

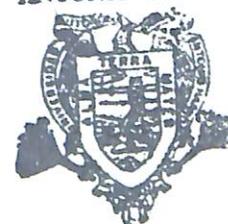
ANALISIS MICOLOGICO DE SEMILLA DE MAIZ Y
EVALUACION DE ENSAYOS PARA DETECCION
DE *Fusarium moniliforme* Sheldon.

ADRIANA NATIVIDAD AVENDAÑO LOPEZ

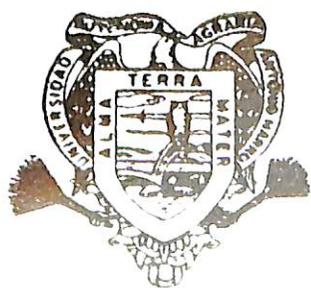
T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS
EN TECNOLOGIA DE SEMILLAS

Universidad Autónoma Agraria
"ANTONIO NARRO"



BIBLIOTECA



Universidad Autónoma Agraria
Antonio Narro

PROGRAMA DE GRADUADOS

Buenavista, Saltillo, Coah.

ABRIL DE 1997

Tesis elaborada bajo la supervisión del comité particular de asesoría y aprobada
como requisito parcial, para optar al grado de

**MAESTRO EN CIENCIAS
EN TECNOLOGIA DE SEMILLAS**

COMITE PARTICULAR

Asesor Principal :


M.C. Leticia A. Bustamante Garcia

Asesor :


M.C. Abiel Sánchez Arizpe

Asesor :


M.C. Humberto De León Castillo

Asesor :


Dr. Ernesto Moreno Martínez


Dr. Jesús Manuel Fuentes Rodríguez
Subdirector de Postgrado

DEDICATORIA

A mis padres, Alfonso Avendaño y Elisa López con amor, por su ejemplo de compromiso en el trabajo y por enseñarme los valores necesarios para ser feliz en cada etapa de mi vida. A mis hermanos con cariño, especialmente a quienes no han tenido mis oportunidades.

GRACIAS

A Dios, por darme una vida con propósito manifestándose a través de todas las personas con quienes convivo, porque siempre es más lo que debo agradecerle que pedirle.

A la M.S. Leticia A. Bustamante García por compartir conmigo su tiempo, sus conocimientos y sobre todo por acercarme más a Dios.

Al Dr. Abiel Sánchez Arizpe, por sus enseñanzas y por sus consejos en la realización de este trabajo y por su bondad.

Al M.C Humberto de León Castillo, por su amistad, su ejemplo de dedicación al trabajo y su profesionalismo.

Al Dr. Ernesto Moreno Martínez, por sus comentarios.

A mis compañeros Filiberto Herrera y Martín Quintana, por lo que aprendí de ellos y con ellos porque se que coincidimos por un propósito para nuestras vidas.

A Teresa Ruiz y Rosa Helia Valdez, con cariño y admiración por su ejemplo de superación y su valor para superar los obstáculos.

Al M.C. José Angel Daniel, por su amistad, por su ayuda y por todos los momentos agradables compartidos en la realización de este trabajo.

Al Dr. Jesús Ortega Pérez, por su apoyo, sus consejos y por su amistad.

A todos los Maestros del Centro de Capacitación y Desarrollo de Tecnología de Semillas (C.C.D.T.S.) por la oportunidad de superación, por compartir su tiempo y conocimientos durante mi formación.

*Al personal del Laboratorio de Análisis de Semillas del C.C.D.T.S. **Alejandra, Sandra y Diana**, así como a **Jovita**, por su amistad y ayuda en la realización de mis estudios y de este trabajo .*

A los alumnos y compañeros del C.C.D.T.S. por todos los momentos que compartimos.

*A **Leila Vázquez y Clarissa Sánchez** del Laboratorio de Sanidad de Semillas del CIMMYT, por su ayuda incondicional para la realización de este trabajo.*

*Al **M.C. Elías Sandoval Islas y M.C. José Sánchez Martínez** por todo el apoyo recibido durante la realización de mis estudios.*

*Al **M.C. Santiago Sánchez, Salvador González, María Luisa García, Jose Miguel Padilla, Juan Fco. Casas, Luis Arellano y Jose Pablo Torres**, por su amistad, su constante motivación y compañerismo.*

*A **Silvia, Toñeta, Judith Y Lupita** porque con ellas aprendí lo importante que es ser amigo a compartir, perdonar y escuchar y por todas las pruebas que superamos **juntas**.*

*A **Arcenio Jaramillo, Carlos Bermúdez, Raúl Tafoya, José Antonio Utrera y Jesús Vázquez**, por su amistad incondicional y por todos los momentos agradables que vivimos..*

*A **Paty, Luisa y Ale Méndez**, sobrinas y amigas de toda la vida.*



A la Universidad Autónoma Agraria "Antonio Narro"

y a la Universidad de Guadalajara

por la oportunidad de estudiar y lograr una meta en mi vida profesional.

COMPENDIO

Análisis micológico de semilla de maíz y evaluación de ensayos para detección de *Fusarium moniliforme* Sheldon..

POR

ADRIANA NATIVIDAD AVENDAÑO LOPEZ.

*MAESTRO EN CIENCIAS
EN TECNOLOGIA DE SEMILLAS*

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA "ANTONIO NARRO"

BUENAVISTA, SALTILLO, COAHUILA ABRIL DE 1997.

M.S. LETICIA A. BUSTAMANTE GARCIA - Asesor-

Palabras clave: Semilla de maíz, sanidad de semillas, *Fusarium moniliforme*, ensayos de sanidad.

Se realizó un análisis sanitario de micoflora patógena en 23 lotes de semilla de maíz, 6 de los cuales fueron producidos en Tamaulipas y 17 en la región Bajío de México (que comprende los estados de Jalisco, Michoacán, Querétaro y Guanajuato) .

Los objetivos fueron, conocer el estado fitosanitario de los lotes respecto a su micoflora patógena; determinar el nivel de incidencia del hongo *Fusarium moniliforme* Sheldon, causante de pudriciones en tallo y mazorca en maíz, dada la alta incidencia de éste en las regiones en que fueron producidos los materiales, debido a las condiciones climatológicas como temperaturas bajas y alta humedad relativa, que son determinantes en el desarrollo del mismo. Además se evaluaron cuatro metodologías de ensayos sanitarios para detectar *F. moniliforme*, ya que éste es considerado como transmisible por semilla .

La determinación de la condición sanitaria se realizó mediante los ensayos de incubación; en Papa Dextrosa Agar (PDA); incubando en papel filtro con congelamiento o

Blotter y con un ensayo de germinación para sanidad, cuantificando la incidencia por patógeno y en germinación además el porcentaje de plántulas dañadas por hongo, encontrando *Penicillium* spp., *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Fusarium* spp. y *Fusarium moniliforme*.

Los niveles de incidencia entre lotes fueron significativamente diferentes, los rangos de incidencia total de micoflora a su vez fueron de 0 a 16 por ciento en PDA, de 4 a 50 por ciento en Blotter y de 4 a 30 por ciento en germinación para sanidad, lo que indica que existen diferencias en sanidad de semilla comercial. Se confirmó además la incidencia de *Fusarium moniliforme* en los 23 lotes analizados.

Fueron comparados entre sí tanto los niveles de incidencia de *Fusarium moniliforme* de los ensayos de incubación, además de dos ensayos de observación directa, en el primero se cuantificó el porcentaje de semilla con algún tipo de manchado en peso, el segundo consistió en la cuantificación del porcentaje de semilla con manchado café, rosado y blanco (tipo estrías) .

Encontrando una correlación entre el grado de manchado de la semilla y la incidencia de micoflora patógena presente en ésta, además en el caso de incidencia *F. moniliforme*, se detectó correlación entre ésta y la semilla con manchado blanco rayado, considerando por tanto a este tipo de manchado como un indicador auxiliar de la presencia de este patógeno en la semilla.

El ensayo que se consideró de mayor eficiencia y sensibilidad en la detección de *F. moniliforme* fue el de incubación en papel filtro o “Blotter” debido a que detectó mayores niveles de incidencia que el resto de ensayos, así como por su facilidad de establecimiento, manejo y evaluación.

ABSTRACT

Seed Health Testing of corn seed lots regarding to *Fusarium moniliforme* Sheldon.

By

Adriana Natividad Avendaño López

Master of Science

Seed Technology

Universidad Autónoma Agraria "Antonio Narro"

Buena Vista, Saltillo, Coahuila. April of 1997

M. Sc. Leticia A. Bustamante García -Advisor-

Key words: Corn seed lots, Seed health tests, *Fusarium moniliforme*.

The mycological seed condition of 23 corn seed lots was determined in different seed health tests, and the potential of these tests was assessed regarding to detection of *Fusarium moniliforme* causal agent of corn stalk rot in the cob, and high incidence in the different areas where seed lots were produced, and considered as a seed-borne pathogen.

To determine the pathogenic mycoflora the incubation tests potato-dextrosa agar (PDA) plating, deep freezing blotter and standard germination with cholrine pretreated seeds and under sterile conditions, where carried out. The incidence of fungal infection and the damaged seedlings were recorded in the different tests. The mayor fungi detected were *Penicillium* spp. *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Fusarium* spp. and *Fusarium moniliforme*.

The level of infection was significantly different the seed lots. The total incidence of pathogenic mycoflora was 0 to 16 percentaje in PDA, 4 to 50 percentage un blotter and 4 to 30 percentage on standard germination, and the incidence *F. moniliforme* was confirmed.

The infection levels of *Fusarium moniliforme* detected in incubation tests were compared with two direct observation tests, where spotted seed (brownish, pinkish and white tripy) were recorded in percentage by weigth and number.

A significant correlation between the level of spotted seed white stripy and the incidence of *F. moniliforme* was encountered. At the same time the percentage of damaged seedlings (soft tissue and pinkish or brownish color in root or plumule) was significantly correlated with *F. moniliforme* incidence.

Therefore the spotted seed (mainly pinkinsh seed) appered to be a good indicator of *F. moniliforme* infection in corn seed lots. The most reliable seed health test for detection of this pathogen resulted to be the deep freezing blotter because of its sensibility to detected the highest levels of infection of the pathogen, and for its easy handling and establishment.

INDICE DE CONTENIDO

	Página
INDICE DE CUADROS.....	x
INDICE DE FIGURAS.....	Xi
INTRODUCCION.....	1
Objetivos e hipótesis.....	4
REVISION DE LITERATURA.....	5
Atributos de Calidad de la Semilla.....	5
La Semilla como transmisor de enfermedades.....	9
Enfermedades del maíz transmitidas por semilla.....	14
Taxonomía del género <i>Fusarium</i>	19
Ensayos de sanidad de semillas.....	21
Sin incubación de la muestra.....	24
Incubación de la muestra.....	25
Ensayo de Germinación.....	
MATERIALES Y METODOS.....	32
Material experimental.....	32
Manejo del material experimental.....	33
Ensayos evaluados.....	34
Ensayos de incubación.....	34
Ensayos de observación directa.....	38
Identificación de Especies.....	38
Análisis estadístico.....	40
RESULTADOS Y DISCUSION.....	42
Micoflora patógena.....	42
Detección de <i>Fusarium moniliforme</i>	52
CONCLUSIONES.....	60

RESUMEN.....	61
LITERATURA CITADA.....	64
APENDICE.....	69

INDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
4.1	Cuadrados medios de las variables de micoflora patógena en lotes de semilla comercial de maíz. UAAAN 1995	44
4.2	Micoflora patógena (% de incidencia) en lotes de semilla comercial de maíz detectada en ensayos de sanidad. UAAAN 1995	45
4.3	Micoflora patógena (% de incidencia) en lotes de semilla comercial de maíz detectada en ensayos de sanidad. UAAAN 1995	48
4.4	Resultados de correlación entre los niveles de incidencia de micoflora en lotes de semilla comercial de maíz en diferentes ensayos de sanidad. UAAAN 1995	49
4.5	Cuadrados medios de la variable incidencia de <i>Fusarium moniliforme</i> (%) en lotes de semilla comercial de maíz en diferentes ensayos de sanidad. UAAAN 1995	52
4.6	Incidencia de <i>Fusarium moniliforme</i> (%) en lotes de semilla comercial de maíz, detectada en ensayos de sanidad. UAAAN 1995	53
4.7	Resultados de correlación entre los niveles de incidencia con <i>Fusarium moniliforme</i> detectados en lotes de semilla comercial de maíz en ensayos de sanidad. UAAAN 1995	56

INDICE DE FIGURAS

Figura	Página
4.1 Incidencia total de micoflora patógena en lotes de semilla comercial de maíz en ensayos de sanidad. UAAAN 1995.	51
4.2 Incidencia de <i>F. moniliforme</i> en lotes de semilla comercial de maíz en ensayos de incubación. UAAAN 1995.	58

INTRODUCCION

La importancia de las semillas en la agricultura es indiscutida, reconociéndosele como elemento básico del progreso agrícola en el mundo; que persigue incrementos en la producción, preservando el patrimonio Fitogenético y el medio ambiente.

Un atributo de calidad de las semillas es la **Sanidad**, o condición sanitaria que está determinada por la presencia de agentes patógenos como hongos, bacterias, virus y nemátodos presentes en la misma, patógenos que pueden generar trastornos como alteraciones fisiológicas en la semilla, que aceleran su proceso de deterioro y generan pérdidas importantes al no haber un desarrollo normal desde las etapas tempranas de la planta, así mismo la infección del cultivo, que puede repercutir en serias pérdidas de producción además de convertir a las semillas en transmisor y dispersor de patógenos.

La circulación de semilla "sana" evita la transmisión e introducción de enfermedades, ya que son las semillas una de las formas más eficaces de dispersión de un patógeno, debido a la íntima asociación de éste y su hospedero, (Warham, 1984). La movilización de las semillas durante la comercialización, así

como los intercambios e introducciones de germoplasma en los programas de fitomejoramiento son en muchos casos móvil de introducción y transportación de patógenos; ya que el 90 por ciento de los cultivos alimenticios se propagan por semilla, la diseminación y sobrevivencia de la flora patógena hospedada en ésta, debe ser un factor considerado en todo programa de producción.

De los microorganismos transmisibles por semilla se encuentran con mayor frecuencia inoculando a éstas, los hongos, debido a su mayor capacidad de penetración, reproducción y formación de estructuras de reposo que les permiten mantenerse latentes durante largos periodos, viviendo como parásitos o saprófitos facultativos.

Debido a que el Maíz es la base de la alimentación tradicional en México, y cuenta con una superficie de siembra de 7 211 850 Ha demanda semilla que cumpla con estándares de calidad establecidos y libre de patógenos transmitidos por semilla como el hongo *Fusarium moniliforme* Sheldon, estado asexual de *Giberella fujikuroi* causante de una de las enfermedades de mayor importancia económica en este cultivo como son las pudriciones del tallo y mazorca que pueden llegar a causar la pérdida total de la producción.

