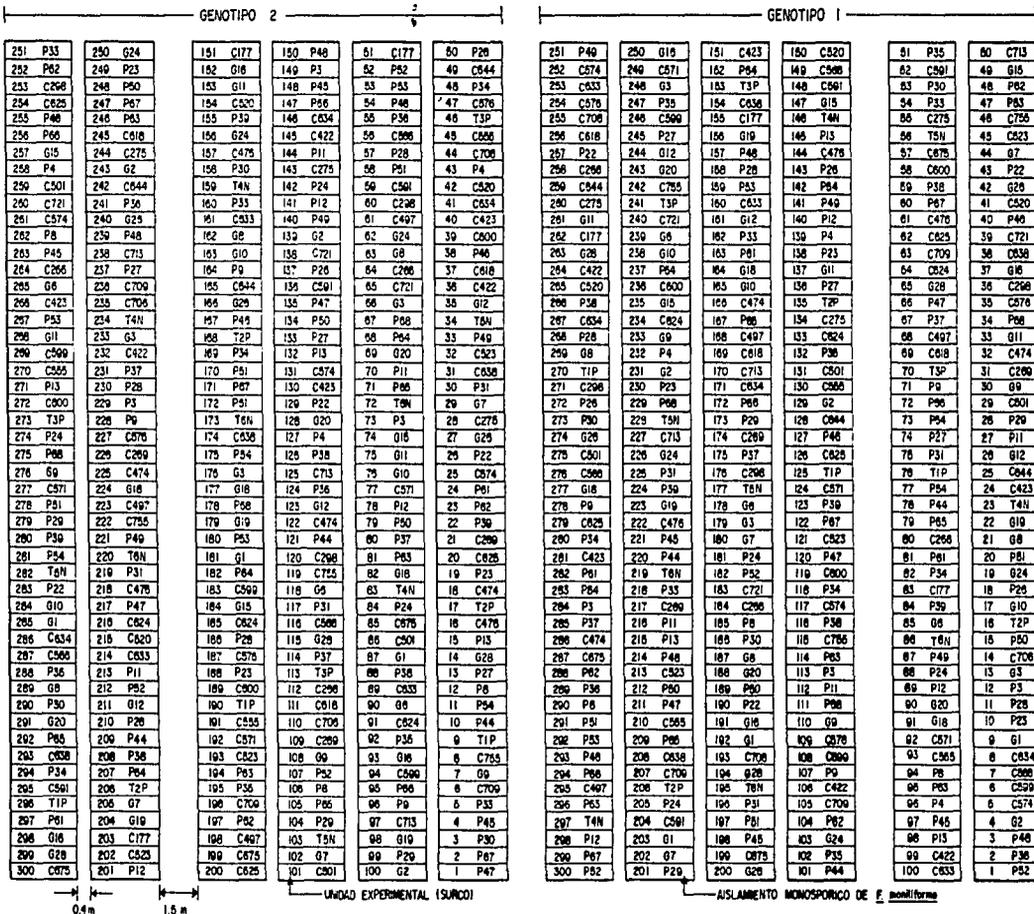
VIII. APÉNDICES

Apéndice 1. Hospedantes y síntomas causados por *Fusarium moniliforme* Sheld

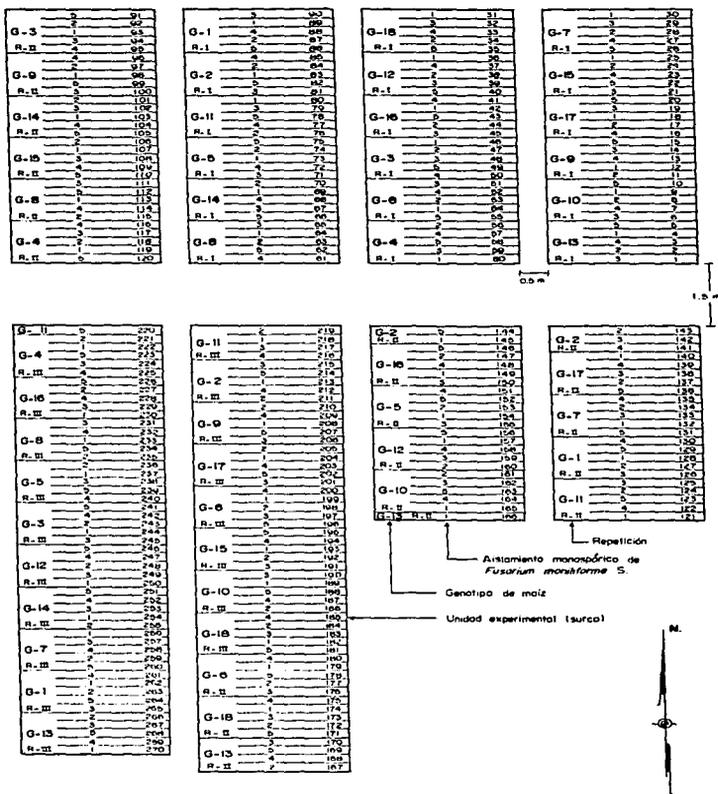
Hospedantes y síntomas	Referencias
Algodón (<i>Gossypium hirsutum</i> L.). Pudriciones de raíz y fruto	U.S.D.A. (1960); Booth (1971); Walker (1975); Holliday (1989)
Arroz (<i>Oryza sativa</i> L.). Pudrición de raíz	U.S.D.A. (1960); Booth (1971); Burgess & Liddell (1983); Holliday (1989)
Avena (<i>Avena sativa</i> L.). Pudrición de raíz	U.S.D.A. (1960); Burgess & Liddell (1983)
Cacahuete (<i>Arachis hypogaea</i> L.). Pudriciones de raíz y fruto	U.S.D.A. (1960)
Café (<i>Coffea arabica</i> L.). Tizón de plántulas	U.S.D.A. (1960)
Caña de azúcar (<i>Saccharum officinarum</i> L.). Pudriciones de tallo y cogollo	U.S.D.A. (1960); Booth (1971); Walker (1975); Holliday (1989)
Cebolla (<i>Allium cepa</i> L.). Pudrición de bulbo	U.S.D.A. (1960)
Chicharo (<i>Pisum sativum</i> L.). Pudrición de raíz	U.S.D.A. (1960)
Dátil (<i>Phoenix dactylifera</i> L.). Tizón de flores y pudrición de fruto	U.S.D.A. (1960)
Espárrago (<i>Asparagus officinalis</i> L.). Pudriciones de raíz y tallo	U.S.D.A. (1960)
Higo (<i>Ficus carica</i> L.). Pudrición de fruto	U.S.D.A. (1960); Holliday (1989)
Maíz (<i>Zea mays</i> L.). Pudrición y germinación prematura del grano	U.S.D.A. (1960); Booth (1971); Walker (1975); Holliday (1989)
Mango (<i>Mangifera indica</i> L.). Proliferación de panículas y brotes	Booth (1971); Holliday (1989)
Melón (<i>Cucumis melo</i> L.). Pudrición de fruto	U.S.D.A. (1960)
Papa (<i>Solanum tuberosum</i> L.). Pudrición de tubérculos	U.S.D.A. (1960)
Plátano (<i>Musa</i> spp.). Pudrición de fruto; tizón de flores	U.S.D.A. (1960); Booth (1971); Walker (1975); Holliday (1989)
Pino (<i>Pinus</i> spp.). Pudrición de raíz	U.S.D.A. (1960); Holliday (1989)
Piña (<i>Ananas comosus</i> (L.) M.). Pudrición de fruto	U.S.D.A. (1960); Booth (1971); Walker (1975); Holliday (1989)
Sorgo (<i>Sorghum</i> spp.). Pudrición de tallo, panoja y semilla	Booth (1971); Walker (1975); Burgess & Liddell (1983); Holliday (1989)
Tomate (<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill.). Pudrición de fruto	U.S.D.A. (1960); Booth (1971)
Trigo (<i>Triticum</i> spp.). Pudrición de raíz	U.S.D.A. (1960); Booth (1971); Walker (1975)
Zanahora (<i>Daucus carota</i> L.). Pudrición de semilla	U.S.D.A. (1960)

