

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA
COLEGIO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
FACULTAD DE AGRONOMÍA
MAESTRÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS



**IDENTIFICACIÓN MOLECULAR, CARACTERIZACIÓN
MORFOLÓGICA Y POTENCIAL PATOGENICO DE ESPECIES DE
Fusarium CAUSANTES DE LA FUSARIOSIS EN MAÍZ EN SINALOA**

TESIS

**QUE COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS**

**PRESENTA:
ALAN DOURIET ANGULO**

**DIRECTOR DE TESIS:
DR. CARLOS ALFONSO LÓPEZ ORONA**

**CO-DIRECTOR DE TESIS:
DR. GUADALUPE ALFONSO LÓPEZ URQUÍDEZ**

CULIACÁN, SINALOA. AGOSTO DE 2019

LA PRESENTE TESIS TITULADA “IDENTIFICACIÓN MOLECULAR, CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y POTENCIAL PATOGENICO DE ESPECIES DE *Fusarium* CAUSANTES DE LA FUSARIOSIS EN MAÍZ EN SINALOA” FUE REALIZADA POR ALAN DOURIET ANGULO, BAJO LA DIRECCIÓN DEL CONSEJO PARTICULAR QUE SE INDICA, Y HA SIDO **APROBADA** POR EL MISMO Y **ACEPTADA** COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

CONSEJO PARTICULAR

DIRECTOR: _____

DR. CARLOS ALFONSO LÓPEZ ORONA

CO-DIRECTOR: _____

DR. GUADALUPE ALFONSO LÓPEZ URQUÍDEZ

ASESOR: _____

DR. FELIPE AYALA TAFOYA

ASESOR: _____

DR. MOISÉS GILBERTO YÁÑEZ JUÁREZ

ASESOR: _____

DRA. MITZI DAYANIRA ESTRADA ACOSTA

CULIACÁN, SINALOA. AGOSTO DE 2019



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA
COLEGIO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
FACULTAD DE AGRONOMÍA CULIACÁN
FACULTAD DE AGRONOMÍA VALLE DEL FUERTE
FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR
FACULTAD DE AGRONOMÍA VALLE DEL CARRIZO

En la Ciudad de Culiacán Rosales, Sinaloa, el día 20 de enero del año 2020, el que suscribe Alan Douriet Angulo, alumno del Programa de Maestría en Ciencias Agropecuarias, con número de cuenta 0919558-0, de la Unidad Académica Facultad de Agronomía Culiacán, del Colegio de Ciencias Agropecuarias de la UAS, manifiesta que es autor intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de la Dr. Carlos Alfonso López Orona y cede los derechos del trabajo titulado “Identificación molecular, caracterización morfológica y potencial patogénico de especies de *Fusarium* causantes de la fusariosis en maíz en Sinaloa”, a la Facultad de Agronomía Culiacán, del Colegio de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma de Sinaloa, para su difusión, con fines académicos y de investigación por medios impresos y digitales, todo esto en apego al artículo 27 de la Ley Federal de Derechos de Autor.

La Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México) protege el contenido de la presente tesis. Los usuarios de la información contenida en ella deberán citar obligatoriamente la tesis como fuente, dónde la obtuvo y mencionar al autor intelectual. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ATENTAMENTE


Alan Douriet Angulo

CORREO ELECTRÓNICO: Alandouriet9@gmail.com
CURP: DOAA921218HSLRNL03

DEDICATORIA

Esta tesis va con dedicatoria especial para mi señora madre, la cual me ha apoyado a lo largo de toda mi formación como profesional, siempre ha buscado y encontrado la manera de sacarme adelante a mí y a mis hermanos, los cuales son el motivo de querer salir adelante para ser un profesional más preparado y así ayudarlos en su camino. Madre, muchas gracias por todo lo que me has enseñado a lo largo de mi vida, nunca podré pagarlo.

También quiero hacer una mención para mis señores abuelos, Vicente Douriet, Rosalinda Aguilar, Alicia Camacho e Ildefonso Angulo, aunque ya no estés conmigo, han sido pilares fundamentales en mi vida, enseñándome cualidades como la bondad, el amor, y la perseverancia, les agradezco por todo.

A toda mi familia en general, han sido maravillosos.

AGRADECIMIENTOS

Le agradezco ampliamente al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por haberme otorgado el apoyo económico para el financiamiento de mi formación académica.

A la Universidad Autónoma de Sinaloa, por permitirme formarme en su programa de Maestría en Ciencias Agropecuarias.

A la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Sinaloa, por todas las atenciones y facilidades brindadas durante el periodo de mis estudios de maestría.

Al Dr. Carlos Alfonso López Orona, por otorgar su confianza, creer en mí, guiarme en mi formación y ser mi mentor.

Al Dr. Guadalupe Alfonso López Urquídez por sus consejos y apoyo durante mi formación académica.

Un agradecimiento también para todos mis compañeros de laboratorio. Tomás, Martín, Lorena, Jorge y Walter, muchas gracias por todo.

A la Universidad de Almería, por haberme permitido realizar mi estancia de investigación bajo la tutela del Dr. Francisco Javier Tello Marquina.

A Gabriela Ornelas, mi pareja, por su apoyo incondicional, bajo cualquier circunstancia siempre estuvo presente para darme palabras de ánimo.