Se ha encontrado que las zonas de mayor incidencia en México de este patógeno son la zona Bajío (que comprende los estados de Jalisco, Michoacán,

Querétaro y Guanajuato) así como el Norte de Tamaulipas, áreas importantes de producción de grano y semilla.

Fusarium moniliforme es considerado como patógeno "transmisible por semilla" de acuerdo a McGee (1988) y Neergaard (1979), no obstante cabe señalar que la semilla no es el único mecanismo de infección de este patógeno ya que la severidad de las pudriciones dependen de la susceptibilidad de las variedades cultivadas, la agresividad del patógeno y de las condiciones ecoambientales del área de cultivo. Así mismo, el inóculo puede estar en el suelo y las esporas son capaces de introducirse a la planta desde esta fuente por medio del viento. Por lo tanto no es posible controlar todos los factores causantes del inóculo, pero sí disminuir su introducción a través de semilla, sobre todo en aquellas zonas de baja incidencia.

Los ensayos de sanidad en semillas son utilizados para detectar la incidencia de patógenos en lotes de semilla y aplicar medidas de cuarentena, conocer la condición sanitaria de los lotes como un elemento más de juicio que determine su valor de siembra, y tomar decisiones respecto al tratamiento químico. Sin embargo, en México estos ensayos no se utilizan en forma de rutina y en Certificación, solo se recurre a ellos en situaciones que lo ameriten, todo esto debido a que algunas metodologías requieren demasiado tiempo para propósitos prácticos, requiriéndose técnicas específicas para los diferentes patógenos y por la falta de personal capacitado en patología de semillas.

REVISION DE LITERATURA.

Atributos de Calidad de la Semilla

La semilla, más que un óvulo fecundado y maduro es un ente vivo que encierra en sí un potencial genético cuya función principal es la prolongación de la vida y preservación de su especie, menciona Popinigis (1985). De ahí que la semilla no es solo un insumo más del proceso de producción agrícola. Garay (1989), considera a la semilla como un constituyente imprescindible y esencial de la tecnología teniendo un valor estratégico ya que eficientiza los recursos y demás insumos durante la producción agrícola.

Inmerso en la semilla, se encuentra un genotipo seleccionado que expresará las características fenotípicas de éste y ha sido obtenido a través de un largo proceso de selección, formación y evaluación, cuyo objetivo final es garantizar al agricultor un producto de la mayor **calidad**.

El valor comercial de una semilla como un producto terminado, dependerá de varios factores; Moreno (1984), señala que la capacidad de las semillas para germinar y producir una planta normal, es uno de los primeros atributos a

considerar para determinar su calidad, sin embargo, resulta indispensable considerar durante su manejo y comercialización otras características físicas y biológicas.

Copeland y McDonald (1985), Thomson (1979) y Peretti (1994) enumeran como componentes de la calidad de una semilla a los siguientes:

El **Físico**, que comprende el contenido de humedad (que deba ser bajo y favorezca su conservación), ausencia de contaminantes físicos como presencia de semillas extrañas y un bajo contenido de materia inerte así como la homogeneidad del lote el peso y tamaño de las semillas.

Un componente **Génético**, cuyo factor de calidad medible es La Pureza Varietal, que garantiza autenticidad del material obtenido, así como la no presencia de mezclas físicas, como semillas de otras variedades o cruzamiento genético.

El Potencial **Fisiológico** determinado por la emergencia y desarrollo del embrión de la semilla y de las estructuras esenciales como la radícula y el mesocotilo o coleóptilo, indicadores de la capacidad de la semilla para producir una plántula normal bajo condiciones favorables (capacidad de germinación) o aun bajo condiciones desfavorables (vigor). Así mismo, la viabilidad y la ausencia de latencia son factores de calidad fisiológica. Siendo el criterio más aceptado y

utilizado en la comercialización de semillas, la capacidad de germinación (Moreno 1988).

Además la condición **Sanitaria** que está dada por la ausencia de microflora patógena, así como de insectos parásitos en ésta. En resumen, una semilla es de buena calidad cuando cumple con los estándares de pureza tanto varietal como física, un alto porcentaje de germinación y se encuentra libre de organismos patógenos tanto externa como internamente (Besnier, 1989)

Para conservar en una semilla las características fisiológicas, así como de sanidad es necesario tomar en cuenta varios factores como el hecho de que las semillas son organismos higroscópicos, (Harrington, 1973) es decir, que tienden a estar en equilibrio con el medio ambiente y absorben o pierden agua en la medida en que ésta se encuentra en su exterior; dependiendo directamente de las condiciones ambientales (de humedad relativa y temperatura) bajo las que se encuentre la semilla; además de su longevidad propia como organismo biológico y su resistencia o susceptibilidad al ataque de agentes patógenos; ya sean los hongos de campo que detienen su desarrollo al momento que la semilla alcanza su madurez fisiológica y empieza a perder agua o los de almacén que inician su actividad patogénica una vez que la semilla ha perdido el agua suficiente para ser almacenada y si las condiciones de almacenamiento lo permiten (Moreno, 1988).

Los patógenos presentes en la semilla son una limitante importante durante el establecimiento de ésta en campo, ya que son las semillas la fuente más importante para la diseminación de patógenos debido a la íntima asociación de ésta con su hospedante (Warham, 1984); además, los patógenos permanecen viables por más tiempo en semillas que en ninguna otra parte vegetal o el suelo. Generalmente las semillas infectadas van a producir cultivos pobres de menor calidad, ya que patógeno y plántula compiten al desarrollarse conjuntamente, por lo que el hecho de sembrar semillas infectadas repercute a nivel epidemiológico, ya que éstas se comportan como foco de infección a partir del cual se diseminarán hacia plantas vecinas incrementando su incidencia (Navarrete, 1995).

Entre los daños causados a las semillas por microorganismos patógenos se encuentran: la muerte del embrión, si la infección es severa; pérdida de la germinación, decaimiento de plántulas, raíces y coleóptilos (Neergaard, 1979); decoloración y arrugamiento de la semilla p. e. punta negra causada por *Alternaria alternata*, *Helminthosporium* y *Cladosporium* spp. o *Cercospora kikuchii* que causa un manchado café en semillas de soya (Sinclair, 1981); cambios bioquímicos como deterioración y cambios en la calidad de nutrientes. Otros patógenos, alteran el color del aceite extraído de semillas así mismo otros producen toxinas dañinas a animales domésticos y al hombre (Moreno, 1993).

Por tanto, la condición sanitaria como parámetro de calidad, radica en que la semilla ha sido el mecanismo de diseminación de gran número de patógenos en

el mundo debido al extenso comercio de la semilla a nivel Internacional (Campos, 1981); y a que la sanidad en las semillas repercute en la incidencia de enfermedades en campo y determina la emergencia y establecimiento de plántulas (Thomson, 1979).

La Semilla como Transmisor de Enfermedades.

Las enfermedades de las plantas son probablemente la limitante de mayor importancia para aumentar la producción global de granos, es necesario por tanto, tomar medidas a partir de los programas de mejoramiento genético, induciendo un aumento en la resistencia de materiales a diversas enfermedades; conociendo las enfermedades que afectan a cada cultivo, su severidad, y el mecanismo transmisor (Zillinsky, 1984).

Una semilla infectada, es el resultado de la interacción entre hospederos susceptibles, el patógeno involucrado y el medio ambiente. Cualquier agente infeccioso que esté asociado a las semillas y que tiene el potencial de causar una enfermedad en una plántula o planta debe ser llamado "patógeno habitante de la semilla". Este término incluye a los patógenos acarreados dentro, fuera o con la semilla.

De acuerdo a Neergaard (1979) y Agrios (1989), los patógenos que pueden ser transmitidos a través de semillas son hongos, bacterias, virus y

nemátodos, McGee (1988) señala además a los micoplasmas y espiroplasmas. De todos estos patógenos los de mayor importancia económica son los hongos ya que de las enfermedades transmitidas por semilla el 80 por ciento son causadas por éstos microorganismos (Neergaard, 1979) agrega a la lista de patógenos transmisibles por semilla los bacteriófagos, y señala además que la asociación semilla-patógeno puede ser por: **Acompañamiento**, cuando el patógeno de una forma independiente acompaña a la semilla hospedante pero no la ataca, como es el caso de *Sclerotinia sclerotorum* y *Claviceps purpurea* en centeno y *Anguina tritici* (nemátodo) en trigo; **Transporte externo** cuando el patógeno es acarreado pasivamente sobre la semilla hospedante, tal es el caso de *Rhizoctonia solani* en pimienta y *Puccinia carthami* en cártamo; **Transporte interno** cuando el patógeno se encuentra en estructuras fructíferas embebidas en el tejido de la semilla hospedante, como cubierta, cotiledón y embrión, siendo el ejemplo más típico el *Ustilago nuda* en trigo y cebada (Leppik, 1964).

Sánchez (1994), menciona que una de las formas de transmisión de un patógeno a las semillas puede darse **Planta-semilla**, es decir la transmisión se da directamente de la planta madre a través de las partes florales como el pedicelo de las flores, pedúnculo del fruto, funículo de la semilla o tegumentos, así la mayoría de los virus y bacterias que infectan el embrión penetran por el sistema vascular. Otra forma de transmisión se da **entre** semillas (Navarrete, 1995) a través de maquinaria contaminada durante la producción, cosecha, beneficio o almacenamiento. Así mismo **Entre plantas** durante la producción a través de

plantas infectadas o residuos de cosecha. Además las diferentes estructuras que utilizan los patógenos para introducirse son: el polen, p.e. *Xanthomonas juglandis* en nogal, *Erwinia stewartii* en maíz, a través de estigmas, p.e. *U. nuda* en cebada y *U. tritici* en trigo; a través de la pared del ovario, pericarpio y tegumentos, *U. nuda* en cebada. *C. lindemutianum* y *Xanthomonas phaseoli* en frijol; a través de la placenta se introduce *Rhizoctonia solani* en hortalizas, del hilio *Alternaria sesamicola* en ajonjolí y de los estomas *Tilletia indica* en trigo.

Campos (1981) compara a la semilla como mecanismo transmisor de patógenos con otros medios como agua, viento, restos de cosecha y suelo y señala que las ventajas de ésta residen en que las semillas permanecen viables por más largo tiempo que los propágulos vegetativos, además, el inóculo en la semilla incrementa la posibilidad de infección de la plántula, puede inocular suelos libres de parásitos, introducir nuevas razas fisiológicas de patógenos y propiciar numerosos focos de infección en campo.

Entre las familias gramínea y leguminosa se producen más del 90 por ciento de los granos cultivados para alimento, el fruto o semilla formado por las gramíneas (del tipo indehiscente) comúnmente es infectado por los hongos durante su desarrollo en el campo, en la maduración y en la cosecha, estas semillas son colonizadas por diversos hongos fitopatógenos, algunos de ellos con alta capacidad de inducir el desarrollo de enfermedades en el subsecuente ciclo agrícola p.e. *Ustilago tritici* (carbón volador del trigo), *Tilletia indica* (Carbón

parcial del trigo), *Colletotrichum lindemutianum* (Antracnosis en frijol), *Fusarium spp* en maíz causante de pudriciones en raíz, tallo y mazorca y que se encuentra casi siempre presente en la semilla aunque el desarrollo de la enfermedad dependerá tanto de las condiciones del ambiente, y de los genotipos tanto de maíz como del hongo (Moreno, 1993).

La supervivencia de un patógeno en cualquiera de los casos de asociación con la semilla, dependerá de la condición ambiental en la que ésta prevalezca, al respecto Deakin (1984), señala que muchas de las semillas que funcionan como vehículo de enfermedades, especialmente en la zona templada, tienen un periodo de latencia, al cual no están sujetos los organismos transportados en ellas. La viabilidad de algunos microorganismos, sin embargo, supera con facilidad a la de la semilla, no obstante, su patogenicidad puede verse afectada; algunos patógenos sobreviven mientras la semilla es viable, e incluso mueren antes de que la semilla termine su periodo de latencia.

Navarrete (1990) explica el impacto directo de los hongos en las semillas de la siguiente manera: penetran a las plantas por diferentes vías, existen los que penetran a través del estigma y provocan infección intra o extraembrional, como los carbones voladores; los que penetran en la porción basal del ovario, del pericarpio o de los tegumentos de la semilla, como algunos carbones de cereales. Otros más infectan la semilla a través del pedicelo de la flor o del fruto, muchos afectan el primordio de las semillas maduras y provocan la reducción de la cosecha, algunos

parásitos débiles manchan la semilla disminuyendo su valor comercial. Los hongos, tienen además la capacidad de sustituir órganos al desarrollar fructificaciones u otras estructuras de reposo, provocando aborto en la semilla, o bien un pobre desarrollo de la misma, la cual queda enjuta y de menor tamaño.

Si un patógeno es introducido en una área nueva, éste al verse libre de competidores tiende a aumentar su virulencia llegando a alcanzar altos niveles hepifíticos (Navarrete, 1995) por lo que el transporte de patógenos por semilla representa por consecuencia un mecanismo importante en la supervivencia y transferencia en tiempo y espacio, que aunado a la diseminación efectiva de los patógenos dentro o fuera de las mismas representa una barrera difícil de vencer en cuanto a la diseminación de enfermedades (Deakin, 1984).

Ya que la semilla puede ser el medio de distribución de agentes fitopatógenos, es necesario además de delimitar zonas de mayor rendimiento, asegurar la sanidad de la semilla y el extremar el control sanitario de los cultivos. Un aspecto muy importante para producir semillas libres de patógenos es la selección de un sitio adecuado para el establecimiento del lote de producción, es decir un lugar en el que las condiciones ambientales impidan el desarrollo de enfermedades y favorezcan la producción de semillas de calidad, reduciendo los niveles de inóculo (CIAT, 1979).

Enfermedades del Maíz Transmitidas por Semilla.

Al maíz lo afectan numerosas enfermedades, dentro de ellas las fungosas que provocan serios daños ya que anualmente en las zonas maiceras se presentan desde ligeros decrementos hasta pérdidas totales de la producción .

Entender el efecto del ambiente en el desarrollo de una enfermedad es bastante complejo puesto que es el resultado de la conjugación de un ambiente favorable, hospedante susceptible y patógeno virulento siendo la temperatura el factor determinante de la incidencia regional y estacional de las enfermedades, (Navarrete, 1986).

Castaño (1978) y Ahmed and Blutta (1989), mencionan que las enfermedades fungosas del maíz prácticamente se inician con las infecciones causadas en el endospermo del grano, más que todo hacia el escutelo, por especies de los denominados "hongos de campo", principalmente correspondientes a los géneros *Giberella*, *Fusarium*, *Diplodia* y *Helminthosporium*, y con las contaminaciones externas ocasionadas por los denominados como "Hongos (mohos) de almacén", principalmente *Aspergillus* y *Penicillium*, además por los comúnmente conocidos saprófitos de géneros *Mucor* y *Rhizopus*.