Apéndice 2. Efectos patológicos provocados por razas toxigenas de *F. moniliforme* Sheld. en animales domésticos y de laboratorio

Animal y síndrome	Referencias
Asno (<i>Equus asinus</i>). Leucoencefalomalacia	Haliburton <i>et al.</i> (1979); Kriek <i>et al.</i> (1981); Correa <i>et al.</i> (1982); Marasas <i>et al.</i> (1984); Pittet <i>et al.</i> (1992)
Caballo (<i>Equus caballus</i>). Leucoencefalomalacia	Haliburton <i>et al.</i> (1979); Kriek <i>et al.</i> (1981); Correa <i>et al.</i> (1982); Marasas <i>et al.</i> (1984); Pittet <i>et al.</i> (1992)
Cerdo (<i>Sus scropha</i>). Erizado y caída de pelo, daño de pezuñas y edema pulmonar	Kriek <i>et al.</i> (1981); Marasas <i>et al.</i> (1984); Pittet <i>et al.</i> (1992)
Conejo (<i>Oryctolagus cuniculus</i>). Pérdida de peso, aumento del ritmo cardíaco, evacuaciones negruzcas escasas y daños severos en la piel	Marasas <i>et al.</i> (1984)
Ganso (<i>Branta</i> spp. y <i>Chen</i> spp.). Alteraciones de la espermatogénesis.	Marasas <i>et al.</i> (1984)
Mandril (<i>Mandrillus sphinx</i>). Fallas en el corazón y cirrosis del hígado	Kriek <i>et al.</i> (1981); Marasas <i>et al.</i> (1984)
Mula y mulo (<i>Equus</i> spp.). Leucoencefalomalacia	Haliburton <i>et al.</i> (1979); Kriek <i>et al.</i> (1981); Correa <i>et al.</i> (1982); Marasas <i>et al.</i> (1984); Pittet <i>et al.</i> (1992)
Oveja (<i>Ovis aries</i>). Muerte por necrosis y hepatitis agudas	Kriek <i>et al.</i> (1981); Marasas <i>et al.</i> (1984)
Paloma (<i>Columba</i> spp.). Vómitos prolongados	Marasas <i>et al.</i> (1984)
Pato (<i>Axis sponsa</i>). Muerte en aves de 1 día de edad	Marasas <i>et al.</i> (1984)
Pollo (<i>Gallus gallus</i>). Deficiencia del sistema inmune y muerte	Marasas <i>et al.</i> (1984); Marjanovic <i>et al.</i> (1991)
Ratón (<i>Mus musculus</i>). Muerte por daños en el hígado y riñón, hemorragia de la mucosa del tracto gastro-intestinal e hiperestrogenismo	Marasas <i>et al.</i> (1984)
Rata (<i>Rattus rattus</i>). Inhibición de la espermatogénesis, pérdida de peso, cirrosis, trombosis del corazón, daños en la piel y muerte	Kriek <i>et al.</i> (1981); Marasas <i>et al.</i> (1984); Pittet <i>et al.</i> (1992)



Apéndice 3. Distribución de los tratamientos con tres repeticiones en los genotipos 1 y 2 de maíz en un diseño experimental "Alfa Láctico", en el experimento de campo 1994



Apéndice 4. Distribución de los tratamientos con tres repeticiones en un diseño experimental de Bloques al Azar con Parcelas Divididas, en el experimento de campo 1995

Apéndice 5. Tratamientos y repeticiones del experimento de campo 1994, seleccionados para el análisis químico de ZEA, T-2, DAS y DON

Tratamientos	Genotipo 1			Genotipo 2			Observaciones
	Repeticiones			Repeticiones			
	I	II	III	I	II	III	
1. T 1-P*	76 ^{Z/}	125	270	9	190	296	Testigo + herida.
2. T 2-P*	16	135	206	17	168	206	Testigo + herida.
3. T 3-P*	70	153	241	46	113	273	Testigo + herida.
4. T 4-N**	23	146	297	83	159	234	Testigo natural.
5. T 5-N**	56	177	228	34	103	282	Testigo natural.
6. T 6-N**	86	195	219	72	173	220	Testigo natural.
7. P-3	12	113	284	73	149	229	Menor % de infección de mazorca.
8. P-34	82	118	280	48	169	294	Mayor % de infección de mazorca.
9. P-44	78	101	220	10	121	209	Mayor N° de granos con germinación prematura.
10. P-64	73	152	237	68	182	207	Mayor % de mazorcas con germinación prematura
11. C-269	31	174	217	21	109	226	Menor N° de granos con germinación prematura.
12. C-591	52	148	204	59	136	295	Cepa de CIMMYT.
13. C-634	8	171	267	41	146	286	Menor % de mazorcas con germinación prematura.