ÍNDICE GENERAL

ABREVIATURAS	i
ÍNDICE DE CUADROS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	v
ÍNDICE DE ANEXOS	ix
RESUMEN	xi
ABSTRACT	xii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. JUSTIFICACIÓN	3
III. HIPÓTESIS	4
IV. OBJETIVOS	4
4.1. Objetivo general	4
4.2. Objetivos específicos	4
V. REVISIÓN DE LITERATURA	5
5.1. El maíz en México	5
5.1.1. Importancia del maíz en México	5
5.1.2. Importancia del cultivo de maíz en Sinaloa	5
5.2. Características botánicas de la planta de maíz	6
5.3. Clasificación taxonómica del maíz	6
5.4. Etapas del cultivo de maíz	7
5.4.1. Germinación	7
5.4.2. Crecimiento vegetativo	7
5.4.3. Floración	8
5.4.4. Fructificación	8
5.5. Condiciones edafoclimáticas favorables para el desarrollo del maíz	8
5.5.1. Temperatura	8
5.5.2. Tipo de suelo y pH del suelo	9
5.5.3. Humedad del suelo	9
5.6. Enfermedades ocasionadas por patógenos en el cultivo de maíz	9
5.7. Estudios previos y distribución geográfica de las distintas especies de <i>Fusarium</i> causando la fusariosis en maíz	10
5.8. Historia y antecedentes del género <i>Fusarium</i>	11

5.9. Clasificación Taxonómica del género <i>Fusarium</i>	13
5.10. Efectos de los hongos sobre plantas hospederas	14
5.10.1. Efecto sobre la fotosíntesis en la planta	14
5.10.2. Efecto sobre la translocación del agua y nutrientes en la planta	14
5.10.3. Efecto en la respiración de la planta	15
5.11. Factores abióticos que afectan el desarrollo de los hongos	15
5.11.1. Factor Temperatura	15
5.11.2. Factor Humedad	16
5.12. Identificación morfológica y caracterización molecular de <i>Fusarium</i> spp.	16
5.13. Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction, PCR)	17
5.14. Electroforesis	18
5.15. Región del gen factor de elongación de la traducción 1 alfa (TEF-1 α)	19
5.16. Secuenciación de ADN	19
5.17. Análisis filogenético	19
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	21
6.1. Marco de muestreo	21
6.2. Esterilización de materiales y medio de cultivo	22
6.3. Aislamiento y purificación de <i>Fusarium</i> spp. a partir de material vegetal infectado	22
6.4. Obtención de cultivos monospóricos	23
6.5. Caracterización morfológica	24
6.6. Extracción de ADN	25
6.7. Amplificación por PCR	26
6.8. Análisis filogenético	27
6.9. Pruebas de patogenicidad en semillas de maíz	27
6.10. Pruebas de patogenicidad en plántulas de maíz	28
6.11. Análisis estadístico	30
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
7.1. Distribución de cultivos monospóricos obtenidos	31
7.2. Caracterización morfológica	31
7.3. Identificación molecular y análisis filogenético	38
7.4. Ensayos de patogenicidad	41
7.4.1. Pruebas de patogenicidad en placas de Petri para semillas de maíz	43

7.4.2. Pruebas de patogenicidad en plántulas de maíz	44
7.4.2.1. Altura de planta	46
7.4.2.2. Biomasa húmeda y seca de las plántulas	48
7.4.2.2.1 Biomasa húmeda (g) de las plántulas	49
7.4.2.2.2. Biomasa seca (g) seco de la planta	50
7.4.2.3. Contenido de clorofila de la planta	51
7.4.2.3.1. Contenido de clorofila en la planta (Evaluación 1)	52
7.4.2.3.2. Contenido de clorofila en la planta (Evaluación 2)	53
7.4.2.3.3. Contenido de clorofila en la planta (evaluación 3)	54
7.4.2.3.4. Contenido de clorofila en la planta (Evaluación 4)	55
7.4.2.3.5. Contenido de clorofila en la planta (Evaluación 5)	56
VIII.-CONCLUSIONES	59
IX.-LITERATURA CITADA	62
X. ANEXOS	66

ABREVIATURAS

ADN: Acido desoxirribonucleico

bp: Pares de bases

°C: Grados centígrados

CIMMYT: Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo

CINVESTAV: Centro de investigación y de estudios avanzados

CLA: Agar de hoja de clavel

cm: centímetros

CONABIO: Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad

CTAB: Bromuro de hexadeciltrimetilamonio

dNTPS:

DSI: Disease Severity Index

EDTA: Acido etilendiaminotetraacetico

E.U.A.: Estados Unidos de América

FSSC: Complejo de especies Fusarium solani

g.: gramos

GL: Grados libertad

GPS: Sistema de Posicionamiento Global

H₂O: Agua

ha: Hectárea

ID: Identificación

Inc.: Incorporado

kWh: Kilovatio hora

LANGEBIO: Laboratorio nacional de genómica para la biodiversidad

M: Molar

Mg⁺²: Magnesio

mg: miligramos

Min.: Minuto

ml: mililitros

MLST: Escritura de secuencias multilocus

mm: milímetros

NaCl: Cloruro de Sodio
NCBI: Centro Nacional para la Información Biotecnológica
ng: Nanogramo
No.: Numero
PCNB: Pentacloronitrobenzeno
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
PDA: Papa dextrosa agar
pH: Potencial hidrogeno
pmol: picomol
r.p.m.: Revoluciones por minuto
seg. : Segundo
SIAP: Sistema de información agroalimentaria y pesquera
spp.: Especies
t: tonelada
Taq: *Thermophilus aquaticus*
TEF-1 α : Región del gen factor de elongación de la traducción 1 alfa
TM: Marca registrada
Tris: tris (hidroximetil)aminometano
UAS: Universidad Autónoma de Sinaloa
UV: Ultravioleta
V: Voltios
 μ m: Micrómetro

ÍNDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Principales municipios productores de maíz en el estado de Sinaloa.	5
Cuadro 2. Condiciones de temperatura de alineamiento y secuencias de primers utilizados para el análisis de PCR de <i>Fusarium</i> spp.	27
Cuadro 3. Cantidad de aislamientos monospóricos de <i>Fusarium</i> spp. obtenidos a partir de las muestras colectadas en cultivos de maíz en los municipios de Culiacán y Guasave en el estado de Sinaloa.	31
Cuadro 4. Origen de las especies de <i>Fusarium</i> identificadas morfológicamente en muestras de maíz en Culiacán y Guasave, Sinaloa.	37
Cuadro 5. Número de accesión de las secuencias de <i>Fusarium</i> spp. obtenidas en el presente estudio.	41
Cuadro 6. Análisis no paramétrico de la varianza con la Prueba de Kruskal-Wallis para el ensayo de patogenicidad en placas de Petri.	43
Cuadro 7. Análisis no paramétrico de la varianza con la Prueba de Kruskal-Wallis para el ensayo de patogenicidad en plántulas de maíz.	44
Cuadro 8. Análisis no paramétrico de la varianza con la Prueba de Kruskal-Wallis para la variable altura en el ensayo de patogenicidad en plántulas de maíz.	46
Cuadro 9. Análisis no paramétrico de la varianza con la Prueba de Kruskal-Wallis para la variable biomasa húmeda (g) en el ensayo de patogenicidad en plántulas de maíz.	49
Cuadro 10. Análisis no paramétrico de la varianza con la	50

	Prueba de Kruskal-Wallis para la variable biomasa seca (g) en el ensayo de patogenicidad en plántulas de maíz.	
Cuadro 11.	Análisis no paramétrico de la varianza con la Prueba de Kruskal-Wallis para la variable verdor de la planta (Evaluación 1) en el ensayo de patogenicidad en plántulas de maíz.	52
Cuadro 12.	Análisis no paramétrico de la varianza con la Prueba de Kruskal-Wallis para el variable verdor de la planta (Evaluación 2) en el ensayo de patogenicidad en plántulas de maíz.	53
Cuadro 13.	Análisis no paramétrico de la varianza con la Prueba de Kruskal-Wallis para la variable verdor de la planta (Evaluación 3) en el ensayo de patogenicidad en plántulas de maíz.	54
Cuadro 14.	Análisis no paramétrico de la varianza con la Prueba de Kruskal-Wallis para la variable verdor de la planta (Evaluación 4) en el ensayo de patogenicidad en plántulas de maíz.	55
Cuadro 15.	Análisis no paramétrico de la varianza con la Prueba de Kruskal-Wallis para la variable verdor de la planta (Evaluación 5) en el ensayo de patogenicidad en plántulas de maíz.	57

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Sitios de origen de los aislamientos de <i>Fusarium</i> spp. en el municipio de Culiacán, Sinaloa.	21
Figura 2. Sitios de origen de los aislamientos de <i>Fusarium</i> spp. en el municipio de Guasave, Sinaloa.	22
Figura 3. Cortes transversales de tejidos vegetales infectados de las plantas de maíz colocados en medio de cultivo PDA.	23
Figura 4. Obtención de cultivos monospóricos. A: Hongo desarrollado a partir del aislamiento del órgano de la planta infectada; B: Diluciones seriadas a partir de la extracción del disco de micelio colocado en el tubo Eppendorf; C: Esporas individuales germinadas en medio de cultivo PDA; D: Cultivo monospórico de <i>Fusarium</i> spp. en medio de cultivo PDA.	24
Figura 5. Identificación morfológica de <i>Fusarium</i> spp. A: Características culturales de <i>Fusarium</i> spp. en medio de cultivo PDA (Coloración y crecimiento de micelio); B: Medio de cultivo agar con hojas de clavel (CLA, por sus siglas en inglés), donde se las estructuras morfológicas se desarrollan con mayor uniformidad; C: Macroconidias de <i>Fusarium</i> spp; D: Microconidias de <i>Fusarium</i> spp.	25
Figura 6. Trituración del micelio en los aislamientos de <i>Fusarium</i> spp. para su posterior extracción de ADN. A: Raspado del micelio en los aislamientos de <i>Fusarium</i> spp.; B: Rompimiento de células de los aislamientos de <i>Fusarium</i> spp. con la ayuda de nitrógeno líquido.	26
Figura 7. Placas de Petri para la evaluación de la patogenicidad en las semillas de maíz.	28