En cuanto a los "hongos de campo", infectan los granos de la mazorca desde el cultivo y sobreviven en estado latente en el endospermo de la semilla,

principalmente en el escutelo, reanudando de inmediato sus funciones vitales en presencia de factores adecuados de temperatura y humedad Moreno (1988). Ocasionalmente, además la pronta muerte del embrión, con lo cual la semilla pierde su viabilidad, siendo más susceptibles aquellas variedades de endospermo muy amiláceo (Castaño, 1978).

MacGee (1988) enlista las principales enfermedades del maíz, mencionando las que son portadas y transmitidas por semilla, así como su agente causal, entre estas se encuentran las pudriciones de tallo, raíz y mazorca, ocasionadas por el género *Fusarium*.

Aunque estas pudriciones son causadas por las especies *F. moniliforme* y *F. graminearum*, la especie *F. moniliforme* es la más reportada como causante de daños en las zonas maiceras de México, especialmente cuando las plantas se acercan a la madurez y esta se encuentra asociada con periodos de sequía, Pérez (1985) reporta una marcada y sobresaliente incidencia de este patógeno en tallos de maíz por daños de podredumbre en la zona maicera del Bajío.

Fusarium moniliforme es uno de los patógenos más cosmopolita ya que esta extensivamente distribuido en América, Europa, Asia y África, Mc Gee (1988) y su presencia ha sido reportada en un amplio rango de hospederos y en todos ellos causa enfermedades. Es el parásito de mayor importancia en los cultivos como arroz, caña de azúcar, maíz, mijo y sorgo, Nelson (1991) en los que ocasiona

ahogamiento, pudriciones y otras anomalías. En maíz produce la pudrición de tallos y mazorca, en la caña de azúcar la pudrición de tallo o *Pokkah-bong*, Romero (1993) y en arroz la enfermedad de Bakanae o gigantismo provocado por la giberelina que este hongo produce en este cultivo (Rojas y Rovalo 1984).

McGee (1988) menciona que *Fusarium moniliforme* es el causante de pudriciones en tallo y mazorca en maíz y *Fusarium culmorum* y otras especies causan pudriciones en raíz y tallos. La médula del tallo se desintegra dejando intactos solo a los haces vasculares. La pudrición afecta también a las raíces de la planta. La pudrición del tallo hace que las hojas presenten un color gris opaco y que ocurra la muerte prematura y rompimiento del tallo, la pudrición de la mazorca (denominada como la pudrición roja de la mazorca) se caracteriza porque en esta última aparece un moho que va de rosado a rojizo (Agrios, 1989).

En la mazorca presenta un moho algodonoso o rosado sobre las áreas hacia afuera de ésta o esparcido sobre los granos, las semillas pueden presentar rayas blancas o son invadidas por micelio rosa. En semilla se han reportado hasta un 100 por ciento de infección, y en éstas *Fusarium moniliforme* se ha encontrado en el pedicelo, endospermo y embrión (Singh y Singh 1977).

En el maíz es más común en zonas secas y cálidas y es particularmente severo en época cercana a la floración. En los estados finales de la infección, el tejido parenquimatoso desaparece, los haces vasculares quedan desgarrados y los

tejidos de alrededor se decoloran. Además de quebradura de tallo, médula pardusca, otro síntoma es el moho algodonoso blanco o rosado en la mazorca, De León (1984). Este autor, así como Navarrete (1986) lo detectaron como el causante de la enfermedad "germinación prematura en la mazorca".

Foley (1962) y Lawrence *et al* (1981) encontraron el hongo en toda la planta, ubicándose en parénquima y esclerenquima de tallos; en proxilema y xilema de entrenudos, nudos y hojas; así como en el anillo exterior del olote. Mencionan que el deterioro gradual del tejido del parénquima del tallo se presenta en nudos antes que internudos y es debida a la rápida elongación meristemática de esta zona. En el grano encontraron al hongo en las capas externas del pericarpio y pocas veces en el endospermo.

Navarrete (1986) al estudiar a *Fusarium moniliforme* como causante de la enfermedad "germinación prematura del maíz" detectó en la semilla a *Fusarium moniliforme* en porcentajes similares en embriones y cotiledones. En plántulas provenientes de semillas infectadas, el hongo aparentemente se desarrolló de modo sistémico pues fue detectado en porcentajes elevados en los ápices foliares de dichas plantas. Encontró el hongo en la mayoría de la semillas maduras de las variedades de maíz empleadas en campo, pero no se observó relación entre el porcentaje de infección de la semilla y la incidencia de la enfermedad en el ciclo siguiente.

Manzo y Clafin (1984) encontraron que *F. moniliforme* es capaz de sobrevivir a 16° C por un periodo de hasta 6 meses en forma de conidios o hifas ya sea en granos o en tallos de sorgo.

Lawrence *et al* (1981) encontraron micelio en la porción basal del embrión de la semilla de maíz, mientras Singh y Singh (1977) no encontraron micelio en el embrión.

Respecto al efecto de *Fusarium moniliforme* sobre la calidad fisiológica de la semilla Marasas, *et al* (1979) encontraron evidencias de infección en plántulas durante la germinación viéndose afectado el vigor, al utilizar el filtrado tóxico de este hongo, como inóculo encontrando que las micotoxinas de *Fusarium moniliforme* producidas en los granos infectados son además tóxicas a los animales.

Algunos autores como Singh y Singh (1977) indican que en la semilla infectada con *Fusarium moniliforme* puede ocurrir un desarrollo aparentemente normal pero reducirse totalmente la germinación .

Anderegg y Guthrie (1981) detectaron la transmisión por semilla de *Fusarium moniliforme* y la infección en plántulas de maíz híbrido dulce, encontrando en invernadero una alta significancia y correlación positiva entre semillas que portaban el patógeno en un 67 por ciento, y su presencia en

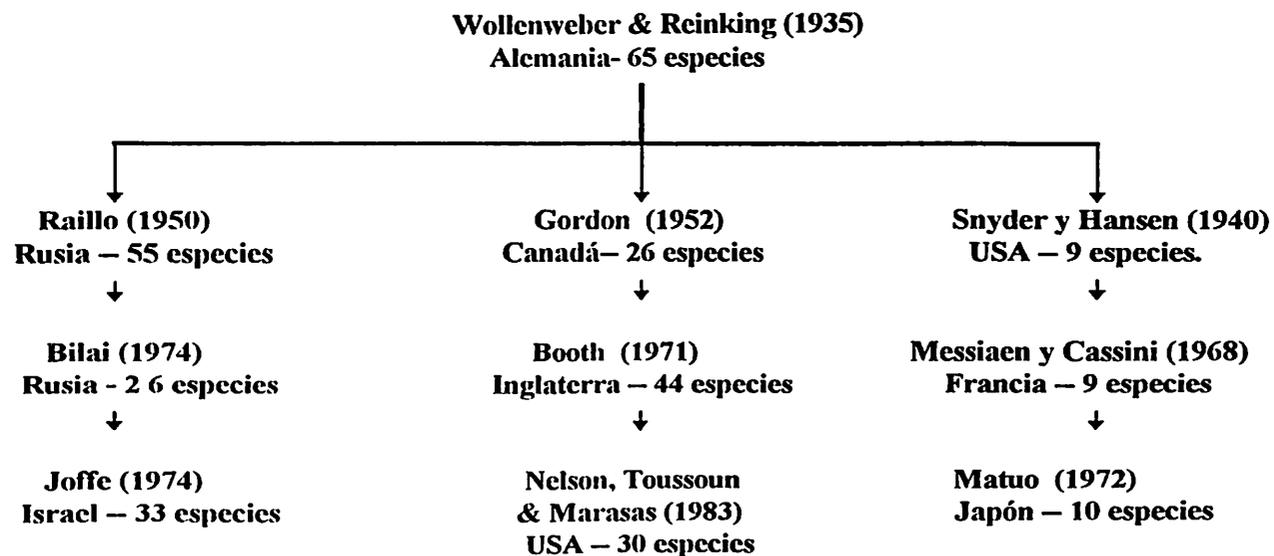
plántulas. En pruebas de emergencia en campo, utilizaron semillas imbibidas en una suspensión conteniendo el inóculo de *Fusarium moniliforme*; así como semillas desinfectadas en la superficie con una suspensión de NaOCl al diez por ciento durante cinco min sembradas en suelo estéril, además semillas sembradas en suelo infectado. Al analizar el tejido de plántulas encontraron una mayor incidencia del patógeno en plántulas provenientes de semillas desinfectadas en la superficie que en suelo infectado y en las semillas imbibidas en la suspensión.

Styer y Cantliffe (1984) al evaluar el efecto en el vigor y germinación de la semilla de maíz inoculada con el patógeno diez días después de la polinización no encontraron evidencias de disminución en la germinación estándar, sin embargo el número de plántulas anormales fue mayor en germinación (temperatura de 27°C) que en vigor, en la cual utilizaron la "prueba fría".

Taxonomía del género *Fusarium*

El género *Fusarium* fue descrito por Link en 1915 y pertenece a la clase Deuteromicetes u hongos imperfectos (Romero, 1993). A partir de entonces ha existido mucha controversia entre diversos científicos, con el afán de estandarizar la clasificación de este género, Nelson (1991) sintetiza la historia de la sistematización del género *Fusarium* a partir de los trabajos realizados por Reinking y Wollenweber en 1935 sobre la taxonomía de éste género, reconociendo

entonces 65 especies, entre las clasificaciones propuestas y de mayor aceptación se encuentran las siguientes:



Debido a los problemas existentes para la identificación de especies del género *Fusarium* como consecuencia del estado confuso de la nomenclatura y de la presencia de variaciones naturales en el desarrollo morfológico o cambios ambientales, es difícil precisar una descripción válida universalmente (Zillinsky, 1984) ya que es un patógeno que presenta frecuentemente mutaciones (Booth, 1977).

Leslie (1991) encontró que el hongo varía en cuanto a las estructuras que desarrolla de acuerdo al hospedero, el medio de cultivo utilizado y las condiciones ambientales bajo las cuales es incubado.

Nath *et al* (1970) indican que para identificar *Fusarium moniliforme* en semillas de cultivos como soya, algodón, jitomate, arroz, sorgo y maíz, el caso en que el desarrollo de la colonia inicie pueden observarse fácilmente cadenas de microconidias a lo largo del micelio desarrollado sobre las semillas. Cuando hay un mayor desarrollo de la colonia y ésta es abundante y de color blanquecino, púrpura, blanco o de naranja a blanco, puede observarse la colonia similar presentando numerosas cadenas largas o cortas de microconidias de cabeza pequeña, éstas pueden ser observadas a través de microscopio estereoscópico e incluso pueden identificarse a simple vista. En la mayoría de los casos el micelio es polvoso y siempre se presentan cadenas de microconidias, para comprobar que se trata de esta especie puede observarse realizando un montaje observado bajo el microscopio compuesto.

Ensayos de Sanidad de Semillas.

Desde 1886 se comenzó a prestar atención a los hongos asociados con la germinación de semillas cuando Bessey, en Iowa E.U.A. publicó resultados de pruebas de germinación incluyendo los hongos encontrados. Posteriormente se propuso a la Asociación Internacional de Ensayos de Semillas (ISTA) incluir en los reglamentos resultados de la sanidad de lotes de semillas para los certificados Internacionales. En 1938, Doyer publicó un manual para detectar enfermedades transmitidas por semilla y fue en 1958 que Anderson contribuyó con una sección

sobre enfermedades transmitidas por semillas para el Manual de la Asociación de Analistas Oficiales de Semillas (AOSA). Las pruebas que habían sido propuestas por Doyer fueron desarrolladas para patógenos específicos por la ISTA a través del Comité de enfermedades de plantas.

El ensayo de la sanidad de semillas tiene por objeto detectar e identificar los organismos patógenos presentes en las semillas, apreciar los daños causados en ellas y prever las posibles consecuencias de las infecciones existentes (Warham 1984).

Warham (1984, 1985), Lenné (1985) y Besnier (1989), coinciden en que los ensayos pueden realizarse teniendo a la vista tres objetivos principales:

Detección de la presencia de organismos que puedan dar lugar a la introducción de nuevas plagas y enfermedades en una determinada zona (ensayos de cuarentena).

Realización de investigaciones fitopatológicas de diversos tipos tales como la determinación del papel que juegan las semillas en el ciclo y la dispersión de determinado organismo; estudio de nuevas enfermedades que, de pronto adquieren una gravedad inusitada; inoculación de las semillas para la identificación de genotipos resistentes a una enfermedad, así como la

comprobación del grado de sanidad de las distintas categorías de semillas comerciales.

Determinar la necesidad del tratamiento químico de la semilla. Esto permite conocer si la semilla puede ser sembrada sin ningún tratamiento químico, si puede ser usada con un tratamiento prescrito o si definitivamente no puede ser usada para siembra.

Una prueba de sanidad consiste en la verificación de la existencia de organismos patógenos en la semillas, principalmente hongos y el método utilizado será de acuerdo a la naturaleza del agente patógeno y la especie de semilla; mientras la prueba se realiza se recomienda almacenar la muestras a 10° C hasta que se lleven a cabo los diferentes ensayos, evitando la ganancia de humedad con el uso de bolsas de polietileno, señala Peretti (1994).

El análisis sanitario inicia desde la inspección en campo del lote de semillas. Así durante la producción de semilla en campo, el control de las enfermedades asegura la calidad sanitaria de lotes de semilla, para ello las inspecciones de lotes de producción deben ser realizadas en forma sistémica y frecuente durante todo el ciclo de cultivo para determinar las enfermedades, cuando se presenta alguna enfermedad, así como su severidad y control. Si la enfermedad es detectada al inicio, es necesario arrancar las plantas enfermas

antes de que surja una contaminación masiva. Cuando se visitan varios lotes, nunca debe inspeccionarse un campo infectado antes que uno sano.

Posterior a la cosecha, ya en el laboratorio, la sanidad puede ser evaluada y pueden existir tantas pruebas como patógenos probables en la semilla, en la detección de hongos las más utilizadas son:

Sin Incubación de la Muestra.

Este es un tipo de ensayo externo e interno macro o microscópicamente, de las semillas y puede ser mediante:

Examinación Directa. La cual, como señala Warham (1985) consiste en la examinación de la muestra con lupa o microscopio estereoscopio para separar cornezuelos, esclerocios, agallas de nemátodos, bolas de carbón, insectos, así como detectar síntomas indicativos de infección como decoloración y manchado de la semilla, malformaciones, cuerpos de reposo o fructíferos, masas de esporas en la semilla y daño mecánico. La evaluación se realiza por conteo de semillas infectadas o simplemente anotando la presencia del hongo detectado, no obstante que este examen no otorga siempre información sobre la viabilidad de los patógenos eventualmente presentes, el examen puede ser un complemento de las pruebas de incubación, y es realizado como una examinación inicial visual de la semilla para observar su condición general respecto a daño por patógenos.