* = Tratamientos testigo con herida en el elote T (1, 2 y 3)-P

** = Tratamientos testigo sin herida en el elote T (4, 5 y 6)-P

Z/ = Número de surco (unidad experimental) en el cultivo experimental (Apéndice 3).

Apéndice 6. Tratamientos y repeticiones del experimento de campo 1995, seleccionados para el análisis químico de ZEA, T-2, DAS y DON

N°	Factores		Repeticiones			Observaciones
	Genotipos	Aislamientos del hongo	I	II	III	
1.	2*	Testigo	83	145	213	Menor número de granos con germinación prematura
2.	2	C-591	84	143	211	"
3.	2	P-12	81	142	215	"
4.	2	P-44	85	141	212	"
5.	2	P-64	82	144	214	"
6.	3	Testigo	46	93	244	Mayor número de granos con germinación prematura
7.	3	C-591	47	92	243	"
8.	3	P-12	48	94	245	"
9.	3	P-44	50	95	242	"
10.	3	P-64	49	91	241	"
11.	13	Testigo	4	166	270	Mayores tamaño y peso total de granos
12.	13	C-591	2	167	266	"
13.	13	P-12	1	170	267	"
14.	13	P-44	3	168	269	"
15.	13	P-64	5	169	268	"

* = Número de surco (unidad experimental) en el cultivo experimental (Apéndice 4)

Apéndice 7. Prueba de Tukey del porcentaje de pudrición de mazorca del genotipo 1 de maíz inoculado con 94 aislamientos de *F. moniliforme* en el experimento de campo 1994

Tratamiento	Media	Tratamiento	Media	Tratamiento	Media	Tratamiento	Media
P - 34	82.52 a	P - 66	69.67 ab	Q - 16	63.88 ab	C - 599	56.39 ab
P - 63	80.37 a	P - 31	68.97 ab	P - 61	63.88 ab	Q - 24	56.06 ab
C - 574	78.82 a	P - 67	68.90 ab	P - 39	63.64 ab	P - 23	55.56 ab
C - 474	78.80 a	C - 476	68.72 ab	Q - 3	63.05 ab	C - 618	55.11 ab
P - 28	76.84 a	C - 676	68.69 ab	C - 520	62.05 ab	C - 600	54.61 ab
P - 36	76.37 a	P - 22	68.62 ab	C - 591	61.92 ab	C - 298	54.28 ab
P - 13	75.37 ab	C - 706	68.37 ab	P - 44	61.90 ab	Q - 12	54.18 ab
C - 497	75.27 ab	Q - 8	67.93 ab	P - 26	61.69 ab	P - 33	54.05 ab
P - 24	74.93 ab	P - 49	67.92 ab	P - 64	61.64 ab	Q - 20	53.87 ab
P - 35	73.67 ab	Q - 18	67.80 ab	Q - 1	61.62 ab	Q - 6	53.23 ab
P - 38	73.33 ab	P - 30	67.80 ab	P - 52	61.35 ab	C - 626	53.22 ab
T 3 - P	73.30 ab	P - 27	67.56 ab	Q - 11	61.01 ab	P - 3	53.22 ab
C - 721	73.11 ab	P - 12	67.52 ab	Q - 10	60.98 ab	C - 713	53.20 ab
C - 571	73.09 ab	P - 48	67.38 ab	T 2 - P	60.17 ab	Q - 19	53.03 ab
P - 62	72.77 ab	C - 177	67.28 ab	C - 501	60.05 ab	C - 634	52.26 ab
Q - 7	72.77 ab	C - 633	67.21 ab	Q - 15	59.73 ab	C - 566	51.97 ab
C - 555	72.18 ab	P - 51	66.80 ab	Q - 28	59.23 ab	C - 644	50.13 ab
P - 47	72.11 ab	P - 53	66.68 ab	C - 576	59.12 ab	C - 765	49.94 ab
P - 37	72.10 ab	C - 709	66.64 ab	C - 523	58.57 ab	T 1 - P	48.32 ab
P - 29	71.45 ab	C - 422	66.25 ab	C - 275	57.84 ab	C - 638	47.51 ab
P - 4	71.39 ab	C - 624	66.14 ab	P - 8	57.81 ab	C - 266	47.33 ab
P - 65	70.60 ab	C - 423	65.91 ab	P - 45	57.25 ab	P - 11	46.86 ab
Q - 9	70.49 ab	P - 68	65.87 ab	C - 269	57.13 ab	T 6 - N	43.42 ab
P - 9	70.45 ab	Q - 26	64.71 ab	P - 46	56.80 ab	T 5 - N	42.10 ab
Q - 2	69.90 ab	P - 54	64.57 ab	P - 50	56.74 ab	T 4 - N	35.04 b

Las medias con las misma letra dentro de la columna son estadísticamente iguales (Tukey $P \leq 0.05$)

Apéndice 8. Prueba de Tukey del porcentaje de mazorcas con "Germinación prematura" del genotipo 1 de maíz inoculado con 94 aislamientos de *F. moniliforme* en el experimento de campo 1994