Figura 8.	Charolas donde se llevó a cabo la germinación y ensayo de patogenicidad de <i>Fusarium</i> spp. en plántulas de maíz.	29
Figura 9.	Inoculación de plántulas de maíz con solución fúngica de <i>Fusarium</i> spp.	29
Figura 10.	<i>Fusarium proliferatum</i> . A-B: Macroconidias producidas en medio de cultivo PDA; C: Microconidias producidas en micelio aéreo en medio de cultivo PDA; D: Cultivo monospórico de <i>F. proliferatum</i> en medio de cultivo PDA; E-F: Microconidias <i>in situ</i> en medio de cultivo CLA. A-C, E-F escala= 50 µm.	32
Figura 11.	<i>Fusarium solani</i> . A-B: Macroconidios en medio de cultivo PDA; C-D: Microconidios <i>in situ</i> en medio de cultivo CLA; E: Microconidios en medio de cultivo PDA; F: Cultivo monospórico de <i>Fusarium solani</i> en medio de cultivo PDA. A-E escala= 50 µm.	33
Figura 12.	<i>Fusarium falciforme</i> . A-B: Macroconidios en medio de cultivo PDA; C-D: Microconidios <i>in situ</i> en medio de cultivo CLA; E: Microconidios en medio de cultivo PDA; F: Cultivo monospórico de <i>Fusarium falciforme</i> en medio de cultivo PDA. A-E escala= 50 µm.	34
Figura 13.	<i>Fusarium verticillioides</i> . A-B: Cadenas de microconidios <i>in situ</i> en medio de cultivo PDA; C: Macroconidios <i>in situ</i> en medio de cultivo PDA; D: Microconidias <i>in situ</i> en medio de cultivo PDA; E: Esporodoquios de macroconidias en medio de cultivo PDA; F: Cultivo monospórico de <i>F. verticillioides</i> en medio de cultivo PDA. A-E escala= 50 µm.	34
Figura 14.	<i>Fusarium nygamai</i> . A-B: Macroconidias en medio de cultivo PDA; C-D: Microconidias <i>in situ</i> en medio de cultivo PDA. A-D escala= 50 µm.	35

- Figura 15. Análisis electroforético de los fragmentos amplificados con los primers EF-1/EF-2 mediante PCR. Línea 1: Marcador de peso molecular 100 bp; Línea 2: aislamiento C4M20T; Línea 3: aislamiento G8M2T; Línea 4: C10M19M; Línea 5: G1M7M; Línea 6: G2M8M; Línea 7: Control negativo. 38
- Figura 16. Árbol filogenético construido con base en el método Neighbor-Joining utilizando secuencias EF-1 α de especies del Complejo de Especies de *Fusarium solani*. 39
- Figura 17. Árbol filogenético construido con base en el método Neighbor-Joining utilizando las secuencias EF-1 α de *Fusarium* spp. 40
- Figura 18. Prueba de patogenicidad de *Fusarium* spp. sobre semilla de maíz. A: Inhibición total de la germinación en las semillas de maíz por el aislamiento C1M19T. B: Placas de Petri con testigos negativos, donde todas la semillas lograron germinar exitosamente. 42
- Figura 19. Ensayo de patogenicidad de *Fusarium* spp. en plántulas de maíz. A: Raíz totalmente sana, muestra obtenida del testigo negativo; B: Muestra con 10 % o menos de síntomas de necrosis, muestra obtenida de la plántula inoculada con el aislamiento C10M19M; C: Muestra con 10 % o más de síntomas de necrosis, raíz obtenida a partir de la plántula inoculada con el aislamiento G1M5M; D: Muestra con 50 % o más síntomas de necrosis, muestra obtenida a partir de la plántula inoculada con el aislamiento C10M18T; E: Raíces totalmente infectadas por el hongo, muestra obtenida a partir de la raíz de la plántula inoculada con el aislamiento C7M6M. 42

Figura 20.	Medias de rangos de la patogenicidad de 35 cepas de <i>Fusarium</i> spp. en el ensayo de placas de Petri.	44
Figura 21.	Medias de rangos de la patogenicidad de 35 cepas de <i>Fusarium</i> spp. en el ensayo de plántulas de maíz.	46
Figura 22.	Medias de rangos de la variable altura en el ensayo de patogenicidad en plántulas de maíz en 35 cepas de <i>Fusarium</i> spp.	48
Figura 23.	Medias de rango de la variable biomasa húmeda (g) en el ensayo de patogenicidad en plántulas de maíz en 35 cepas de <i>Fusarium</i> spp.	50
Figura 24.	Medias de rangos de la variable biomasa seca (g) de la planta en el ensayo de patogenicidad en plántulas de maíz en 35 cepas de <i>Fusarium</i> spp.	51
Figura 25.	Medias de rangos de la variable verdor de la planta (Evaluación 1) en el ensayo de patogenicidad en plántulas de maíz en 35 cepas de <i>Fusarium</i> spp.	53
Figura 26.	Medias de rangos de la variable verdor de la planta (Evaluación 2) en el ensayo de patogenicidad en plántulas de maíz en 35 cepas de <i>Fusarium</i> spp.	54
Figura 27.	Medias de los rangos de la variable verdor de la planta (Evaluación 3) en el ensayo de patogenicidad en plántulas de maíz en 35 cepas de <i>Fusarium</i> spp.	55
Figura 28.	Medias de los rangos de la variable verdor de la planta (Evaluación 4) en el ensayo de patogenicidad en plántulas de maíz en 35 cepas de <i>Fusarium</i> spp.	56
Figura 29.	Medias de los rangos de la variable verdor de la planta (Evaluación 5) en el ensayo de patogenicidad en plántulas de maíz en 35 cepas de <i>Fusarium</i> spp.	57