Observación o examen de suspensiones. Este es un método cuantitativo para determinar la carga de esporas de carbones en cereales (*Tilletia spp.*) puede también usarse para esporas adheridas a la superficie de la semilla, Navarrete (1992). Las semillas son colocadas en un recipiente con agua a la que se le agrega un agente humectante (detergente, alcohol o tween) y se agita durante cinco min si la superficie es lisa y diez min si es rugosa. De cada recipiente se vacía el lavado en un tubo de centrifuga y se coloca en centrifugación durante tres min el sobrenadante es decantado y el precipitado se extrae con una pipeta, Se colocan varias gotas de este precipitado a observación sobre un portaobjetos y se observa bajo el microscopio compuesto para determinar el número de esporas por campo de la especie presente (Neergaard, 1979).

Examinación de Embriones. Esta es una técnica de teñido aplicado al micelio del carbón volador en cereales, y consiste en una disección de embriones macerados en hidróxido de sodio y teñidos con lactofenol o anilina azul, observando posteriormente el micelio a través del microscopio estereoscopio. Método que ha mostrado ser altamente confiable para detección de *Ustilago nuda* en trigo y cebada con una buena correlación de la infección de semillas y la incidencia en campo (Neergaard 1979).

Incubación de la Muestra.

En este tipo de ensayos son utilizados medios artificiales como papel filtro y papel secante o sustratos como agar nutritivo, los cuales proporcionan los

requerimientos ambientales y nutritivos para el desarrollo de los patógenos presentes en las semillas, y combinan las ventajas del estudio "in vivo" con las ventajas de las observaciones "in vitro" y es el único que permite una investigación exhaustiva sobre la sanidad de las muestras.

Prueba en papel filtro. El principio básico de este método es el de proveer un alto nivel de humedad relativa y óptima luz y temperatura para el desarrollo de hongos. Consiste en sembrar semillas sobre papel filtro humedecido en cajas petri o en cajas patológicas, dependiendo del tamaño de la semilla las que posteriormente son incubadas bajo condiciones de temperatura, humedad e iluminación de acuerdo a las condiciones requeridas por el patógeno en estudio. En general para las semillas de cultivos de zonas templadas se recomienda incubarlas entre 14° y 20° C y las de zonas tropicales a 28° C. Este método se aplica a toda clase de semillas incluyendo cereales, y hortalizas, y ha sido descrito por Thomson (1979) y Navarrete (1995).

Prueba de Blotter con congelamiento. Las semillas son sembradas en papel filtro o blotters, e incubadas durante un día bajo condiciones normales de temperatura para germinación, posteriormente se someten a un periodo de congelamiento a -20 °C durante 24 hrs provocando de esta manera la muerte del embrión, el principio de esta prueba radica en que las plántulas muertas son un medio adecuado para un mayor desarrollo de hongos, como lo han reportado en hongos como *Fusarium* y *Septoria* en cereales, (Nath, et al 1970).

Prueba en Agar. El principio de este método es una examinación de las colonias desarrolladas de las semillas sembradas en un medio de agar, que puede ser agar extracto de malta, dextrosa y de papa dextrosa (PDA), (Warham 1985). Actualmente se han obtenido resultados satisfactorios al adicionar restos de vegetales al medio, como fuente nutritiva al hongo, así como la utilización de algunos inhibidores de la germinación como el 2,4,D o la utilización de antibióticos, para evitar la presencia de bacterias que puedan contaminar el cultivo.

Este método es útil para aquellas semillas en las que las especies de hongos saprófitos no perjudiquen una rápida identificación de otros hongos de interés. El método de agar es preferible cuando la incubación en papel filtro no provee condiciones adecuadas para el crecimiento de micelio, esporulación o síntomas adecuados del patógeno en las semillas y plántulas desarrollándose el crecimiento de las colonias en agar nutritivo. (Besnier, 1989 y Peretti, 1994).

Ensayo de Germinación.

Este método consiste en la observación de sintomatología en plántulas, las semillas son sembradas en invernadero, en ausencia de otras fuentes de inóculo del patógeno estudiado, utilizando el suelo o arena esterilizado, aunque este método tiene la ventaja de estimar el riesgo de transmisión del patógeno, los síntomas de las plántulas deben ser bien distintivos para permitir una identificación exacta.

Así mismo el ensayo puede ser realizado en toallas de papel secante enrolladas para determinar la germinación de semillas, Navarrete (1992). Al desarrollarse las plántulas se pueden observar los síntomas causados por los patógenos presentes en las semillas; así como desarrollo de patógenos de interés. Las semillas colocadas en el sustrato estéril son incubadas a 25°C durante siete días al final de los cuales se cuantifican los síntomas en plántulas, semillas infectadas y se obtiene de esta manera el porcentaje de infección.

Para las pruebas de incubación ya sea en agar o en papel filtro, así como en pruebas de germinación es necesario antes de la siembra de las semillas desinfectar la superficie de éstas, remojándolas en una solución de Hipoclorito de Sodio (NaOCl) a una concentración de uno a tres por ciento, para lo cual puede utilizarse blanqueador o cloro doméstico, el cual contiene una concentración de 6 por ciento; las semillas son sumergidas y puestas en agitación durante uno a diez min de acuerdo al tipo de semilla, esto a fin de evitar el desarrollo de organismos saprófitos.

Pruebas serológicas. Este método se utiliza principalmente en la detección de virus y consiste en preparar un extracto de la muestra de semilla infectada (antígeno) que es mezclado con un antisuero específico para éste, lo cual permite detectar la presencia del patógeno de acuerdo a la reacción. Así la detección es basada en la reacción del antígeno y el anticuerpo. El anticuerpo captura el antígeno de la muestra formando un conjugado que es el anticuerpo adherido a una enzima

se adhiere al antígeno capturado lo que es detectado mediante un cambio de coloración. Diferentes metodologías serológicas han sido desarrolladas tales como el método **Elisa** entre otros.

De acuerdo a Rosas (1994) para una elección del método a utilizar deberán tomarse en cuenta varios aspectos, para detectar los hongos en los ensayos de laboratorio, es preciso la incubación, además los ensayos con papel secante y agar permiten la identificación a nivel de la especie; el ensayo en busca de síntomas en las plántulas, centra su atención en el descubrimiento de síntomas y tipos de enfermedades, más bien que en la precisa identificación del agente patógeno que interviene (por lo general suelen existir varios en una sola semilla). Y por último agrega que los procedimientos serológicos permiten la identificación precisa de agentes patógenos bacterianos y virales, que no se determinan tan fácilmente por los ensayos de incubación.

Por otro lado Besnier (1989) opina que para la realización de análisis rutinarios, los métodos de ensayo de la condición sanitaria de las semillas deben ser rápidos, económicos y deben dar resultados reproducibles y susceptibles de interpretación estadística; desgraciadamente estas últimas condiciones son mucho más difíciles de lograr en los ensayos fitosanitarios que en los otros tipos de ensayos de semillas.

Otro aspecto importante es que, salvo casos muy concretos, no existe en general una correlación segura y estrecha entre el grado de infección de las semillas y el nivel de incidencia en las plantas, sobre todo cuando se trata de enfermedades en plantas adultas; ello es debido a diversas causas entre las que merece destacarse el hecho de que, en ocasiones existe abundante inóculo de la enfermedad en el suelo, restos de cosechas, plantas silvestres, etcétera (Thomson, 1979).

En cuanto a la normatividad para los ensayos sanitarios, Besnier (1989) y Rosas (1991) mencionan que a pesar de lo extensa que es la lista de organismos patógenos detectados en las semillas, las Reglas Internacionales (ISTA, 1985) sólo suministran instrucciones concretas y tipificadas, para métodos que se han encontrado satisfactorios en lo que respecta a su reproducibilidad en nueve casos: *Botrytis cinerea* en girasol y lino. *Phoma lingam* en crucíferas, *Drechslera oryzae*, *Pyricularia oryzae* y *Alternaria padwickii* en arroz, *Ustilago nuda* en cebada, *Ascochyta pisi* en chícharo y *Colletotrichum lindemuthianum* en frijol; puede observarse que en todos los casos se trata de hongos.

En México, en 1995, se presentó un proyecto de Norma Oficial Mexicana (NOM-029-FITO-1995) en la que se establecen los requisitos fitosanitarios para la importación de semillas para siembra, estando como Unidad Administrativa responsable la Dirección General de Sanidad Vegetal, estableciendo como requisitos de introducción de semilla al país; Certificado Fitosanitario Internacional,

Inspección al momento de ingreso al país, así como la toma de muestra a analizar por un Inspector Oficial Sanitario en Semillas. El objetivo de la evaluación sanitaria de las semillas está relacionado con la política respecto al mejoramiento de semillas, comercio y control sanitario de cada país.

Los concedores coinciden en que en materia de comercialización, el problema que enfrenta el subsector semillero en nuestro país puede atribuirse a la existencia de un grupo numeroso de pequeñas empresas comercializadoras de semillas de mala calidad que bajo el falso estímulo de un precio menor, provocan problemas fitosanitarios, bajos rendimientos y falta de calidad en el producto final, y en contraposición a los altos precios de las semillas certificadas ofrecidas por las empresas privadas, se originan estos “contrabandos de semillas de mala calidad”, Valadez (1985).

MATERIALES Y METODOS

La presente investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Ensayo de Semillas del Centro de Capacitación y Desarrollo en Tecnología de Semillas de la U.A.A.A.N. ubicada en Buenavista, Saltillo, Coahuila.

Material Experimental

Se utilizaron muestras representativas de 23 lotes comerciales de semilla de maíz proporcionados de la siguiente manera:

- Cinco lotes procedentes de la Empresa Híbridos Mexicanos S.A. de C.V. (Semillas **Dekalb**) provenientes de la Planta de Beneficio en Nextipac, Mpio. de Zapopan, Jalisco y producidos en la zona Bajío.
- Seis lotes de La Empresa **Asgrow** Mexicana S.A. de C.V. provenientes de la planta de beneficio en Matamoros, Tamaulipas y producidos en la zona Norte de Tamaulipas.
- Tres lotes de la Empresa Semillas Híbridas Internacionales (Semillas **Cargill**) provenientes de la planta Tepetates de Tlajomulco de Zúñiga, Jal. y producidos en Sayula, Guanajuato y Autlán respectivamente.

- Nueve lotes provenientes del Programa de Mejoramiento Genético del Instituto Mexicano del Maíz "Dr. Mario Castro Gil" de la UAAAN. producidos en la región Bajío.

Todos los materiales fueron producidos durante el ciclo agrícola P.V. 93 y obtenidos de Programas de Producción de Semillas.

Manejo del Material Experimental.

Las muestras de los materiales se obtuvieron directamente del proceso de limpieza y clasificado y antes de ser los lotes sometidos a un tratamiento químico, éstas al ser recibidas fueron homogeneizadas, pasándolas dos veces por un homogeneizador del tipo *Boerner*.

El contenido de humedad de las muestras de semilla, a su arribo al laboratorio osciló del 12 al 14 por ciento. Las condiciones de almacenamiento durante el desarrollo del trabajo fueron de una temperatura media de 10°C, como recomienda Peretti (1994), almacenar las muestras a 10°C utilizando bolsas de plástico para prevenir la ganancia de humedad; las semillas se mantuvieron en bolsas de polietileno y dentro de bolsas de papel a esta temperatura por el tiempo de estudio. Esto evitó que los materiales se contaminaran durante su manejo y tiempo de almacenamiento y fueran detectados solo aquellos patógenos que

podieron inocularse en campo, durante su transporte, o bien durante el proceso de beneficio.

Ensayos Evaluados.

Ensayos de incubación.

Prueba en Papa Dextrosa Agar (PDA). El PDA utilizado fue el producto comercial deshidratado de la compañía BIOXON con el cual, de acuerdo a Moreno (1988) se obtienen los mismos resultados que utilizando el PDA preparado a partir de tubérculos de papas, dextrosa y agar o producto natural. El medio preparado presentó un pH de 5.6. y la preparación se realizó de la siguiente manera: 39 g del medio en polvo fueron disueltos en un litro de agua destilada puesta al fuego, agitando frecuentemente y dejando hervir durante un minuto hasta dilución completa. Una vez preparado el medio fue esterilizado en auto clave durante 20 min a 15 libras de presión procediendo entonces al llenado de las cajas petri, agregando aproximadamente de 15 a 20 ml de medio por caja.

Una vez solidificado el medio, las cajas se mantuvieron a temperatura de 25°C por tres días para determinar contaminación al momento de llenado, desechando todas las cajas que presentaron alguna contaminación.

En seguida se realizó la siembra de las semillas desinfectadas previamente mediante agitación durante tres minutos en una solución de Hipoclorito de Sodio (NaOCl) al tres por ciento.

La muestra utilizada fue de 150 semillas distribuidas en 15 repeticiones de 10 semillas en caja petri por tratamiento que se llevaron a incubación a una temperatura de 25°C en completa oscuridad durante siete a diez días dependiendo del desarrollo de los patógenos. Se realizaron conteos cada 24 hrs a partir de la siembra, con la ayuda de un estereoscopio, y señalando cada día el desarrollo de micelio por semilla para evitar confusión respecto al número de semillas infectadas.

Prueba de Congelamiento o Blotter. En este ensayo no se utiliza un medio nutritivo para el crecimiento de micelio, ya que el principio radica en proporcionar al patógeno las condiciones de humedad, luz y temperatura necesarias para su desarrollo. Durante la prueba el patógeno es parásito de la semilla, la que es sometida a un periodo de congelamiento causando así la muerte del embrión, con el objeto de facilitar el crecimiento bajo las condiciones dadas, únicamente de microorganismos patógenos.

Este ensayo es el utilizado en el Laboratorio de Sanidad de Semillas del Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT) utilizando cajas fitopatológicas de fibra de vidrio transparente para facilitar la evaluación y la

prueba es conocida como Blotter (papel secante) o Prueba de incubación con congelamiento.

La muestra utilizada fue de 100 semillas distribuidas en cuatro repeticiones de 25 semillas por tratamiento.

La adecuación del procedimiento fue el siguiente: Se utilizaron charolas de plástico transparente con tapas (de las utilizadas comúnmente para alimentos preparados) de 20 x 15 cm de lado respectivamente y cinco cm de altura, en éstas se colocaron cuatro hojas de papel filtro de pliego (previamente esterilizado durante 20 min a 15 libras de presión) por charola y utilizando agua destilada esterilizada para humedecerlas a un poco más del punto de saturación y eliminando el exceso de agua.

Las semillas se colocaron sobre el papel filtro, equidistantes una de otra, la caja una vez cerrada fue sellada con plástico adherente y se incubaron a una temperatura de 25°C durante las primeras 24 hrs. Enseguida se cambiaron a una cámara de congelamiento a temperatura de -15° a -20° C las 24 hrs posteriores y cambiando nuevamente a 25°C. durante ocho a diez días de acuerdo a la aparición de micelio y a la fructificación del mismo sobre las semillas.

Ensayo de Germinación. El ensayo de germinación fue realizado con el objeto de conocer la capacidad germinativa de los lotes, considerándolo además

un indicativo de sanidad ya que las muestras al no estar tratadas químicamente con el fungicida y ser incubadas desarrollan los hongos que se encuentran presentes, este ensayo es recomendado por Neergaard (1979) y Navarrete (1992) para medir el porcentaje de germinación de semillas infectadas.