Trata- miento	Media	Trata- miento	Media	Trata- miento	Media	Trata- miento	Media
P - 38	41.14 a	C - 571	20.94 a	P - 67	15.92 a	P - 36	10.12 a
C - 476	37.07 a	C - 709	20.72 a	P - 48	14.88 a	C - 676	9.80 a
C - 520	35.08 a	Q - 10	20.52 a	P - 29	14.70 a	P - 8	9.71 a
P - 34	33.52 a	P - 37	20.41 a	Q - 19	14.61 a	G - 26	9.50 a
P - 63	30.70 a	P - 13	20.28 a	C - 755	14.31 a	C - 275	9.18 a
P - 28	30.47 a	T 5 - N	20.07 a	P - 35	14.09 a	T 6 - N	8.90 a
P - 12	29.81 a	G - 28	20.07 a	P - 3	13.90 a	G - 12	8.37 a
P - 44	29.23 a	Q - 18	20.06 a	G - 2	13.43 a	P - 27	8.27 a
C - 591	28.37 a	T 2 - P	19.85 a	C - 623	12.76 a	P - 33	8.02 a
P - 4	28.52 a	P - 68	19.19 a	P - 31	12.49 a	Q - 3	7.78 a
C - 675	26.38 a	P - 45	19.17 a	P - 30	12.06 a	P - 9	7.36 a
C - 625	25.78 a	C - 474	18.72 a	Q - 9	11.92 a	P - 61	6.93 a
C - 497	25.70 a	T 1 - P	18.54 a	P - 26	11.78 a	C - 566	6.52 a
C - 624	25.12 a	P - 24	18.28 a	P - 62	11.45 a	G - 24	6.19 a
C - 706	24.93 a	P - 47	18.26 a	P - 50	11.39 a	G - 16	5.62 a
P - 54	24.86 a	Q - 7	17.92 a	C - 600	11.30 a	C - 422	5.55 a
P - 51	24.62 a	C - 721	17.83 a	T 4 - N	11.20 a	C - 289	5.45 a
P - 46	24.46 a	P - 64	17.79 a	C - 713	11.13 a	C - 423	4.90 a
Q - 1	24.16 a	G - 6	17.70 a	Q - 11	11.10 a	C - 266	3.52 a
P - 53	23.87 a	T 3 - P	17.60 a	C - 599	11.02 a	C - 644	3.23 a
C - 555	22.62 a	C - 833	17.41 a	P - 52	10.71 a	P - 65	2.25 a
P - 49	22.26 a	P - 39	17.32 a	P - 22	10.67 a	P - 11	1.24 a
P - 66	21.98 a	C - 501	17.05 a	C - 298	10.61 a	Q - 20	1.13 a
C - 177	21.79 a	P - 23	16.02 a	C - 638	10.52 a	C - 634	0.50 a
G - 8	21.17 a	C - 674	15.97 a	Q - 15	10.33 a	C - 618	0.45 a

Las medias con las misma letra dentro de la columna son estadísticamente iguales (Tukey $P \leq 0.05$)

Apéndice 9. Prueba de Tukey del porcentaje de pudrición de mazorca del genotipo 2 de maíz inoculado con 94 aislamientos de *F. moniliforme* en el experimento de campo 1994

Trata- miento	Media	Trata- miento	Media	Trata- miento	Media	Trata- miento	Media
P - 62	101.19 a	P - 64	94.51 abc	Q - 18	90.19 abc	C - 713	85.60 abc
P - 36	100.18 a	C - 574	94.49 abc	P - 26	89.89 abc	P - 53	85.41 abc
P - 67	99.31 a	P - 50	94.44 abc	P - 39	89.75 abc	C - 566	85.41 abc
P - 35	99.11 a	C - 296	94.31 abc	C - 275	89.59 abc	C - 266	85.38 abc
P - 24	98.14 a	C - 523	94.10 abc	P - 30	89.03 abc	P - 61	85.26 abc
P - 66	97.69 a	P - 63	93.98 abc	C - 497	88.90 abc	C - 600	84.82 abcd
P - 48	97.66 a	Q - 28	93.91 abc	C - 501	88.72 abc	C - 721	84.76 abcd
P - 49	97.41 a	C - 675	93.88 abc	C - 638	88.62 abc	P - 45	84.65 abcd
P - 28	97.31 a	C - 706	93.37 abc	P - 37	88.23 abc	C - 269	84.54 abcd
P - 12	96.70 ab	C - 474	93.22 abc	T 3 - P	88.14 abc	P - 23	84.01 abcd
P - 46	96.37 abc	C - 709	93.02 abc	P - 11	88.05 abc	P - 51	83.88 abcd
P - 22	96.03 abc	P - 13	92.73 abc	Q - 24	87.91 abc	Q - 11	83.83 abcd
P - 65	95.97 abc	P - 6	92.36 abc	Q - 2	87.86 abc	C - 555	83.73 abcd
C - 476	95.94 abc	C - 177	92.31 abc	T 2 - P	87.80 abc	C - 644	83.18 abcd
P - 38	95.80 abc	Q - 1	91.59 abc	P - 33	87.57 abc	C - 618	83.14 abcd
C - 591	95.74 abc	T 1-P	91.57 abc	Q - 8	87.49 abc	Q - 15	82.61 abcde
C - 633	95.50 abc	P - 68	91.38 abc	Q - 3	87.44 abc	Q - 16	82.59 abcde
P - 27	95.16 abc	Q - 26	91.37 abc	P - 52	87.34 abc	Q - 9	81.98 abcde
P - 31	95.14 abc	C - 624	91.33 abc	Q - 10	87.29 abc	C - 423	79.55 abcde
P - 44	95.10 abc	P - 54	91.26 abc	C - 625	86.71 abc	C - 634	78.28 abcde
C - 599	95.10 abc	Q - 12	91.18 abc	P - 29	86.66 abc	C - 755	76.59 abcde
Q - 7	94.93 abc	C - 576	90.59 abc	Q - 6	86.62 abc	P - 3	69.21 bcde
C - 571	94.78 abc	Q - 19	90.29 abc	P - 4	86.57 abc	T 4 - N	68.65 cde
P - 34	94.55 abc	C - 520	90.23 abc	Q - 20	86.46 abc	T 6 - N	57.18 de
P - 9	94.51 abc	P - 47	90.20 abc	C - 422	86.04 abc	T 5 - N	54.70 e

Las medias con las misma letra dentro de la columna son estadísticamente iguales (Tukey $P \leq 0.05$)

Apéndice 10. Prueba de Tukey del número de granos con "Germinación prematura" del genotipo 2 de maíz inoculado con 94 aislamientos de *F. moniliforme* en el experimento de campo 1994