ÍNDICE DE ANEXOS

	Página
Anexo 1. Coordenadas de los sitios de origen de los aislamientos de <i>Fusarium</i> spp. en el municipio de Culiacán y Guasave, Sinaloa.	66
Anexo 2. Comparaciones múltiples por pares mediante la prueba de Dunn, para el ensayo de patogenicidad en placas de Petri.	67
Anexo 3. Comparaciones múltiples por pares mediante la prueba de Dunn, para el ensayo de patogenicidad e índice de severidad (DSI), en plántulas de maíz.	68
Anexo 4. Comparaciones múltiples por pares mediante la prueba de Dunn, para la variable altura en el ensayo de patogenicidad en plántulas de maíz.	69
Anexo 5. Comparaciones múltiples por pares mediante la prueba de Dunn, para la variable biomasa húmeda (g) en el ensayo de patogenicidad en plántulas de maíz.	70
Anexo 6. Comparaciones múltiples por pares mediante la prueba de Dunn, para la variable biomasa seca (g) en el ensayo de patogenicidad en plántulas de maíz.	71
Anexo 7. Comparaciones múltiples por pares mediante la prueba de Dunn, para la variable verdor de la planta (Evaluación 1) en el ensayo de patogenicidad en plántulas de maíz.	72
Anexo 8. Comparaciones múltiples por pares mediante la prueba de Dunn, para la variable verdor de la planta (Evaluación 2) en el ensayo de patogenicidad en plántulas de maíz.	73
Anexo 9. Comparaciones múltiples por pares mediante la prueba de Dunn, para la variable verdor de la planta	74

	(Evaluación 3) en el ensayo de patogenicidad en plántulas de maíz.	
Anexo 10.	Comparaciones múltiples por pares mediante la prueba de Dunn, para la variable verdor de la planta (Evaluación 4) en el ensayo de patogenicidad en plántulas de maíz.	75
Anexo 11.	Comparaciones múltiples por pares mediante la prueba de Dunn, para la variable verdor de la planta (Evaluación 5) en el ensayo de patogenicidad en plántulas de maíz.	76

RESUMEN

La fusariosis del maíz es una enfermedad causada por especies del género *Fusarium*, la cual ocasiona pérdidas tanto en la calidad como en el rendimiento del grano en las zonas productoras de maíz del mundo. El objetivo del presente trabajo fue caracterizar mediante técnicas morfológicas y moleculares las especies de *Fusarium* causantes de la fusariosis del maíz en el estado de Sinaloa, así como evaluar el potencial patogénico de dichas especies. Se llevó a cabo un muestreo de plantas de maíz con síntomas de fusariosis en 10 campos agrícolas de Culiacán y Guasave, obteniendo un total de 600 muestras de plantas de maíz con síntomas de la enfermedad. Se obtuvieron 35 cultivos monospóricos de *Fusarium* spp. Se realizó la identificación morfológica, así como la identificación molecular de los aislamientos monospóricos mediante la secuenciación del gen TEF-1 α , utilizando los primers EF-1 y EF-2, determinando la identidad de *F. proliferatum*, *F. verticillioides*, *F. falciforme*, *F. solani* y *F. nygamai*. La especie *F. proliferatum* fue la que se observó con mayor frecuencia. *F. verticillioides* fue la segunda especie más frecuente en el estudio, donde se obtuvieron tres aislamientos a partir de semillas de maíz infectadas, mientras que las especies *F. nygamai*, *F. solani* y *F. falciforme*, solo se obtuvo un aislamiento por cada especie y se obtuvieron a partir de tallos infectados de maíz. En el presente trabajo se reporta por vez primera a *F. falciforme* provocando la fusariosis en el maíz en México. Así mismo, el análisis filogenético de las secuencias obtenidas en el presente estudio confirmó que cada especie esta constituida por un linaje filogenético distinto. Así mismo, se observó variación genética en los árboles filogenéticos. Se observó en los ensayos de patogenicidad la capacidad de las especies identificadas en el estudio, de provocar diferentes grados de severidad en la germinación de la semilla de maíz, severidad en planta, altura, biomasa húmeda, biomasa seca y contenido de clorofila en las plántulas de maíz. La especie más virulenta, con base en los resultados obtenidos fue *F. proliferatum*, la cual tiene una preferencia por la infección de tallos y semillas de maíz.

ABSTRACT

Fusarium wilt is a disease caused by species of the genus *Fusarium*, which causes losses in the quality and in the yield of the grain in the maize producing areas of the world. The objective of the present work was to characterize, by morphological and molecular techniques, the *Fusarium* species that cause the *Fusarium* wilt in maize in the state of Sinaloa, as well evaluate the pathogenic potential of these species. A sampling of maize plants with symptoms of *Fusarium* wilt was carried out in 10 maize commercial fields of Culiacán and Guasave, obtaining a total of 600 samples of maize plants with symptoms of the disease. 35 monosporic isolates were obtained. Morphological identification was carried out, as well as the molecular identification of the monosporic isolates by sequencing the TEF-1 α gene, using primers EF-1 and EF-2, determining the identity of *F. proliferatum*, *F. verticillioides*, *F. falciforme*, *F. solani* and *F. nygamai*. The species *F. proliferatum* was the one that was observed more frequently. *F. verticillioides* was the second most frequent species in the study, where three isolates were obtained from infected maize seeds, while the *F. nygamai*, *F. solani* and *F. falciforme* species were isolated only by each species and were obtained from infected maize stems. In the present work, *F. falciforme* is reported for the first time causing fusariosis in maize in Mexico. Likewise, the phylogenetic analysis of the sequences obtained in the present study confirmed that each species is constituted by a distinct phylogenetic lineage. Likewise, genetic variation was observed in the phylogenetic trees. The ability of the species identified in the study to cause different degrees of severity in the germination of maize seed, plant severity, height, wet biomass, dry biomass and chlorophyll content in the seedlings was observed in the pathogenicity tests. The most virulent species, based on the results obtained was *F. proliferatum*, which prefers the infection of stems and corn seeds.