Se utilizaron seis repeticiones de 50 semillas colocadas de manera equidistante una de otra, sobre toallas de papel secante para germinación, esterilizadas previamente y humedecidas con agua también esterilizada, éstas a su vez fueron cubiertas por una capa más de papel húmedo, y se enrollaron a partir de uno de los extremos hasta formar "tacos", colocando éstos a 25°C durante siete días en cámara de germinación con luz. Las semillas fueron previamente desinfectadas en NaOCl al tres por ciento mediante agitación durante tres minutos.

Al séptimo día después de la siembra se evaluaron las variables propias del ensayo de germinación que son plántulas normales, plántulas anormales y semillas muertas. Así mismo se cuantificaron las semillas infectadas y las plántulas que tuvieron germinación normal o anormal, con algún tipo de manchado café o rosado en la radícula o en el mesocotilo y se consideraron como "plántulas dañadas". Así mismo se anotaron el número de semillas infectadas, realizando aislamientos de los hongos encontrados para su identificación, para esto, se utilizó medio nutritivo PDA en cajas petri y la purificación de los cultivos se logró a partir de micelio del hongo sobre la semilla.

Ensayos de Observación Directa.

Determinación de Semilla Manchada (%). Se utilizaron tres repeticiones de 50 gr. cada una de semilla por lote y el ensayo consistió en la observación directa de cada una de las semillas con la ayuda de una lupa con luz blanca y amplificación 10x, separando semilla sana de semilla manchada (independientemente del grado y tipo de manchado). Se determinó el peso de estos dos componentes y el resultado se expresó en porcentaje en peso de semilla manchada para cada repetición.

Clasificación de Semilla (tipo de manchado). La muestra utilizada fue de 300 semillas dividida en y tres repeticiones de 100 semillas. La observación se realizó con la ayuda de una lupa con luz blanca y en cada muestra se clasificaron cuatro categorías de semilla manchada en cualquier parte del pericarpio encontrándose tres diferentes tipos de manchado, clasificando así la muestra de trabajo en cuatro categorías: semilla con manchado café, semilla con manchado rosa, semilla con manchado blanco (rayado), semilla sin manchado considerada como semilla sana. El resultado fue expresado en porcentaje en número para cada categoría encontrada en la muestra.

Identificación de especies

La identificación de las especies de hongos presentados en los diferentes

ensayos se llevó a cabo realizando aislamientos para lograr cultivos puros a partir de una porción de micelio, utilizando el medio PDA en cajas de petri incubadas a 25°C durante 10 a 15 días con intervalos de luz y oscuridad de 12 hrs respectivamente. Ya que de acuerdo a la literatura los intervalos de luz inducen a la formación de estructuras de reproducción, base de identificación de estos microorganismos.

Una vez obtenido el cultivo puro de cada hongo encontrado, en todos los casos se realizaron montajes provisionales para los cuales se utilizó la técnica de cinta adhesiva transparente que consiste en extraer una porción de micelio del cultivo mediante el contacto con la parte adherente de la cinta; posteriormente ésta se colocó sobre un portaobjetos conteniendo una gota de lactofenol (transparente para el micelio de color y de color azul para el micelio hialino) de tal manera que la parte de cinta con micelio sea colocada sobre el lactofenol, éste al contacto, expande el tejido y facilita la observación al microscopio compuesto. La identificación de *Fusarium moniliforme* Sheldon en el presente trabajo se realizó de acuerdo a las claves de identificación propuestas por Messiaen y Cassini (1960); las propuestas por Snyder y Hansen en 1940 publicadas por Toussoun y Nelson (1968) por ser uno de los más aceptados (Romero 1993) es además el sistema de identificación utilizado en el CIMMYT y el recomendado por Nath, *et al*, 1970 y por el manual de Fitopatología de la Universidad de Sydney, Burgess and Liddell (1983).

Para la identificación de especies de *Aspergillus* se utilizaron las claves propuestas por Raper y Fennell, (Moreno, 1988).

La identificación de *Penicillium* se realizó con la ayuda de las claves para este género, descrito por Pitt (1985).

El resultado en porcentaje de infección, corresponde al número de semillas infectadas por repetición con cada una de las especies encontradas, además del total de hongos presentes en cada una de las pruebas.

Análisis Estadístico.

Los resultados obtenidos se analizaron en un diseño completamente al azar con igual número de repeticiones utilizando el modelo siguiente en todos los casos:

$$Y_{ij} = \mu + t_i + \sum \epsilon_{ij}$$

en donde: Y_{ij} = Efecto o variable de respuesta para el i -ésimo tratamiento en su j -ésima repetición .

μ = Media general de todas las unidades experimentales.

t_i = Efecto del i -ésimo tratamiento.

$\sum \epsilon_{ij}$ = Error experimental, variable aleatoria a la que se asume distribución normal e independencia con media cero y varianza constante.

Este es el de mayor utilidad en casos donde no existen fuentes identificables de variación entre unidades experimentales, a no ser los efectos del tratamiento, puesto que en todos los ensayos se trabajó bajo condiciones

controladas y se realizó individualmente para cada uno de los patógenos detectados en los ensayos, (Little y Hills, 1989).

Antes de ser analizados todos los datos fueron transformados a arcoseno o transformación angular ya que resultados expresados en porcentajes o proporciones de la muestra total, por regla general tienen una distribución binomial y no una distribución normal (Little y hills 1989), y para ello se utilizó la siguiente ecuación:

$$\text{arcoseno} \sqrt{\frac{x}{100}}$$

en donde:

x = dato expresado en porcentaje
100 = constante

En los casos en que el análisis de varianza reportó significancia se realizó la prueba Tukey de separación de medias al 0.05.

Así mismo, se determinó el coeficiente de correlación entre las variables evaluadas y entre ensayos.

RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados se presentan primeramente para la micoflora encontrada en los lotes de semilla evaluados. Para esto, se toma en cuenta tanto la incidencia por especie, así como el por ciento total de patógenos presente en cada lote, cuantificados en los ensayos de incubación con **PDA**, **Blotter** y **Germinación** respectivamente.

En seguida se presentan los resultados de la utilidad de los ensayos para la detección de *Fusarium moniliforme*, ésta se determinó, de acuerdo a los niveles de incidencia detectados en cada ensayo, y a la sensibilidad de cada uno para propiciar el desarrollo de este patógeno.

Finalmente el nivel de incidencia de *Fusarium moniliforme* en cada lote se considero por el por ciento obtenido en las pruebas de mayor utilidad y confiabilidad, para este propósito.

Micoflora Patógena

Las especies de hongos detectados y cuantificados en los diferentes ensayos fueron *Penicillium* spp., *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Fusarium moniliforme* y *Fusarium* spp. Es importante señalar que micelio de *Alternaria*,

Epicocum y *Aureobasidium* se detectó en los tres ensayos, solo que no se cuantificó, debido a que su nivel de incidencia fue menor al 1 por ciento. Así mismo, se presentó en esta misma proporción, *Aspergillus niger* en los ensayos de **PDA y Germinación**.

Los cuadrados medios obtenidos en el análisis de varianza individual presentados en el Cuadro 4.1 muestran diferencias significativa y altamente significativa entre lotes para todas las variables que en este caso corresponden a la micoflora que se presentó en cada ensayo.

Esto indica que los lotes fueron diferentes en sus niveles de micoflora presente. No obstante, la micoflora presentada dependió del ensayo utilizado, ya que los valores medios fueron diferentes en cada patógeno para los diferentes ensayos. Los valores tanto de coeficiente de variación como DMS fueron mayores en todos los casos en el ensayo en **PDA**, estas diferencias, posiblemente se deben a que al contener el agar una fuente nutritiva además de la semilla misma, respecto a los otros medios, el micelio del patógeno de crecimiento más rápido fue el que se desarrolló primero en la semilla, inhibiendo a otros patógenos presentes, sobre todo si este se encontraba en endospermo; ocasionando mayor variación entre repeticiones ya que, aún cuando la muestra fue homogeneizada, se observó que la incidencia de la micoflora fue variable de una a otra semilla; en el ensayo de

Cuadro 4.1. Cuadros medios de las variables de micoflora patógena en lotes de semilla comercial de maíz en ensayos de sanidad. UAAAN 1995.

Ensayos	PDA					Blotter					Germinación				
	CMt	DMS	x	C.V.		CMt	DMS	x	C.V.		CMt	DMS	x	C.V.	
Variables															
<i>Penicillium</i> spp. (%)	539.63*	5.42	4.43	51.8							272.43**	3.22	6.95	18.11	
<i>Aspergillus flavus</i> (%)						308.13*	3.68	3.95	29.39						
<i>Aspergillus Niger</i> (%)						359.72*	3.65	1.86	15.22						
<i>Fusarium mn</i> (%)	1076.0**	5.79	11.43	25.29		1100.04**	6.56	25.82	7.87		217.10**	2.53	15.13	8.24	
<i>Fusarium</i> spp. (%)	621.11*	13.01	10.68	26.04		336.32**	2.63	4.56	12.83						
Incidencia total (%)	227.25**	2.53	25.39	16.02		115.04**	2.64	34.47	7.92		412.86**	7.30	21.47	7.06	

* Significativo

**Altamente significativo.

Blotter y en **Germinación** en cambio, se detectó una menor variación entre repeticiones. En cuanto a la incidencia total de patógenos, el mayor porcentaje detectado fue en el ensayo **Blotter** (34.47%), debido a una mayor incidencia de *F. moniliforme* que en los ensayos de **PDA** y **Germinación**. Los valores de incidencia de *Penicillium* spp., *Aspergillus flavus* y *A. niger* indicados en el Cuadro 4.2 son numéricamente diferentes en la mayoría de los casos.

Cuadro 4.2. Micoflora patógena (% de incidencia) en lotes de semilla comercial de maíz detectada en ensayos de sanidad. UAAAN 1995.

Patógeno	<i>Penicillium</i> spp.			<i>Aspergillus flavus</i>			<i>Aspergillus niger</i>		
	PDA	Blotter	Germ.	PDA	Blotter	Germ.	PDA	Blotter	Germ.
1	7	0	5	0	1	0	0	2	0
2	0	0	8	0	1	0	0	0	0
3	0	0	0	0	4	0	0	2	0
4	0	0	1	0	4	0	0	0	0
5	0	0	5	0	12	0	0	2	0
6	5.5	0	10	0	10	0	0	0	0
7	8.5	0	8	0	1	0	0	2	0
8	0	0	2	0	4	0	0	0	0
9	5.5	0	9	0	1	0	0	0	0
10	5.5	0	3	0	4	0	0	0	0
11	8.5	0	22	0	1	0	0	0	0
12	5.5	0	7	0	1	0	0	0	0
13	0	0	8	0	1	0	0	0	0
14	8.5	0	17	0	1	0	0	0	0
15	0	0	6	0	6	0	0	0	0
16	0	0	9	0	1	0	0	0	0
17	5.5	0	0	0	4	0	0	0	0
18	5.5	0	6	0	4	0	0	10	0
19	5.5	0	0	0	4	0	0	0	0
20	8.5	0	3	0	5	0	0	0	0
21	5.5	0	2	0	1	0	0	5	0
22	8.5	0	22	0	1	0	0	2	0
23	0	0	0	0	6	0	0	4	0

En cuanto al rango para *Penicillium* spp. en **PDA** este fue de cero a ocho punto cinco por ciento, mientras que en el ensayo de **Germinación** para sanidad, los niveles de infección fueron de cero hasta 22 por ciento. Lo anterior confirma que este patógeno requiere de altos contenidos de Humedad relativa como los generados durante el ensayo de germinación, lo que concuerda con Moreno (1988) que menciona que para su desarrollo *Penicillium* requiere de humedades de 85-90 por ciento y puede crecer hasta a temperaturas de -2° C, esto apoya el que los valores más altos se observaron en el ensayo de germinación, más no así una incidencia importante en el ensayo **Blotter**.

La comparación de medias para este patógeno se muestra en los cuadros A.1 y A.2 para las pruebas de **PDA** y **Germinación** respectivamente.

Con relación a la presencia de *Aspergillus flavus*, éste se detectó en el ensayo **Blotter** y fue encontrado en todos los lotes con porcentajes de infección de uno a 12 por ciento (Cuadro 4.2) observándose que el ensayo de **Blotter** favorece su detección debido al alto porcentaje de humedad. La separación de medias para la variable % infección de *Aspergillus flavus* se presenta en el Cuadro A.3.

Respecto a los porcentajes de incidencia de *Aspergillus niger*, detectados únicamente en el ensayo de **Blotter**, y solo en algunos lotes resultó más alto en el lote 18 con 10 por ciento; así mismo el lote 21 presentó cinco por ciento de incidencia; el lote 23, cuatro por ciento y los lotes 1,3,5,7 y 22 con dos por ciento,

el resto de los lotes no lo presentaron, los cuatro niveles detectados son estadísticamente diferentes, como se observa en el Cuadro A.2.

Finalmente dentro de la flora patógena se encontró *Fusarium* spp. y *Fusarium moniliforme*, detectándose este último en los tres ensayos.

La incidencia de *Fusarium*, indica de igual manera de acuerdo a los porcentajes la diferente respuesta del patógeno a las condiciones generadas en cada ensayo, lo que se observa en los valores presentados en el Cuadro 4.3. La influencia de las condiciones ambientales fueron determinantes para el desarrollo o inhibición de la micoflora, en el caso de este patógeno, se desarrolló en los tres ensayos aunque no en la misma proporción. Lo anterior concuerda con Deakin (1984) quien señala que aunque la viabilidad de algunos microorganismos supera con facilidad a la de la semilla, las condiciones ambientales son determinantes para su desarrollo, ya que su patogenicidad puede verse afectada, incluso algunos patógenos sobreviven solo mientras la semilla es viable.

Respecto a la incidencia de *Fusarium moniliforme* los porcentajes fueron claramente mayores en la mayoría de los casos en el ensayo con congelamiento o **Blotter**, presentando niveles de incidencia desde 4 por ciento en el lote 2 hasta 50 por ciento en el lote 16 (Cuadro 4.3).

En el ensayo de **PDA** se presentó un rango de valores de 5.5 por ciento en los lotes 2,4,12 y17 hasta un 19 por ciento en el lote 20. En el ensayo de **Germinación** se detectó una incidencia de 3 por ciento en el lote 21y de 30 por ciento en el lote 16 (Cuadro 4.3) en este mismo cuadro se puede observar que el lote 16 fué el de mayor porcentaje de incidencia tanto en **Blotter** como en **Germinación**, en **PDA** en cambio el de mayor porcentaje fue el lote 20.