Trata- miento	Media	Trata- miento	Media	Trata- miento	Media	Trata- miento	Media
P - 64	72.23 a	C - 624	16.50 b	P - 47	9.30 b	Q - 28	5.35 b
C - 599	30.58 ab	P - 48	16.49 b	C - 422	9.22 b	C - 177	5.09 b
P - 27	27.78 ab	C - 520	16.31 b	P - 82	9.14 b	T 6 - N	5.04 b
P - 11	27.36 ab	P - 24	16.19 b	Q - 9	9.02 b	P - 65	4.95 b
P - 34	27.26 ab	C - 600	15.84 b	P - 53	8.92 b	P - 38	4.83 b
T 1 - P	26.52 b	P - 33	15.23 b	Q - 11	8.82 b	Q - 7	4.24 b
P - 46	24.70 b	C - 706	14.99 b	Q - 15	8.87 b	C - 755	4.03 b
Q - 1	24.24 b	C - 576	14.74 b	C - 574	8.54 b	P - 9	4.00 b
P - 8	23.91 b	Q - 12	14.42 b	C - 633	8.54 b	C - 497	3.71 b
P - 68	23.72 b	Q - 19	13.91 b	C - 618	7.78 b	C - 713	3.40 b
C - 476	22.68 b	P - 35	13.35 b	P - 66	7.67 b	C - 644	3.40 b
C - 591	22.52 b	P - 63	12.91 b	Q - 18	7.60 b	T 5 - N	3.30 b
P - 28	21.98 b	C - 571	12.30 b	T 4 - N	7.50 b	P - 30	1.58 b
P - 52	21.38 b	P - 22	12.20 b	P - 23	7.28 b	C - 501	1.31 b
P - 44	21.38 b	T 3 - P	12.08 b	P - 29	7.05 b	C - 523	1.23 b
Q - 6	20.35 b	P - 13	12.06 b	C - 298	7.03 b	Q - 24	1.15 b
Q - 2	18.88 b	P - 36	11.21 b	P - 4	6.95 b	Q - 8	1.04 b
P - 31	18.85 b	P - 61	10.89 b	C - 634	6.91 b	Q - 16	0.80 b
C - 474	18.81 b	C - 423	10.49 b	P - 37	6.90 b	Q - 20	0.46 b
P - 49	18.55 b	P - 26	10.42 b	P - 12	6.68 b	P - 39	0.03 b
P - 3	18.50 b	P - 45	9.87 b	C - 266	6.33 b	C - 275	-0.51* b
C - 625	17.93 b	C - 638	9.63 b	C - 555	5.80 b	C - 721	-0.95 b
P - 51	17.26 b	P - 67	9.54 b	Q - 10	5.50 b	Q - 26	-1.03 b
C - 709	16.65 b	P - 54	9.48 b	T 2 - P	5.44 b	C - 269	-1.28 b
P - 50	16.52 b	C - 566	9.38 b	C - 675	5.43 b	Q - 3	-2.90 b

* = Los valores negativos son equivalentes a cero (0)

Las medias con las misma letra dentro de la columna son estadísticamente iguales (Tukey $P \leq 0.05$)

Apéndice 11. Prueba de Tukey del porcentaje de mazorcas con "Germinación prematura" del genotipo 2 de maíz inoculado con 94 aislamientos de *F. moniliforme* en el experimento de campo 1994

Tratamiento	Media	Tratamiento	Media	Tratamiento	Media	Tratamiento	Media
P - 64	68.73 a	C - 423	33.12 ab	P - 29	24.21 ab	C - 633	17.79 ab
P - 46	58.11 ab	P - 37	32.46 ab	G - 2	23.91 ab	G - 9	17.64 ab
C - 476	46.93 ab	P - 52	31.96 ab	G - 16	23.07 ab	G - 18	17.15 ab
C - 624	44.28 ab	C - 638	31.49 ab	P - 9	22.67 ab	G - 15	15.61 ab
C - 576	44.17 ab	G - 20	31.18 ab	C - 523	22.33 ab	P - 38	14.54 ab
C - 591	42.96 ab	P - 3	30.90 ab	P - 54	22.10 ab	P - 30	14.10 ab
P - 50	42.56 ab	P - 33	30.74 ab	P - 13	21.97 ab	C - 644	13.88 ab
P - 27	42.50 ab	C - 671	30.57 ab	G - 11	21.55 ab	T 4 - N	13.80 ab
C - 474	42.16 ab	C - 177	30.43 ab	C - 298	21.44 ab	C - 721	13.66 ab
C - 520	41.04 ab	P - 66	30.34 ab	P - 49	20.66 ab	P - 53	13.52 ab
C - 706	39.24 ab	G - 12	28.83 ab	P - 68	20.63 ab	C - 600	13.32 ab
P - 26	38.94 ab	P - 12	28.73 ab	T 3 - P	20.25 ab	C - 275	13.26 ab
C - 625	38.06 ab	G - 7	28.72 ab	G - 20	20.14 ab	G - 10	13.13 ab
C - 497	37.11 ab	C - 566	28.43 ab	C - 755	19.91 ab	G - 19	12.66 ab
P - 28	36.11 ab	C - 422	28.13 ab	T 2 - P	19.83 ab	G - 26	12.18 ab
P - 62	35.68 ab	P - 4	27.02 ab	G - 24	19.72 ab	P - 23	11.33 ab
P - 34	34.68 ab	T 1 - P	26.51 ab	P - 67	19.70 ab	G - 8	11.30 ab
P - 36	34.51 ab	C - 599	26.34 ab	P - 38	19.55 ab	G - 28	10.78 ab
P - 11	34.29 ab	C - 675	26.20 ab	P - 65	19.54 ab	C - 501	10.14 ab
P - 63	34.13 ab	P - 24	26.09 ab	P - 61	19.39 ab	C - 634	6.49 b
P - 44	34.03 ab	P - 22	25.98 ab	C - 713	18.93 ab	C - 266	6.35 b
P - 51	33.55 ab	G - 6	25.96 ab	P - 35	18.88 ab	P - 39	6.27 b
C - 709	33.48 ab	P - 47	25.92 ab	P - 31	18.80 ab	T 5 - N	5.97 b
P - 45	33.46 ab	C - 618	25.50 ab	T 6 - N	18.33 ab	G - 3	5.83 b
P - 48	33.29 ab	G - 1	24.95 ab	C - 574	18.06 ab	C - 269	3.79 b

Las medias con las misma letra dentro de la columna son estadísticamente iguales (Tukey $P \leq 0.05$)

Apéndice 12.

Prueba de Tukey del peso de mil granos (g) del genotipo 2 de maíz inoculado con 94 aislamientos de *F. moniliforme* en el experimento de campo 1994