I. INTRODUCCIÓN

En los países desarrollados, la mayor parte de la producción de maíz se destina para la alimentación animal y producción industrial de distintos alimentos para humanos (Farnham *et al.*, 2003). México es uno de los mayores productores de maíz a nivel mundial, en el año 2018 se sembraron aproximadamente 7 345 786 ha, las cuales produjeron 8 403 931 t de maíz. A nivel nacional, el principal estado productor es Sinaloa, donde en 2018 se produjeron 5 607 256 t. Los municipios con mayor producción de maíz en el estado fueron: Ahome con 1 574 645 t; Culiacán con 1 564 712 t; y Guasave con 1 236 991 t, en donde casi la totalidad de sus tierras son de riego (SIAP, 2018).

La producción y calidad del grano es amenazada por una enfermedad conocida como fusariosis. Esta es provocada por especies patógenas del género *Fusarium*, que pueden causar marchitez en todos los estadios de la planta y, consecuentemente, la producción de micotoxinas en el grano, lo que representa un riesgo a la salud pública al poder consumir maíz contaminado con estos compuestos (Figuroa-Rivera *et al.*, 2010; Aguín *et al.*, 2014).

Existe una variación genética y de potencial patogénico entre especies de *Fusarium*, que se desarrollan en hábitats bajo diferentes condiciones climáticas (Bai y Shaner, 1996; Miedaner *et al.*, 2000). Este hecho es corroborado por estudios realizados en México, por ejemplo, en un trabajo realizado en el estado de Guanajuato se reportaron las especies *F. subglutinans*, *F. verticillioides*, *F. heterosporum*, *F. equiseti*, *F. proliferatum* y *F. reticulatum*, las cuáles presentaron variación en su patogenicidad (Figuroa-Rivera *et al.*, 2010). También, en un estudio realizado en la zona norte del estado de Sinaloa, se detectó la presencia de cuatro especies de *Fusarium*: *F. verticilloides*, *F. nygamai*, *F. andiyazi* y *F. thapsinum*, donde todas las especies presentaron niveles diferentes en la expresión de su potencial patogénico (Leyva-Madrigal *et al.*, 2015).

El monitoreo constante del agente causal de la fusariosis en maíz es necesario ya que esta enfermedad disminuye la calidad y el rendimiento del grano, pudiendo llegar a ocasionar hasta un 30 % de pérdida de la producción (García-Gutiérrez *et al.*, 2012). Por lo cual, es necesario realizar una identificación precisa de las especies de *Fusarium* causantes de la fusariosis del maíz en el estado de Sinaloa, así como evaluar su patogenicidad y su relación filogenética. Lo anterior para generar conocimiento que sirva para diseñar estrategias sostenibles de control.

II. JUSTIFICACIÓN

En México, el maíz es un cultivo de importancia económica, cultural y alimentaria, sin embargo, la fusariosis ocasionada por especies de *Fusarium* es un problema para el éxito de su producción por los daños que ocasiona en el tallo y granos de maíz, donde se reportan pérdidas de hasta el 30 % en el rendimiento (García-Gutiérrez *et al.*, 2012).

La fusariosis en maíz puede ser un problema de salud pública si se consumen granos contaminados con toxinas producidas por *Fusarium* spp., a las cuales se les atribuyen la causa de diferentes enfermedades, como la leucoencefalomalacia en equinos, edema pulmonar en porcinos y distintos tipos de cánceres en humanos.

Uno de los mayores inconvenientes para la aplicación de estrategias de control adecuadas de tales patógenos es que se desconoce su identidad específica, debido a su complejidad morfológica. Por esta razón, la necesidad de realizar un estudio de distribución, caracterización morfológica, identificación molecular y análisis de patogenicidad de las poblaciones de *Fusarium* spp. causantes de la fusariosis de maíz de la zona centro-norte del estado de Sinaloa. Con ello se podrán plantear alternativas de control sostenibles sobre el agente causal.

III. HIPÓTESIS

Diferentes especies de *Fusarium* son las causantes de la fusariosis en el maíz en el estado de Sinaloa, las cuales presentan diferencias en su potencial patogénico.

IV. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Identificar las especies de *Fusarium* causantes de la fusariosis en maíz en el estado de Sinaloa, así como evaluar el potencial patogénico de dichas especies.

4.2. Objetivos específicos

1. Identificar las especies de *Fusarium* causantes de la fusariosis del maíz en el estado de Sinaloa mediante técnicas morfológicas y moleculares.
2. Evaluar el potencial patogénico de las especies de *Fusarium* encontradas en maíz en el estado de Sinaloa.
3. Determinar la frecuencia en la distribución de las especies de *Fusarium* encontradas en maíz en el estado de Sinaloa.
4. Realizar un análisis filogenético de las especies de *Fusarium* causantes de la fusariosis en maíz en el estado de Sinaloa.