Cuadro 4.3. Micoflora patógena (% de incidencia) en lotes de semilla comercial de maíz detectada en ensayos de sanidad.UAAAN. 1995

No. Lote	<i>Fusarium moniliforme</i> (%)			<i>Fusarium</i> spp. (%)		
	PDA	Blotter	Germ.	PDA	Blotter	Germ.
1	10	26	15	10	14	0
2	5.5	4	15	9.5	6	0
3	8.5	7	16	10	15	0
4	5.5	8	10	7	6	0
5	7	23	7	10	0	0
6	8.5	20	4	10	0	0
7	10	34	14	5.5	0	0
8	13	28	20	13	0	0
9	17.5	37	26	8.5	3	0
10	13	44	23	13	0	0
11	16	38	27	11.5	11	0
12	5.5	6	6	7	3	0
13	11.5	31	8	11.5	0	0
14	11.5	26	23	16	18	0
15	13	20	19	14.5	0	0
16	14.5	50	30	10	0	0
17	5.5	23	15	5.5	0	0
18	13	31	28	10	0	0
19	10	7	10	8.5	9	0
20	19	24	22	16	0	0
21	10	37	3	10	3	0
22	13	38	6	13	0	0
23	13	24	5	7	0	0

En cuanto al resto de especies de *Fusarium* presentados en **PDA** y en **Blotter**, la tendencia es diferente en los lotes para cada ensayo, no obstante, el lote de mayor porcentaje en ambos ensayos fue el 14. Los cuadros A1, A2 y A3 muestran la comparación de medias de los lotes para las especies de *Fusarium*.

No obstante de presentar diferencias en cuanto a los niveles de incidencia, los coeficientes de correlación presentados en el Cuadro 4.4 indican una significancia de .67* entre el ensayo **PDA** y **Blotter**, para el porcentaje de incidencia de *F. moniliforme*; así mismo de .57* entre **PDA** y **Germinación**. y **Blotter** y **Germinación** con .50*. Por último la incidencia total de patógenos en **PDA** y **Blotter** presentó un coeficiente de correlación significativo de .60*. No existió correlación para la incidencia de *Penicillium*

Cuadro 4.4. Coeficientes de correlación entre los niveles de incidencia de micoflora en lotes de semilla comercial de maíz en diferentes ensayos de sanidad. UAAAN 1995.

Variables correlacionadas	Coficiente
<i>Penicillium</i> en PDA con <i>Penicillium</i> en Germinación	.35 NS
<i>F. moniliforme</i> en PDA con <i>F. moniliforme</i> en Blotter	.67 *
<i>F. moniliforme</i> en PDA con <i>F. moniliforme</i> en Germinación	.57 *
<i>F. moniliforme</i> en Blotter con <i>F. moniliforme</i> en Germinación	.50 *
<i>Fusarium</i> spp. en PDA con <i>Fusarium</i> spp. en Blotter	.07 NS
Incidencia total en PDA con Incidencia total en Blotter	.60 *
Incidencia total en PDA con Incidencia total en Germinación	.35
Incidencia total en Blotter con Incidencia total en Germinación	-.20 NS

NS No significativo

* significativo al nivel 0.05

La tendencia respecto al porcentaje total de infección se ilustra en la Figura 4.1, en la cual se observa que en los ensayos de **PDA** y **Blotter** el lote 10 resultó ser el de mayor porcentaje de infección total.

Además **ningún lote resultó totalmente libre de patógenos.** Aunque en diferente nivel **siempre existió la presencia de *Fusarium moniliforme* en todos los lotes.**

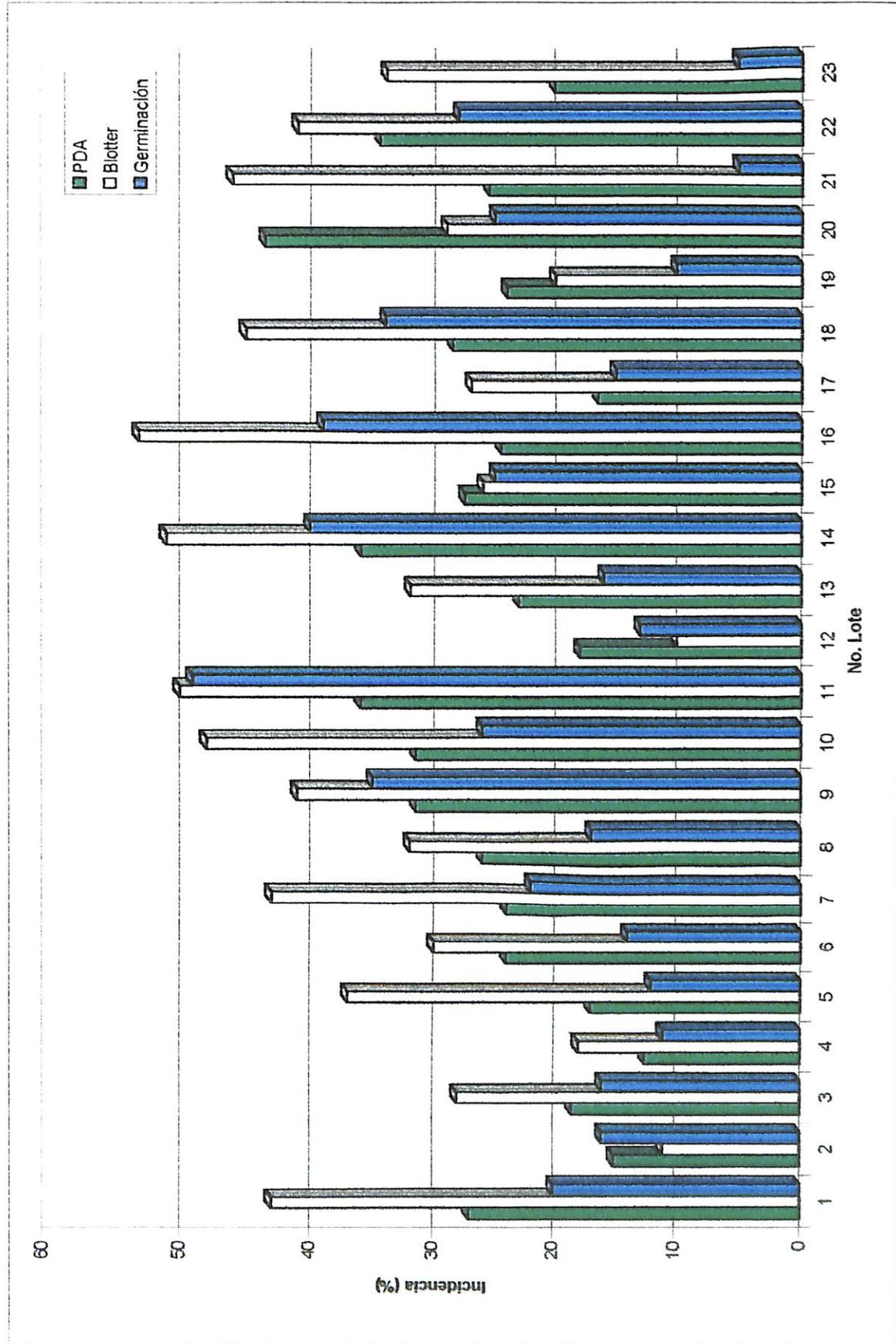


Fig. 4.1 Incidencia total de microflora patógena en lotes de semilla comercial de maíz en ensayos de sanidad UAAAN 1995

Detección de *Fusarium moniliforme* .

Para determinar la incidencia de *F. moniliforme*, se observaron los porcentajes detectados tanto en los ensayos de incubación; el por ciento de semilla manchada en peso y número en los dos ensayos de observación directa así como la variable por ciento de plántulas dañadas evaluadas durante el ensayo de germinación. En todos los ensayos se detectaron diferencias significativas entre lotes, (cuadro 4.5) indicando la efectividad de los ensayos para detectar diferencias de infección entre lotes.

Cuadro 4.5. Cuadrados medios de la variable incidencia de *Fusarium moniliforme* (%) en lotes de semilla comercial de maíz en diferentes ensayos de sanidad. UAAAN. 1995.

<i>Ensayos de Sanidad</i>	CM	C.V. (%)
PDA	1076.0**	25.29
Blotter	1100.04**	7.87
Germinación	217.10**	8.24
semilla manchada en peso (%)	193.80**	3.46
semilla manchado café en número (%)	93.97**	6.27
semilla manchado rosado en número (%)	124.61*	30.50
semilla manchado rayado en número (%)	252.45**	3.46
plántulas dañadas	240.3*	5.8

significativo al nivel 0.05

No obstante, al determinar la incidencia estos son diferentes entre las pruebas aún dentro de un mismo lote, Cuadro 4. 6. Así por ejemplo el ensayo de PDA detectó niveles de *Fusarium moniliforme* de 5.5 a 19 por ciento, mientras que el ensayo de germinación mostró niveles de 3 a 30 por ciento con porcentajes

de plántulas dañadas de tres a 27, siendo el ensayo de Blotter donde se tuvieron los más altos niveles de incidencia (cuatro a 50 por ciento).

Cuadro 4.6. Incidencia de *Fusarium moniliforme* (%) en lotes de semilla comercial de maíz, detectada en ensayos de sanidad. UAAAN, 1995.

No. Lote	Ensayos de incubación				Ensayos de Observación Directa			
	PDA	Blotter	Germ.		man. Café	man. rosa	man. rayado	man. en peso
			Incidencia	PD				
1	10	26	15	17	26	0	0	20
2	5.5	4	15	9	28	0	1	2
3	8.5	7	16	4	33	0	0	29
4	5.5	8	10	22	16	2	1	4
5	7	23	7	10	24	2	1	6
6	8.5	20	4	4	28	1	5	17
7	10	34	14	3	25	1	8	20
8	13	28	20	11	17	0	8	22
9	17.5	37	26	23	13	1	12	6
10	13	44	23	15	25	0	13	26
11	16	38	27	12	25	0	14	21
12	5.5	6	6	11	17	0	9	10
13	11.5	31	8	7	24	0	14	6
14	11.5	26	23	6	26	10	12	50
15	13	20	19	27	19	0	27	10
16	14.5	50	30	6	11	10	8	34
17	5.5	23	15	24	24	0	9	1
18	13	31	28	10	23	1	9	16
19	10	7	10	13	18	1	1	11
20	19	24	22	12	18	12	17	27
21	10	37	3	5	17	0	0	7
22	13	38	6	6	26	0	0	11
23	13	24	5	6	15	0	3	8

PD) Plántulas dañadas.

Los niveles de incidencia detectados fueron menores en las pruebas de PDA y Germinación respecto a la de congelamiento o Blotter lo que les resta

confiabilidad para una exacta cuantificación del nivel de *F. moniliforme* presente en los lotes. No obstante de ser el **PDA** una prueba altamente utilizada en la detección de hongos en semilla, para esta especie en particular, no resultó ser la más adecuada, esto al compararla con los resultados obtenidos en el ensayo **Blotter**. El ensayo de **Germinación** para sanidad detectó niveles superiores al **PDA** pero menores a **Blotter**. Así la prueba que resultó ser más sensible para detectar mayores niveles de incidencia fue la incubación en **Blotter**. En el examen directo de cuantificación de semilla manchada el manchado café mostró altos valores respecto a los otros ensayos (Cuadro 4. 6).

En el Cuadro A.4 se muestra la comparación de medias de los niveles de incidencia para las diferentes variables en los ensayos evaluados. Ahí se observa la agrupación de los lotes estadísticamente iguales.

La prueba de **Blotter** resultó ser la más sensible al detectar los más altos valores de infección en la mayoría de los lotes. Esto corrobora su aplicación de uso en forma de rutina en evaluaciones de sanidad para detección de *Fusarium* spp. (Nath *et al*, 1970) siendo su aplicación como ensayo de rutina en el manejo de germoplasma para ensayos internacionales en el CIMMYT.

Así mismo, al determinar el coeficiente de correlación entre ensayos indicado en el cuadro 4.7, señala significancia entre esta prueba y los porcentajes de incidencia en otros ensayos así el porcentaje de incidencia detectado en **PDA**

tuvo un coeficiente de $.67^*$, con **Germinación** de $.50^*$ y entre los ensayos **PDA** y **Germinación** de $.57^*$.

En cuanto a la variable plántulas dañadas no se presentó correlación significativa respecto a algún otro ensayo.

Para los ensayos de incubación directa, destaca el que el manchado tipo rayado, presentó correlación significativa respecto a los tres ensayos de incubación; esto concuerda con lo observado por Singh y Singh (1977) quienes encontraron también que semillas infectadas por este patógeno pueden presentar estrías o rayas blancas, asimismo se encontró una correlación de $.51^*$ entre el total de manchado de semilla en peso y número.

Respecto a los porcentajes de semilla manchada café, no se encontró correlación respecto a la incidencia de patógenos en los ensayos de incubación, no obstante los altos porcentajes presentados de este tipo de manchado.

Cuadro 4.7. Coeficientes de correlación de los porcentajes de incidencia de *Fusarium moniliforme* y los ensayos de observación directa detectados en lotes de semilla comercial de maíz en ensayos de sanidad. UAAAN 1995.

	PDA	Blotter	Germ.	Plant. Dañadas an Germ.	Manchado peso	manchado rosa	manchado café	manchado rayado	total manchado en número
PDA	1.00	.67*	.57*	-.00	.20.	-.33	.18	.44*	.25
Blotter		1.00	.50*	-.12	.12	-.21	.17	.42*	.06
Germinación			1.00	.32	.53*	-.12	.21	.51*	.40
Plant. dañadas enGerm.				1.00	-.31	-.28	-.36	.36	-.06
% manchado en peso					1.00	.31	.42*	.14	.51*
manchado rosa						1.00	-.08	-.28	.41
manchado café							1.00	.22	.53*
manchado rayado								1.00	.65*
total man. en número									1.00

* Significativo al nivel 0.05

De acuerdo a los niveles de incidencia detectados en los diferentes ensayos, la prueba que mejor detectó la incidencia de *Fusarium moniliforme* fue la de incubación en **Blotter**, ya que presentó los valores más altos, y por tanto mayor sensibilidad en su detección (Figura 4.2). Así mismo, la determinación de manchado rayado puede ser un auxiliar en la detección de este patógeno.

En cuanto a la utilidad de los ensayos **PDA** y **Germinación** estas pruebas detectaron diferencias entre los lotes y presentaron alta correlación con el ensayo más sensible, no obstante los niveles de infección que detectan resultan ser bajos y por lo tanto no determinantes del nivel de infección real de los lotes, debido a que este patógeno requiere de condiciones de alta humedad para su desarrollo, por lo que en la incubación en **PDA** solo aquellas semillas con un mayor nivel de infección o localización superficial desarrollan el hongo, mientras que en el ensayo de **Germinación** aunque las condiciones son propicias para el desarrollo de este patógeno, resulta poco práctico el no poder realizar conteos diarios, ya que esto implica el riesgo de contaminación externa, en **Blotter** en cambio, el patógeno se desarrolló en su máxima expresión independientemente de su nivel de infección y localización en la semilla.

Además el ensayo en **Blotter** resulta ser más aplicable para un uso de rutina dada la simplicidad de la metodología y al no requerir alta destreza en su implementación, aunado a su menor costo, facilita su detección y cuantificación.