Tratamiento	Media	Tratamiento	Media	Tratamiento	Media	Tratamiento	Media
P - 3	248.50 a	T 1 - P	226.26 abcde	P - 8	207.10 abcde	P - 38	194.90 abcde
G - 8	247.40 ab	C - 523	224.70 abcde	C - 298	207.03 abcde	C - 574	193.82 abcde
C - 266	243.29 abc	G - 24	222.49 abcde	P - 48	206.04 abcde	P - 46	193.48 abcde
G - 26	242.41 abc	G - 10	219.18 abcde	P - 39	205.46 abcde	P - 24	193.00 abcde
C - 755	241.42 abcd	G - 16	219.06 abcde	C - 474	205.23 abcde	C - 675	191.85 abcde
C - 634	240.56 abcd	C - 638	218.68 abcde	C - 501	205.11 abcde	P - 28	190.83 abcde
C - 555	238.44 abcd	G - 3	218.07 abcde	P - 68	204.25 abcde	P - 19	190.53 abcde
T 6 - N	237.72 abcd	C - 422	217.66 abcde	C - 633	203.89 abcde	P - 35	190.08 abcde
C - 721	236.24 abcd	G - 28	217.00 abcde	P - 53	203.85 abcde	P - 50	188.61 abcde
T 4 - N	236.21 abcd	G - 2	216.16 abcde	P - 52	203.53 abcde	P - 36	188.15 abcde
G - 9	234.33 abcde	C - 520	215.17 abcde	P - 33	202.49 abcde	P - 65	188.13 abcde
T 5 - N	234.01 abcde	C - 624	213.38 abcde	P - 22	202.16 abcde	P - 34	187.90 abcde
C - 423	233.27 abcde	P - 64	213.33 abcde	G - 18	200.88 abcde	P - 29	187.05 abcde
C - 269	232.41 abcde	C - 618	213.31 abcde	P - 9	200.58 abcde	P - 37	186.74 abcde
P - 11	230.74 abcde	P - 4	213.12 abcde	P - 45	200.46 abcde	C - 177	186.19 abcde
P - 26	230.45 abcde	C - 709	210.69 abcde	G - 15	198.91 abcde	C - 571	186.05 abcde
G - 20	230.29 abcde	G - 12	210.49 abcde	P - 30	198.87 abcde	C - 599	184.50 bcde
C - 713	229.46 abcde	C - 625	210.27 abcde	T 2 - P	198.44 abcde	P - 66	184.13 bcde
C - 497	229.28 abcde	G - 11	209.70 abcde	P - 47	198.09 abcde	P - 12	184.12 bcde
T 3 - P	228.50 abcde	C - 706	209.57 abcde	C - 476	197.70 abcde	P - 13	184.03 cde
C - 600	228.17 abcde	C - 576	209.40 abcde	P - 44	197.55 abcde	P - 27	182.18 cde
P - 23	227.63 abcde	C - 591	208.88 abcde	P - 67	197.22 abcde	P - 63	181.59 cde
C - 644	226.98 abcde	P - 61	208.55 abcde	P - 31	196.84 abcde	P - 49	180.61 cde
G - 6	226.80 abcde	C - 566	208.08 abcde	P - 62	196.05 abcde	P - 48	178.31 de
C - 275	226.76 abcde	G - 1	207.47 abcde	G - 7	195.36 abcde	P - 54	172.64 e

Las medias con las misma letra dentro de la columna son estadísticamente iguales (Tukey $P \leq 0.05$)

Apéndice 13. Prueba de Tukey del peso total de granos (g) del genotipo 2 de maíz inoculado con 94 aislamientos de *F. moniliforme* en el experimento de campo 1994

Trata- miento	Media	Trata- miento	Media	Trata- miento	Media	Trata- miento	Media
P - 23	578.03 a	G - 8	385.35 ab	G - 12	331.27 abc	C - 638	290.08 abc
T 4 - N	538.34 a	P - 52	384.53 ab	P - 13	330.67 abc	P - 64	290.01 abc
C - 555	533.40 a	P - 3	380.84 ab	P - 47	330.36 abc	C - 624	289.96 abc
C - 423	532.74 a	C - 600	378.74 ab	P - 4	328.51 abc	C - 476	289.92 abc
P - 53	493.22 ab	G - 16	377.04 ab	P - 45	328.32 abc	P - 68	289.71 abc
T 5 - N	491.01 ab	C - 721	373.56 ab	P - 24	327.74 abc	C - 591	286.96 abc
G - 20	482.30 ab	C - 298	362.75 ab	G - 28	327.54 abc	C - 566	286.60 abc
G - 26	480.29 ab	P - 33	361.59 abc	P - 50	327.53 abc	C - 571	281.47 abc
C - 269	475.11 ab	C - 275	361.50 abc	P - 29	326.70 abc	P - 34	280.78 abc
C - 755	463.85 ab	C - 520	358.05 abc	C - 599	321.43 abc	C - 523	278.60 abc
C - 618	459.90 ab	G - 19	355.52 abc	P - 35	318.73 abc	P - 27	278.19 abc
T 1 - P	422.24 ab	P - 26	352.40 abc	P - 46	313.50 abc	P - 38	277.22 abc
T 6 - N	441.85 ab	C - 709	350.65 abc	C - 706	312.26 abc	P - 49	274.89 abc
P - 11	433.39 ab	C - 474	342.71 abc	P - 31	312.01 abc	P - 28	271.77 abc
G - 3	430.57 ab	G - 11	342.71 abc	G - 24	311.64 abc	G - 15	270.87 abc
P - 51	430.19 ab	G - 1	341.62 abc	T 3 - P	303.97 abc	P - 62	269.62 abc
G - 9	426.61 ab	C - 497	340.01 abc	P - 48	302.93 abc	P - 9	267.70 abc
C - 266	418.21 ab	P - 30	337.77 abc	P - 61	300.36 abc	P - 44	266.65 abc
G - 10	418.14 ab	T 2 - P	337.21 abc	P - 22	300.06 abc	P - 54	262.01 abc
G - 6	407.24 ab	P - 8	337.09 abc	C - 574	298.97 abc	P - 65	256.33 abc
C - 713	404.99 ab	P - 37	335.70 abc	C - 644	298.58 abc	C - 675	251.74 abc
P - 39	397.41 ab	C - 422	334.90 abc	P - 63	297.21 abc	C - 633	251.20 abc
P - 67	392.34 ab	C - 625	334.79 abc	G - 7	294.70 abc	P - 36	249.46 abc
C - 634	389.48 ab	G - 18	332.74 abc	C - 576	293.66 abc	P - 66	242.59 abc
G - 2	388.27 ab	C - 501	332.53 abc	C - 177	290.09 abc	P - 12	168.77 bc

Las medias con las misma letra dentro de la columna son estadísticamente iguales (Tukey $P \leq 0.05$)

Apéndice 14. Prueba de Tukey de 4 variables evaluadas en 18 genotipos de maíz inoculados con aislamientos de *F. moniliforme*, en el experimento de campo 1995