V. REVISIÓN DE LITERATURA

5.1. El maíz en México

En México, el maíz es la especie de interés agronómico que posee la mayor diversidad genética (CONABIO, 2006), con un número de alrededor de 65 razas de las 220 especies existentes en América Latina. Gracias a esta riqueza se ha promovido el desarrollo de variedades resistentes a diversos patógenos que atacan los cultivos de maíz, llevando a cabo selección artificial y cruzamiento de las variedades que poseen las características deseadas (Serratos *et al.*, 2009).

5.1.1. Importancia del maíz en México

México es uno de los mayores productores de maíz a nivel mundial, en el año 2018 se destinaron 7 345 786 ha, con una producción de 8 403 931 t de maíz, que, en su mayor parte son para la alimentación humana en diferentes presentaciones, tales como la tortilla y aceites; también es utilizada en la alimentación de animales de engorda (SIAP, 2018).

5.1.2. Importancia del cultivo de maíz en Sinaloa

Sinaloa es el mayor estado productor de maíz a nivel nacional, con una producción de 5 607 256 t. Los municipios con mayor producción de maíz en el estado son Ahome con 1 574 645 t, Culiacán con 1 564 712 t y Guasave, con una producción de 1 236 991 t (Cuadro 1), en donde casi la totalidad de sus tierras son de riego (SIAP, 2018).

Cuadro 1. Principales municipios productores de maíz en el estado de Sinaloa.

Municipio	Superficie sembrada (ha)	Producción obtenida (t)
Ahome	130 538	1 574 645
Culiacán	151 593	1 564 712
Guasave	111 688	1 236 991
Elota	55 052	606 357
Salvador Alvarado	59 745	604 974

Fuente: SIAP, 2018.

5.2. Características botánicas de la planta de maíz

El tallo del maíz posee entrenudos, el cual es muy recto con pocas ramificaciones; hojas que surgen en los entrenudos, que le brindan protección a las yemas foliares; raíces primarias y adventicias fibrosas que tienen la función de sostener a la planta; inflorescencia masculina, también conocida como panoja. La panoja está compuesta por un eje central, que es una prolongación del tallo, del cual surgen espigas laterales y una principal en la parte superior, las cuales a su vez alojan a otras espiguillas que poseen un par de flores, donde están los estambres, los cuales producen los gametos masculinos conocidos como polen; inflorescencia femenina, está compuesta por un eje central, grueso y cilíndrico, llamado olote. Está rodeada por brácteas, las cuales se conocen comúnmente como hojas. Al conjunto conformado por la inflorescencia femenina y las brácteas, da como resultado a la estructura conocida como mazorca. En la parte superior de la mazorca pueden observarse un conjunto de vellos finos y delgados, a los cuales se le conoce coloquialmente como pelos de elote, los cuales son los estilos de la planta, los cuales al ser penetrados por el polen que las panojas diseminan en el aire, se lleva a cabo la fecundación (Kato *et al.*, 2009).

5.3. Clasificación taxonómica del maíz

De acuerdo a Acosta (2009) la clasificación taxonómica del maíz se encuentra ordenada de la siguiente manera:

Familia: Poaceae

Subfamilia: Panicoideae

Tribu: Maydeae

Género: Zea

Especie: *Zea mays*

5.4. Etapas del cultivo de maíz

5.4.1. Germinación

Cuando la semilla empieza a absorber el agua ocurren los cambios para activar al embrión, con lo cual la primera raíz se alarga y sale en 2 o 3 días. Seguido se forman las hojas y la de raíces seminales que permiten a la planta su anclaje al suelo, las cuales también permitirán la absorción de agua y nutrientes. Una vez emergida la planta entra en contacto con la luz se despliega un par de hojas verdaderas, y con el paso de los días emergen nuevas hojas. La planta estará bien arraigada hasta 15 o 18 días después de su siembra, y tendrá una cantidad de 5 a 6 hojas desplegadas (Lesur, 2005).

5.4.2. Crecimiento vegetativo

Durante las siguientes 4-5 semanas después de la germinación se desarrollarán todas las hojas del maíz adulto en la base del tallo. Después empezará la fase de formación de espiga y mazorca. En esta etapa se desarrolla el sistema de raíces definitivas desde la corona hasta hundirse en el suelo, donde empezarán a ramificarse y absorber nutrientes para la nutrición de la planta joven; en esta etapa las raíces seminales pierden importancia (Lesur, 2005).

Una vez que la planta alcanza medio metro de altura, empieza una etapa de crecimiento veloz por lo que exigirá una mayor cantidad de nutrientes por parte de las raíces, las cuales estarán distribuidas en la mayor cantidad de suelo posible. A solo 10 días de la formación de la primera espiga, se empezará a notar el desarrollo de una diminuta mazorca en el ápice de una ramificación lateral, sobre el sexto nudo por debajo de la espiga (Lesur, 2005).

La liberación del polen y alargamiento de los estilos se efectúa de 5 a 6 semanas después de la iniciación de la formación de espiga, coincidiendo con las temperaturas más óptimas para el crecimiento de la planta. Días antes de la liberación del polen, los entrenudos se alargan y empujan la espiga fuera del conjunto de hojas que la envuelven para que se expanda por completo. A partir

del aparecimiento de la espiga y la mazorca, empieza la etapa de floración del maíz (Lesur, 2005).