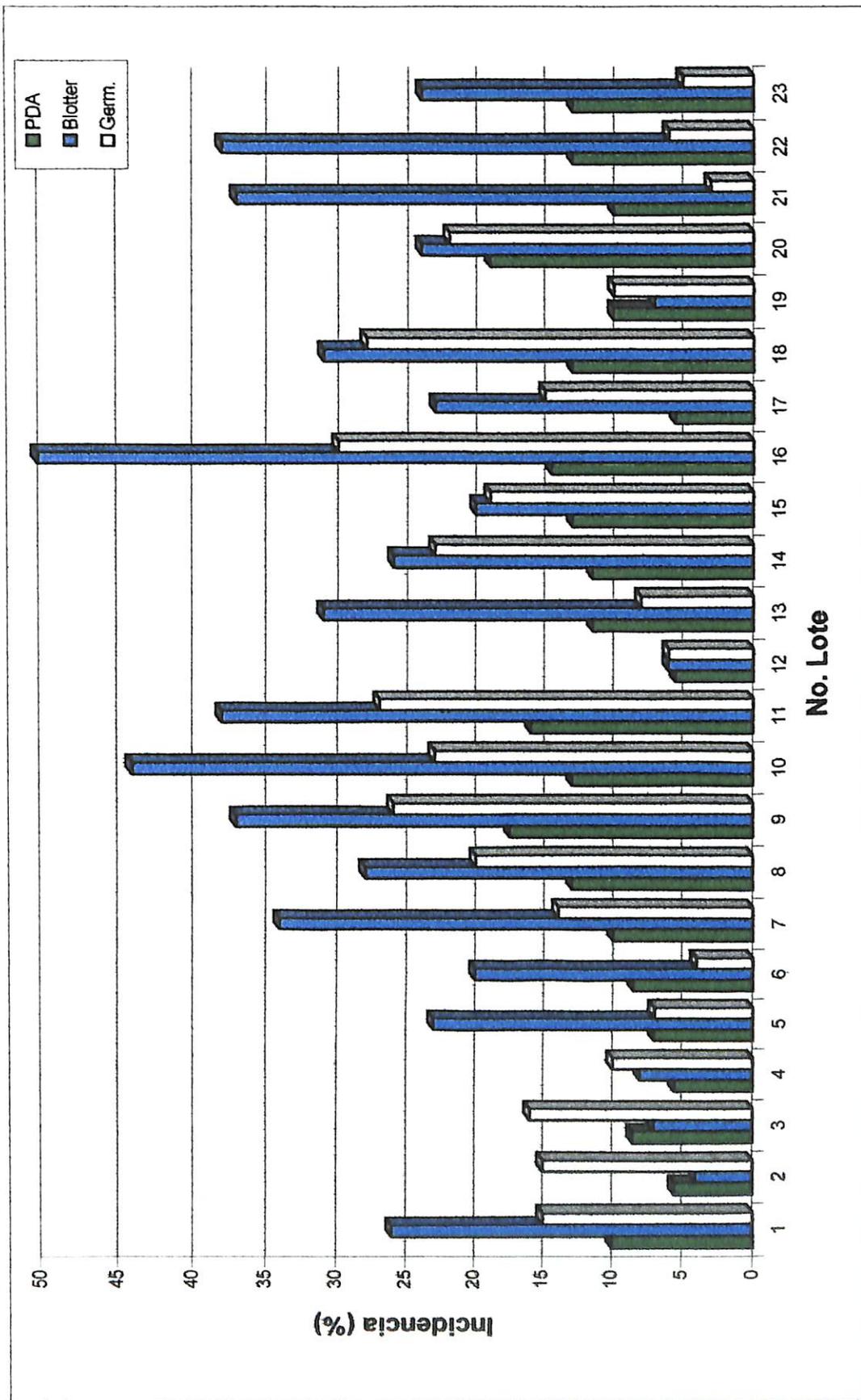


Fig. 4.2 Incidencia de *Fusarium moniliforme* en lotes de semilla comercial de maíz en ensayos de incubación. UAAAN 1995

No obstante su sensibilidad, el factor de congelamiento, que en ocasiones bien pudiera ser una limitante por el costo que representa un equipo de frío adecuado, pudiera este aspecto de inhibición de la germinación ser reemplazado y lograrse mediante el uso del herbicida 2,4,D (ácido 2,4 diclorofenoxiacético) al 0.1 - 0.2 por ciento (Copeland and Mc Donald, 1985) que ha sido recomendado para este mismo ensayo en leguminosas (Neergaard, 1979).

Algunos aspectos que deban cuidarse en este ensayo son el proporcionar la cantidad suficiente de humedad a la siembra de la semilla para que esta se mantenga durante el periodo del mismo, así como el manejo o cambios de temperaturas deben ser realizados con precaución a fin de evitar la movilidad de las semilla y evitar el contacto de unas con otras, lo que pudiera alterar los resultados.

CONCLUSIONES

Los 23 lotes de semillas evaluados, presentaron incidencia de algún organismo patógeno, no obstante, el nivel dependió del ensayo utilizado.

Los ensayos de incubación evaluados, detectaron la incidencia de *Fusarium moniliforme* en semilla comercial de maíz y en altos niveles ; y en éste sentido el ensayo de papel filtro con congelamiento o **Blotter** resultó ser la prueba más confiable para su detección, dada su alta sensibilidad, e inducción a su desarrollo, igualmente por su simplicidad de manejo y bajo costo, respecto a otros ensayos evaluados.

La cuantificación del manchado de la semilla, resultó ser un buen indicador y puede ser un auxiliar en la determinación de la condición sanitaria en lotes de semilla de maíz. El manchado tipo rayado, puede ser un indicador de la presencia de *Fusarium moniliforme* .

El lote que resultó con mayor incidencia de *Fusarium moniliforme* fue procedente de Celaya, Gto. Con 50 por ciento y el lote que resultó con la menor incidencia fue procedente de Sayula, Jal.

RESUMEN

La micoflora patógena de 23 lotes de semilla comercial de maíz, producida en Tamaulipas y en la zona bajo del país, fue detectada, a fin de determinar la condición sanitaria de los lotes. De igual manera, se evaluó la eficiencia de metodologías de ensayos sanitarios, particularmente en la determinación del nivel de incidencia del hongo *Fusarium moniliforme*, causante de las pudriciones de tallo y mazorca que ocasionan importantes pérdidas en la producción de maíz de estas regiones, tanto de grano como de semilla.

Para el análisis sanitario de micoflora, se utilizaron tres ensayos de incubación; en Papa Dextrosa Agar (PDA); incubando la semilla en papel filtro con congelamiento (Blotter), y en una prueba de germinación para sanidad. En estos ensayos se cuantificó el porcentaje de incidencia por patógeno, el de incidencia total de patógenos y el porcentaje de plántulas dañadas por los microorganismos durante la germinación.

La micoflora, encontrada en los lotes de semilla en los ensayos fue: *Penicillium spp.*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* y *Fusarium spp.* en este género se clasificó únicamente la especie *Fusarium moniliforme*.

Penicillium spp., *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* y *Fusarium spp.* en este género se clasificó únicamente la especie *Fusarium moniliforme*.

Se encontraron diferencias significativas entre lotes para todas las variables evaluadas; así mismo, al determinar el grado de asociación entre éstas se detectó significancia entre los valores medios obtenidos en la variable de porcentaje de incidencia total entre los ensayos **PDA** y **Blotter**.

Los valores de incidencia fluctuaron de 12.5-43.5 por ciento en **PDA** ; de 10-53 por ciento en la prueba de congelamiento o **Blotter** y de 5-49 por ciento en **Germinación para sanidad**, lo cual muestra las diferencias existentes en cuanto a la sanidad de semilla comercial y la diferente respuesta de los microorganismos a cada ensayo.

En la evaluación de ensayos para la determinación de niveles de incidencia de *Fusarium moniliforme* en la semilla, se utilizaron dos ensayos más, estos fueron de observación directa, en uno de los cuales se cuantificó el porcentaje de manchado en peso y en el otro se clasificó la muestra en tres diferentes tipos de manchado en café, rosado y un manchado blanco rayado (tipo estrías), mismos que fueron comparados con los niveles de incidencia de este hongo detectados en los ensayos de incubación. Los resultados confirmaron que existe correlación entre el grado de manchado de la semilla y la presencia de *F. moniliforme*, ya que los lotes que presentaron mayor

porcentaje de manchado presentaron mayor número de patógeno; así mismo se encontró que el tipo de manchado rayado son un indicador de la presencia de *Fusarium moniliforme* en la semilla de maíz.

En cuanto a la relación porcentaje de incidencia en la semilla, el grado de manchado y plántulas dañadas con sintomatología de ataque fungoso como ablandamiento de tejido o coloraciones de rosa o café a nivel de plúmula y radícula no se encontró correlación significativa.

El ensayo que resultó ser más sensible y por tanto detectó mayores niveles de incidencia de *F. moniliforme* fue la prueba de congelamiento o Blotter, observando además que la respuesta del patógeno no fue la misma en cada ensayo, ya que presentó cambios como en el color de blanco a púrpura, sin embargo la presencia de largas cadenas de microconidios y la forma de los macroconidios fueron las características que permitieron su correcta identificación y además, debido a la simplicidad de su metodología en este ensayo, puede ser utilizado en forma de rutina en la determinación de esta especie en semilla, ya que fundamental durante su manejo.

Este trabajo refleja la importancia de la detección de la condición sanitaria en lotes de semilla comercial, tanto para un buen establecimiento en campo, como para la determinación de índices de incidencia permitidos en un lote de semillas.

LITERATURA CITADA

- Agrios, N.G. 1989. Fitopatología. traduc. Manuel Guzmán O. Edit. Limusa. México.
- Ahmed, S.I. and Blutta, A.R. 1989. Seed-borne fungal pathogens of maize in Pakistan. Pakistan Journal of Scientific and Industrial Research. 32(2) 1 107-109. Pakistan.
- Anderegg, J. and Guthrie, W.J. 1981. Seedborne *Fusarium moniliforme* and seedling infection in hybrid sweet corn. Phytopathology. vol. 71 No. 11 1981. U.S.A.
- Besnier, R.F. 1989. Semillas. Biología y Tecnología. Ediciones mundi-prensa. Madrid, España. 525-546.
- Booth, 1977. *Fusarium* Laboratory guide to the identification of the major species. Common wealth Micological Institute. Kew, Surrey, England.
- Burgess, L. W. and Liddell, M.C. 1983. Laboratory Manual for *Fusarium* research. Incorporation a key and descriptions of common species found in Australia. The University of Sydney.
- Campos, L. C. 1981. Patología da Sementes. IV Congreso Paulista de Fitopatología Instituto Agronómico de Campinas. Enero 19 -22 . en Summa Phytopathologica. vol 7. Rio de Janeiro. Brasil.
- Castaño, J. J. 1978. Enfermedades del Maíz en Colombia. Noticias Fitopatológicas. vol. 4 Núm.2 ICA, Colombia.
- Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). 1979. Semilla de Frijol de buena calidad. Serie 04-SB -12.03. Cali, Colombia.
- Copeland, L.O. and Mc Donald, M. B. 1985. Principles of Seed Science and Technology. a. De. Burgess Publishing Company. Mineapolis Minesota. U.S.A.
- Deakin, P. J. 1974. Association of seed color with emergence and seed yield of Snap Beans. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 99:110-114. U.S.A.
- Foley, C. D. 1962. Systemic Infection of corn by *Fusarium moniliforme*. Phytopathology. vol. 52:8. U.S.A.

- Garay, E.A. 1989. La calidad de la semilla y sus componentes. Primer curso avanzado sobre sistemas de semillas para pequeños agricultores. CIAT, mayo 15 a junio 23. Cali, Colombia.
- Harrington, J.F. 1973. Problems of seed storage. In W. Heydeck. Seed Ecology. London
- International Seeds Testing Association (ISTA), 1985. International rules of seed testing. Rules 1985. Seed Science and Technology. 13 : 299-335.
- Lawrence, E.B. ; Nelson, P.E. and Ayers, J.E. 1981. Histopathology of sweet corn seed and plants infected with *Fusarium moniliforme* and *Fusarium oxysporum*. Phytopathology. 71 (4): 379-386. U.S.A.
- Lenné, J. 1985. Pruebas de Sanidad en Semillas. Patógenos en Semillas de Plantas Forrajeras Tropicales, significancia y métodos de detección. Reunión de trabajo sobre el análisis de semillas de especies de pastos tropicales. IDTSA, CIAT. Cali, Colombia.
- León, C. de 1984. Enfermedades del Maíz. Una guía para su identificación en el campo. Programa de Maíz. CIMMYT, México.
- Leslie, F.J. 1991. Mating Populations *Giberella fujikuroi* (*Fusarium* section Liseola). In Recent Advances in *Fusarium* Systematics. Phytopathology. Vol 81. No. 9.
- Manzo, S.K. and Clafin, L.E. 1984. Survival of *Fusarium moniliforme* hyphae and conidia in grain sorghum stalks. Plant Disease. 68 (10) 866-867 U.S.A.
- Marassas, W. F.O., Kriek N.P.J. Wiggins, V. M. Steyn, P.S., Towers, D. K. And Hastie, T. J.. 1979. Incidence, geographic distribution and toxigenicity to *Fusarium moniliforme* on emergence, plant growth and yield of maize. Seed Science and Technology. 10:347-356. The Netherlands.
- Mc Gee, C. D. 1988. Maize Diseases. A reference source for seeds technologists. APS PRESS The American Phytopathological Society. St. Paul Minnesota. pg. 13-16. U.S.A.
- Messiaen, C. M. et Cassini, R. 1960. Recherches sur les Fusarioses IV La Systematique des *Fusarium*. Ann. Epiphythas 19 (3): 307-454. Institut National de la Recherche Agronomique. France.

Moreno, M. E. 1984. Análisis Físico y Biológico de Semillas Agrícolas. Universidad Nacional Autónoma de México. Instituto de Biología. México, D.F.

_____ 1988. Identificación de hongos de Almacén. Universidad Nacional Autónoma de México. Edit. Limusa, México.

_____ 1993. Tratamiento químico de las semillas para el combate de los hongos. Programa Universitario de Alimentos UNAM. Edit. Limusa México.

Nath, R.; Neergaard, P. and Mathur, S.B. 1970. Identification of *Fusarium* spp. on seed as they occur in Blotter test. Reprint from Proc. Int. Seed Test. 35 121-144. Copenhagen, Denmark.

Navarrete, M. 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 en Fitopatología. Colegio de Postgraduados. Montecillos, México.

_____ 1990. Sanidad de Semillas en Postcosecha. En Memorias del VI Curso de Actualización en Tecnología de Semillas. Universidad Autónoma Agraria "Antonio Narro" Buenavista, Saltillo, Coahuila.

_____ 1992. Patología de Semillas. Curso de Verano. Centro de Capacitación y Desarrollo en Tecnología de Semillas. UAAAN. Buenavista, Saltillo, Coahuila.

_____ 1995. Ensayos de Sanidad de Semillas. I Curso taller Internacional sobre métodos para la Detección de patógenos en Semillas. Memorias. Universidad Autónoma Agraria "Antonio Narro", Buenavista, Saltillo, Coahuila.