NGGP		PMG (g)		PTG (g)		DFF	
N° G*	Media**	N° G	Media	N° G	Media	N° G	Media
3	3.2 a	13	216.1 a	13	358.1 a	7	53.3 a
6	3.0 a	14	196.7 ab	14	295.3 ab	1	48.1 ab
12	2.6 a	1	189.4 ab	12	253.3 abc	16	46.9 ab
17	2.2 a	18	188.3 ab	18	238.5 abc	2	46.9 ab
13	2.2 a	8	176.2 ab	15	235.1 abc	6	46.8 ab
4	2.1 a	5	165.8 ab	3	231.3 abc	10	46.5 ab
18	2.0 a	12	165.7 ab	10	219.7 abc	17	45.9 ab
9	1.9 a	9	164.3 ab	16	215.6 abc	5	45.8 ab
5	1.9 a	17	159.5 ab	5	205.0 abc	8	45.7 ab
10	1.8 a	4	158.4 ab	9	198.8 abc	15	45.4 ab
16	1.8 a	3	157.0 ab	8	196.2 abc	18	45.3 ab
14	1.6 a	7	156.9 ab	11	168.7 abc	3	45.1 ab
15	1.0 a	11	153.1 ab	17	162.7 abc	9	44.8 ab
11	0.9 a	2	150.1 b	2	155.3 abc	4	44.7 ab
7	0.7 a	15	146.6 b	6	139.1 bc	12	43.1 ab
1	0.6 a	10	146.3 b	4	136.3 bc	11	42.5 ab
8	0.5 a	16	146.0 b	7	81.7 c	14	35.9 b
2	0.2 a	6	145.6 b	1	74.6 c	13	33.9 b

* = El número corresponde al genotipo de maíz asignado en la Tabla 4

** = Las medias con la misma letra dentro de la columna son estadísticamente iguales (Tukey $P \leq 0.05$)

Variables: **NGGP** = Número de granos con germinación prematura transformados mediante Log (NGGP + 1), **PMG** = Peso de mil granos, **PTG** = Peso total de granos y **DFF** = Días a floración femenina transformada mediante Box Cox ($\lambda = -0.6$)

Apéndice 15. Valores de Rf y concentración de zearalenona ($\mu\text{g}/\text{kg}$) en las muestras de los genotipos 1 y 2 de maíz del experimento de campo 1994

Tratamientos	Rf en el genotipo 1			Rf en el genotipo 2			Concentración de ZEA en el genotipo 1			Concentración de ZEA en el genotipo 2		
	Repeticiones			Repeticiones			Repeticiones			Repeticiones		
	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III
1. T 1-P*	0.74	0.71	0.71	0.71	-	0.75	795.336	296.35	832.518	855.472	0	195.206
2. T 2-P	0.72	0.71	-	0.71	0.74	0.80	1325.756	416.456	0	807.04	1990.488	68.48
3. T 3-P	0.73	0.71	0.70	0.71	0.72	0.87	288.152	0	827.92	352.87	906.52	567.886
4. T 4-N**	0.73	-	0.70	0.73	0.79	0.77	588.41	0	1268.696	375.21	826.848	387.94
5. T 5-N	0.73	0.74	0.70	-	-	0.77	649.48	1050.034	488.28	0	0	0
6. T 6-N	0.74	0.75	0.70	0.76	-	0.77	436.962	524.394	616.14	468.29	0	36.704
7. P-3	0.73	0.76	-	0.70	0.76	0.86	1118.29	173.082	0	16.258	142.778	80.416
8. P-34	0.72	0.77	0.75	0.67	0.76	0.75	1604.502	261.144	762.466	122.46	0	420.412
9. P-44	0.72	-	0.72	0.75	-	0.87	2039.474	0	189.646	646.33	0	152.23
10. P-64	0.72	0.73	0.72	0.78	0.75	0.77	1243.074	11.996	534.214	1030	94.418	389.378
11. C-269	-	0.71	0.72	-	-	-	0	499.22	595.016	0	0	0
12. C-591	0.74	0.71	0.70	0.73	0.74	-	1387.692	382.774	252.548	0	82.618	0
13. C-634	0.71	0.71	-	0.66	-	-	887.374	327.874	0	505.734	0	0
Media de las muestras = 0.73												

Rf del estándar de ZEA	0.74	0.75	0.74	0.75	0.75	0.77	Media: 0.75
-------------------------------	------	------	------	------	------	------	--------------------

* = Tratamientos testigo con herida en el lote T (1, 2 y 3)-P.

** = Tratamientos testigo sin herida en el lote T (4, 5 y 6)-N.

- = No se detectó.

Apéndice 16. Valores de Rf y concentración de zearalenona (ZEA) en muestras de maíz del experimento de campo 1995

Factores		Valores de Rf			Concentración de ZEA (µg/kg)		
		Repeticiones			Repeticiones		
Genotipos de maíz	Aislamientos del hongo	I	II	III	I	II	III
1. 2 *	Testigo	0.81	-	0.66	276.677	0	19.05
2. 2	C-591	0.81	0.68	0.67	386.489	0	0
3. 2	P-12	0.81	-	0.68	117.64	0	0
4. 2	P-44	0.81	0.68	0.68	298.459	0	0
5. 2	P-64	0.81	-	-	71.085	0	0
6. 3	Testigo	0.81	0.67	0.68	227.788	121.757	0
7. 3	C-591	-	0.68	-	0	0	0
8. 3	P-12	0.82	-	0.60	0	0	0
9. 3	P-44	0.81	-	-	363.982	0	0
10. 3	P-64	0.82	-	0.70	0	0	0
11. 13	Testigo	-	0.66	0.68	0	303.199	0
12. 13	C-591	0.70	0.66	-	0	98.252	0
13. 13	P-12	0.70	0.67	-	0	0	0
14. 13	P-44	0.68	0.67	-	0	97.27	0
15. 13	P-64	0.70	0.67	0.69	42.233	0	51.343
Media de las muestras = 0.72							

Rf del estándar de ZEA	0.80	0.74	0.69	0.66	Media: 0.72
-------------------------------	------	------	------	------	--------------------

* = El número corresponde al genotipo de maíz asignado en la Tabla 4

- = No se detectó

Apéndice 17. Valores de Rf y concentración de toxina T-2 ($\mu\text{g}/\text{kg}$) en las muestras de los genotipos 1 y 2 de maíz del experimento de campo 1994