Neergaard, P. 1979. Seed Pathology. Mac Millan. vol. 1. Press Ltd. London and Basingstoke.

Nelson, P. E. 1991. History of *Fusarium* Systematics. In Recent Advances in *Fusarium* Systematics. Phytopathology. vol 81, No. 9 1045-1048. U.S.A.

Peretti, A. 1994. Manual para Análisis de Semillas. Buenos Aires Hemisferio Edit. Argentina.

Pérez, R.A. 1985. Efecto de Varios Niveles de Filtrado Tóxico de *Fusarium* spp. En el comportamiento in vitro de varias líneas de maíz. Tesis Profesional. UAAAN. Buenavista, Saltillo, Coahuila.

- Pitt, J.I. 1985. A Laboratory Guide to Common *Penicillium* species. CSIRO. Division of Food Research. Australia.
- Popinigis, F. 1985. Fisiologia da Semente. Segunda Edición. ED. Brasilia. Brasil.
- Rojas, G.M. y Rovalo, M. 1984. Fisiología Vegetal Aplicada. 3a. De. MacGraw-Hill México, D.F.
- Romero, C.S. 1993. Hongos Fitopatógenos. Universidad Autónoma de Chapingo. México
- Rosas, R.M. 1991. The effect of seedborne fungi on seed vigor in cereales. Revista Mexicana de Fitopatología. 9 : 31-37. México.
- _____ 1993 Curso Fitopatógenos Transmitidos por Semilla. Centro de Fitopatología. Colegio de Postgraduados Montecillos, México.
- Sánchez, A. A. 1994. Curso Patología de Semillas. CCDTS. Universidad Autónoma Agraria "Antonio Narro", Buenavista, Saltillo, Coahuila
- Sinclair, J.B. 1981. Fungicide sprays for the control of seed-borne pathogens of rice, soybeans and wheat. Seed Science and Technology. 9:697-671 The Netherlands.
- Singh, D. and Singh, T. 1977. Location of *Fusarium moniliforme* in kernels of maize and disease transmission. Indian J. Mycol. Plant Pathology. 7:32-38. India
- Styer, R.C. and Cantliffe, D.J. 1984. Infection of two endosperm mutants of sweet corn by *Fusarium moniliforme* and its effect on seedling vigor. Phytopathology vol 74 No. 2.
- Thomson, J.R. 1979. Introducción a la Tecnología de las Semillas. Traducción de An Introduction to Seed Technology por Paloma Melargarejo. Edit. Acribia. Zaragoza. España. pg. 263-265.
- Tousson, T.A. and Nelson, P.E. 1968. A Pictorial guide to the identification of *Fusarium* species according to the taxonomic system of Snider and Hansen. The Pennsylvania State University Press. University Park London

Valadéz, M.E. 1985. Aspectos Generales sobre Patología de Semillas. En Memorias de la 1a. Reunión Nacional sobre Producción de Semillas en México. Chapingo, México

Warham, J.E. 1984. Pruebas de Sanidad en Semillas. Memorias del II Curso de Actualización en Semillas. UAAAN. Buenavista, Saltillo, Coahuila.

_____. 1985. Pruebas de Sanidad en Semillas de maíz. Memorias del Curso Enfermedades Transmitidas por Semilla. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Cali, Colombia.

Zillinsky, F.J. 1984. Enfermedades comunes de los cereales de grano pequeño Una guía para su identificación. Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT) El Batán, México.

APENDICE

Cuadro A.1 Comparación de medias de variables de micoflora (%) detectada en lotes de semilla de maíz, en ensayo de sanidad PDA. UAAAN.1995

Fusarium moniliforme

No. Lote	Incidencia (%)	
20	19	A
9	17.5	AB
11	16	ABC
16	14.5	ABCD
15	13	ABCD
10	13	ABCD
18	13	ABCD
8	13	ABCD
22	13	ABCD
23	13	ABCD
13	11.5	BCDE
14	11.5	BCDE
7	10	CDEF
21	10	CDEF
1	10	CDEF
19	10	CDEF
6	8.5	DEF
3	8.5	DEF
5	7	EF
4	5.5	F
17	5.5	F
2	5.5	F
12	5.5	F

Fusarium spp.

No. Lote	Incidencia (%)	
14	16	A
20	16	A
15	14.5	A
10	13	A
8	13	A
22	13	A
11	11.5	A
13	11.5	A
1	10	A
3	10	AB
16	10	AB
18	10	AB
5	10	AB
21	10	AB
6	10	AB
2	9.5	AB
19	8.5	AB
9	8.5	AB
12	7	B
4	7	B
23	7	B
7	5.5	B
17	5.5	B

Penicillium

No. Lote	Incidencia (%)	
7	8.5	A
11	8.5	A
14	8.5	A
20	8.5	A
22	8.5	A
1	7	A
12	5.5	AB
9	5.5	AB
17	5.5	AB
18	5.5	AB
19	5.5	AB
10	5.5	AB
21	5.5	AB
6	5.5	AB
15	0	C
16	0	C
4	0	C
5	0	C
2	0	C
3	0	C
13	0	C
8	0	C
23	0	C

Incidencia total de patógenos

No. Lote	Incidencia (%)	
20	43.5	A
14	36	B
11	36	B
22	34.5	BC
9	31.5	CD
10	31.5	CD
18	28.5	DE
15	27.5	DEF
1	27	EF
8	26	EFG
21	25.5	EFG
16	24.5	FG
6	24	FG
7	24	FG
19	24	FG
13	23	GH
23	20	HI
3	18.5	IJ
12	18	IJ
5	17	IJK
17	16.5	JK
2	15	KL
4	12.5	L

Cuadro A.2 Comparación de medias de variables de micoflora en lotes de semilla de maíz en ensayo de sanidad **Blotter**. UAAAN.1995

<i>Fusarium moniliforme</i>		<i>Fusarium spp.</i>		<i>Aspergillus flavus</i>	
No. Lote	Incidencia (%)	No. Lote	Incidencia (%)	No. Lote	Incidencia (%)
16	50 A	14	24 A	5	12 A
10	44 B	3	15 B	6	10 AB
22	38 BC	1	14 B	23	6 BC
11	38 BC	11	11 B	15	6 BC
9	37 CDE	19	9 B	20	5 CD
21	37 CDE	2	6 C	3	4 D
7	34 CDEF	4	6 C	8	4 D
13	31 CDEF	9	3 C	18	4 D
18	31 CDEF	12	3 C	17	4 D
8	28 DEFGH	21	3 C	10	4 D
14	26 DEFGH	6	0 D	4	4 D
1	26 DEFGH	7	0 D	19	4 D
20	24 EFGH	13	0 D	13	1 E
23	24 EFGH	8	0 D	14	1 E
17	23 EFG	15	0 D	7	1 E
5	23 FGH	16	0 D	16	1 E
6	20 H	17	0 D	1	1 E
15	20 H	18	0 D	9	1 E
4	8 I	5	0 D	2	1 E
3	7 I	20	0 D	11	1 E
19	7 I	10	0 D	21	1 E
12	6 I	22	0 D	22	1 E
2	4 I	23	0 D	12	1 E

<i>Aspergillus niger</i>		Incidencia total	
No. Lote	Incidencia (%)	No. Lote	Incidencia (%)
18	10 A	16	53 A
21	5 B	14	51 AB
23	4 BC	11	50 ABC
7	2 C	10	48 ABCD
1	2 C	21	46 ABCD
3	2 C	18	45 ABCDE
22	2 C	1	43 ABCDE
5	2 C	9	41 ABCDE
9	0 D	22	41 ABCDE
10	0 D	5	37 ABCDE
11	0 D	7	37 BCDEF
12	0 D	23	34 CDEF
13	0 D	8	32 CDEF
14	0 D	13	32 CDEF
15	0 D	6	30 CDEF
16	0 D	20	29 DEF
17	0 D	3	28 EF
2	0 D	17	27 EF
19	0 D	15	26 EFG
20	0 D	19	20 GHI
6	0 D	4	18 HI
4	0 D	2	11 HI
8	0 D	12	10 I

Cuadro A. 3 Comparación de medias de variables de micoflora en lotes de semilla de maíz en ensayo de Germinación para Sanidad. UAAAN 1995.

% de germinacion

No. Lote	Incidencia (%)
14	99 A
3	99 A
21	99 A
22	99 A
18	98 AB
9	98 AB
16	98 AB
19	97 ABC
2	96 ABCD
10	96 ABCD
20	95 ABCDE
23	95 ABCDE
5	94 BCDE
11	94 BCDE
8	92 CDE
13	92 CDE
12	91 CDEF
6	90 DEFG
1	87 EFG
15	80 FGH
7	79 GH
4	74 H
17	74 H

Plántulas dañadas

No. Lote	Incidencia (%)
15	27 A
9	23 AB
17	24 AB
4	22 AB
1	17 BC
11	12 CD
10	15 CD
19	13 CD
20	12 CDE
12	11 DEF
8	11 DEF
18	10 DEFG
5	10 DEFGH
2	9 EFGHI
13	7 FGHI
16	6 GHI
23	6 GHI
14	6 GHI
22	6 GHI
21	5 HI
6	4 I
3	4 I
7	3 I

Penicillium spp.

No. Lote	Incidencia (%)
11	22 A
22	22 A
14	17 AB
6	10 BC
16	9 C
9	9 C
2	8 CD
7	8 CD
13	8 CD
12	7 CD
18	6 CDE
15	6 CDE
1	5 CDE
5	5 CDE
20	3 DEF
10	3 EFG
8	2 EFGH
21	2 GH
4	1 GH
23	0 H
3	0 H
19	0 H
17	0 H

Fusarium moniliforme

No. Lote	Incidencia (%)
16	30 A
18	28 AB
11	27 AB
9	26 ABC
10	23 ABCD
14	23 BCD
20	22 BCDE
8	20 CDEF
15	19 DEFG
3	16 EFG
1	15 FGH
17	15 FGH
2	15 FGH
7	14 GH
19	10 HI
4	10 HI
13	8 IJ
5	7 IJK
12	6 IJK
22	6 IJK
23	5 JKL
6	4 KL
21	3 L

Incidencia total

No. Lote	Incidencia (%)
11	49 A
14	40 AB
16	39 AB
9	35 ABC
18	34 ABCD
22	28 ABCD
10	26 ABCD
20	25 ABC
15	25 ABCDE
7	22 ABCDE
1	20 BCDEF
8	17 BCDEF
3	16 CDEF
2	16 CDEF
13	16 CDEF
17	15 DEF
6	14 DEFG
12	13 EFGH
5	12 FGH
4	11 FGH
19	10 GH
21	5 GH
23	5 H

Cuadro A.4 Comparación de medias de la variable *Fusarium moniliforme* en lotes de semilla de maíz en diferentes ensayos de sanidad. UAAAN 1995.

PDA			Blotter		
No. Lote	Incidencia (%)		No. Lote	Incidencia(%)	
20	19	A	16	50	A
9	17.5	AB	10	44	B
11	16	ABC	22	38	BC
16	14.5	ABCD	11	38	BC
15	13	ABCD	9	37	CDE
10	13	ABCD	12	37	CDE
18	13	ABCD	7	34	CDEF
8	13	ABCD	13	31	CDEF
22	13	ABCD	18	31	CDEF
23	13	ABCD	8	28	DEFGH
13	11.5	BCDE	14	26	DEFGH
14	11.5	BCDE	1	26	DEFGH
7	10	CDEF	20	24	EFGH
21	10	CDEF	23	24	EFGH
1	10	CDEF	17	23	EFG
19	10	CDEF	5	23	FGH
6	8.5	DEF	6	20	H
3	8.5	DEF	15	20	H
5	7	EF	4	8	
4	5.5	F	19	7	
17	5.5	F	3	7	
2	5.5	F	12	6	
12	5.5	F	2	4	

Germinación			Germinación		
No. lote	Incidencia (%)		No. lote	Plántulas dañadas (%)	
16	30	A	15	27	A
18	28	AB	9	23	AB
11	27	AB	17	24	AB
9	26	ABC	4	22	AB
10	23	ABCD	1	17	BC
14	23	BCD	11	12	CD
20	22	BCDE	10	15	CD
8	20	CDEF	19	13	CD
15	19	DEFG	20	12	CDE
3	16	EFG	12	11	DEF
1	15	FGH	8	11	DEF
17	15	FGH	18	10	DEFG
2	15	FGH	5	10	DEFGH
7	14	GH	2	9	EFGHI
19	10	HI	13	7	FGHI
4	10	HI	16	6	GHI
13	8	IJ	23	6	GHI
5	7	IJK	14	6	GHI
12	6	IJK	22	6	GHI
22	6	IJK	21	5	HI
23	5	JKL	6	4	
6	4	KL	3	4	
21	3	L	7	3	

Continuación A.4
Observación directa

No. Lote	Semilla manchada (peso)	
14	50.46	A
16	33.73	B
3	29.4	C
20	27.4	CD
10	26.4	CD
2	24.8	CD
8	22.4	DE
11	21.3	EF
7	20.4	FG
1	19.8	GH
6	17.0	H
18	15.86	H
17	15.0	I
19	11.4	I
22	10.8	IJ
12	10.4	IJ
15	9.93	JK
23	7.93	KL
21	7.0	KLM
13	6.13	KLM
9	5.7	LM
5	5.6	M
4	4.46	M

Observación directa

No. Lote	semilla manchada café	
3	33.21	A
2	28.3	B
6	27.9	BC
1	26.2	BCD
22	26.0	BCD
14	25.8	BCD
11	24.8	BCD
10	24.8	BCD
7	24.8	BCD
5	24.7	BCD
17	24.5	BCD
13	23.8	CD
18	23.0	DE
15	19.3	EF
20	18.4	FG
19	18.0	FG
8	17.0	FG
21	16.7	FGH
12	16.7	FGH
4	16.4	FGH
23	15.5	GHI
9	12.8	HI
16	11.0	I

Observación directa

No. Lote	Semilla manchado rosado	
20	11.6	A
16	10.3	A
14	10.0	A
4	1.6	B
5	1.6	B
6	1.3	B
19	1.3	B
7	1.3	B
9	1.0	B
18	1.0	B
11	0	B
12	0	B
13	0	B
3	0	B
15	0	B
1	0	B
17	0	B
8	0	B
2	0	B
10	0	B
21	0	B
22	0	B
23	0	B

Observación directa

No. Lote	Semilla manchado rayado	
15	27.0	A
19	18.0	B
20	16.66	BC
11	14.33	BC
13	13.70	BCD
10	13.0	CDE
9	12.66	CDEF
14	12.33	CDEFG
17	9.33	DEFGH
18	9.33	DEFGH
12	9.0	DEFGH
7	8.3	EFGH
16	8.0	FGH
8	7.66	GHI
6	5.33	HIJ
23	3.0	IJK
4	1.0	JK
5	1.0	JK
2	1.0	JK
1	0	K
21	0	K
22	0	K
3	0	K