Tratamientos	Valores de Rf en el genotipo 1			Valores de Rf en el genotipo 2			Concentración de T-2 en el genotipo 1			Concentración de T-2 en el genotipo 2		
	Repeticiones			Repeticiones			Repeticiones			Repeticiones		
	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III
1. T 1-P*	-	-	0.26	0.19	0.18	-	0	0	135.469	135.307	2399.222	0
2. T 2-P	-	0.18	0.19	0.19	-	-	0	182.427	176.132	164.679	0	0
3. T 3-P	-	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	0
4. T 4-N**	-	0.18	0.19	-	-	-	0	150.074	104.585	0	0	0
5. T 5-N	-	-	0.19	-	-	-	0	0	145.266	0	0	0
6. T 6-N	-	-	0.19	-	-	-	0	0	156.057	0	0	0
7. P-3	-	0.21	0.19	-	-	-	0	108.187	315.246	0	0	0
8. P-34	-	0.19	0.20	-	-	0.16	0	168.540	184.6	0	0	171.469
9. P-44	-	0.20	-	-	-	0.16	0	128.486	0	0	0	393.485
10. P-64	0.21	-	-	-	-	0.16	85.735	0	0	0	0	340.59
11. C-269	-	0.22	-	0.20	0.20	-	0	175.402	0	811.77	0	0
12. C-591	-	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	0
13. C-634	-	0.24	0.19	-	-	-	0	112.892	220.921	0	0	0
Media de las muestras = 0.19												

Rf del estándar de T-2	0.15	0.18	0.24	0.20	0.19	0.19	0.16	0.19	0.16	Media: 0.18
------------------------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	-------------

* = Tratamientos testigo con herida en el elote T (1, 2 y 3)-P

** = Tratamientos testigo sin herida en el elote T (4, 5 y 6)-N

- = No se detectó

Apéndice 18. Valores de Rf y concentración de toxina T-2 en muestras de maíz del experimento de campo 1995

Factores		Valores de Rf			Concentración de T-2 (µg/kg)		
		Repeticiones			Repeticiones		
Genotipos de maíz	Aislamientos del hongo	I	II	III	I	II	III
1. 2 *	Testigo	-	-	0.34	0	0	160.99
2. 2	C-591	0.39	-	0.32	186.933	0	0
3. 2	P-12	0.36	0.30	0.31	0	0	0
4. 2	P-44	0.34	0.30	0.33	196.289	0	0
5. 2	P-64	0.35	-	0.26	178.539	0	157.217
6. 3	Testigo	0.36	0.32	0.28	257.203	0	0
7. 3	C-591	-	0.33	0.31	0	173.481	158.002
8. 3	P-12	0.43	0.33	0.32	193.499	170.521	0
9. 3	P-44	0.40	0.32	0.33	278.767	172.926	0
10. 3	P-64	-	0.33	0.35	0	0	0
11. 13	Testigo	-	0.32	0.34	0	0	161.03
12. 13	C-591	-	0.32	0.33	0	170.166	0
13. 13	P-12	-	0.32	0.34	0	161.541	0
14. 13	P-44	-	0.33	0.33	0	168.705	159.03
15. 13	P-64	-	0.33	-	0	170.184	0
Media de las muestras = 0.33							

Rf del estándar de T-2	0.32	0.29	0.31	0.29	0.29	Media: 0.30
------------------------	------	------	------	------	------	-------------

* = El número corresponde al genotipo de maíz asignado en la Tabla 4

- = No se detectó

Apéndice 19. Valores de Rf y concentración de diacetoxiscirpenol (DAS) en las muestras del genotipo 2 de maíz del experimento de campo 1994

Tratamientos	Valores de Rf			Concentración de DAS ($\mu\text{g}/\text{kg}$)		
	Repeticiones			Repeticiones		
	I	II	III	I	II	III
1. T 1-P*	-	-	0.13	0	0	608.948
2. T 2-P	-	-	0.14	0	0	419.643
3. T 3-P	0.15	-	0.14	52.114	0	673.443
4. T 4-N**	-	-	-	0	0	0
5. T 5-N	-	-	0.14	0	0	469.762
6. T 6-N	-	0.12	0.13	0	132.219	58.778
7. P-3	-	0.11	0.14	0	555.375	75.005
8. P-34	-	0.15	-	0	0	0
9. P-44	-	0.14	-	0	109.346	0
10. P-64	-	-	-	0	0	0
11. C-269	-	0.13	-	0	153.208	0
12. C-591	-	0.15	0.15	0	0	133.77
13. C-634	-	0.13	0.15	0	318.273	0
Media de las muestras = 0.14						

Rf del estándar de DAS	0.13	0.14	0.16	0.14	0.14	0.15	0.13	0.14	Media: 0.14
------------------------	------	------	------	------	------	------	------	------	-------------

* = Tratamientos testigo con herida en el elote T (1, 2 y 3)-P

** = Tratamientos testigo sin herida en el elote T (4, 5 y 6)-N

- = No se detectó

Nota: No se detectó DAS en ninguna muestra del genotipo 1

Apéndice 20. Valores de Rf y concentración de diacetoxiscirpenol (DAS) en muestras de maíz del experimento de campo 1995

Factores		Valores de Rf			Concentración de DAS (µg/kg)		
		Repeticiones			Repeticiones		
Genotipos de maíz	Aislamientos del hongo	I	II	III	I	II	III
1. 2 *	Testigo	-	0.24	0.27	0	453.148	32.251
2. 2	C-591	0.23	-	-	55.674	0	0
3. 2	P-12	0.22	0.23	0.24	90.356	172.193	83.971
4. 2	P-44	0.22	0.24	-	0	213.305	0
5. 2	P-64	0.22	-	0.22	84.905	0	244.909
6. 3	Testigo	0.22	0.26	0.22	199.818	75.556	57.124
7. 3	C-591	0.23	0.26	0.23	185.247	83.844	129.628
8. 3	P-12	0.23	0.25	-	172.199	210.941	0
9. 3	P-44	0.24	0.26	0.24	164.616	139.842	247.537
10. 3	P-64	-	0.26	0.26	0	161.597	51.856
11. 13	Testigo	0.26	-	0.33	116.964	0	146.16
12. 13	C-591	0.25	0.26	-	63.048	138.121	0
13. 13	P-12	0.24	0.27	0.33	175.756	143.253	387.492
14. 13	P-44	0.24	-	0.25	122.479	0	200.911
15. 13	P-64	0.23	-	-	107.098	0	0
Media de las muestras = 0.25							

Rf del estándar de T-2	0.24	0.24	0.26	0.25	0.25	Media: 0.25
------------------------	------	------	------	------	------	-------------

* = El número corresponde al genotipo de maíz asignado en la Tabla 4

- = No se detectó