5.4.3. Floración

En esta etapa la tarea principal de la planta es la producción de granos. La liberación del polen y alargamiento de los estilos se efectúa cuando las hojas y los tallos han alcanzado su tamaño final. La principal función de la espiga es la producción de granos de polen para fecundar estilos o cabellos del elote. Una espiga de tamaño normal puede alcanzar a producir una cantidad de 5 millones de granos de polen. Los granos de polen están situados dentro de las anteras, las cuales, al abrirse, liberan su polen al viento, que lo pueden transportar a distancias muy largas como cortas (Lesur, 2005).

La mazorca tiene la capacidad de producir un grano al ser polinizada en el momento adecuado. Una mazorca bien formada posee alrededor de 600 a 1000 óvulos dispuestos en hileras alrededor de la mazorca. Los primeros estilos salen 2 o 3 días después de iniciada la liberación del polen, cuando los granos de polen en los estilos estos fecundan la flor femenina para producir un grano de maíz (Lesur, 2005).

5.4.4. Fructificación

Después de que las flores femeninas son fecundadas, los estilos se marchitan obteniendo una coloración castaña, y en las siguientes semanas se dará el desarrollo de los granos, hasta alcanzar su longitud y diámetro definitivo (Lesur, 2005).

5.5. Condiciones edafoclimáticas favorables para el desarrollo del maíz

5.5.1. Temperatura

El maíz requiere una temperatura de entre 24.4 a 35.6 °C, siendo una media de 32 °C la ideal para lograr una óptima producción. La temperatura debe estar entre

los 15 a 27 °C para que se produzca la germinación en la semilla. En el período de fructificación la planta requiere temperaturas de 20 a 32 °C (Cruz, 2013).

5.5.2. Tipo de suelo y pH del suelo

El maíz se desarrolla mejor en suelos profundos y fértiles, con una textura franca, porque le permite a las raíces tener una mejor absorción de agua y nutrientes, así como un mejor anclaje al sustrato (Lesur, 2005). El pH óptimo para el desarrollo de este cultivo es de 6 a 7 (Cruz, 2013).

5.5.3. Humedad del suelo

En el caso de los maíces de temporal la cantidad mínima de lluvia que se requiere es de 300 mm anuales, mientras que el nivel óptimo de precipitación está entre 500 y 600 mm y la máxima es de 1000 mm. Las variedades precoces necesitan cantidades menores de agua para su desarrollo, debido a esto debe de elegirse correctamente la variedad de semilla a sembrar con respecto a la cantidad de agua disponible en la zona (Lesur, 2005).

5.6. Enfermedades ocasionadas por patógenos en el cultivo de maíz

Diferentes enfermedades ocasionadas por patógenos pueden limitar el éxito de producción del cultivo de maíz, como lo es la mancha café (peca) ocasionada por *Physoderma maydis*, la roya común ocasionada por *Puccinia sorghi*, las cuales ocasionan problemas en el follaje de la planta, mientras que el tallo se puede ver infectado por *Pythium* spp. y *Stenocarpella* spp., provocando la pudrición del tallo. Así mismo, *Ustilago maydis*, es un patógeno ampliamente observado en sembradíos de maíz, provocando una infección sobre la mazorca, creciendo entre los granos y desarrollando su cuerpo fructífero, este hongo en algunos estados sureños de México como Oaxaca, Chiapas y Guerrero, se le clasifica como un manjar culinario, mientras que en el Norte y Noroeste del país se le considera como una plaga que ocasiona fuertes pérdidas en cuanto a la producción del maíz. En cuanto a las especies del género *Fusarium*, estas tienen la capacidad de ocasionar daño tanto en la raíz, como en el tallo y los granos, lo que representa un

problema grave para la producción de maíz en las zonas maiceras del mundo (CIMMYT, 2004).

5.7. Estudios previos y distribución geográfica de las distintas especies de *Fusarium* causando la fusariosis en maíz

Se ha informado sobre una gran cantidad de especies diferentes de *Fusarium* como agentes causales de infección en los cultivos de maíz alrededor del mundo, afectando el rendimiento de su producción y calidad.

Entre estas especies se encuentran *Fusarium sacchari*, que ha sido aislado con éxito de cultivos de maíz en Asia (Desjardins, 2006). Otra especie reportada en el continente Asiático es *F. asiaticum*, un patógeno que tiene cierta preferencia por el arroz, aunque ya ha sido reportada como causante de la fusariosis en maíz, precisamente en Japón (Kawakami *et al.*, 2015). En Irán, se realizó un estudio donde se determinó a *F. verticillioides*, *F. proliferatum* y *F. oxysporum* como las especies causantes de la pudrición de la mazorca (Rahjoo *et al.*, 2008), en un estudio realizado en Filipinas por Magculia *et al.* (2011) encontró a *F. verticillioides*, *F. proliferatum* y *F. subglutinans*, infectando los cultivos de maíz. En un estudio reciente llevado a cabo por Zainudin *et al.* (2017), determinó la presencia de *F. verticillioides* y *F. proliferatum*, causando la pudrición de la raíz en el maíz en Malasia.

En Europa se han estudiado a profundidad los casos de fusariosis en los cultivos de maíz causando la pudrición de distintos tipos órganos de la planta como *F. verticillioides* en Italia, agente infeccioso responsable de la pudrición de la mazorca del maíz (Covarelli *et al.*, 2012), así como *F. cortaderiae*, también indicado como un agente causal menor en la pudrición de la mazorca del maíz en Francia (Boutigny *et al.*, 2014), en tanto, la especie más abundante en los campos de maíz causando la pudrición de la mazorca, en Polonia, fue *F. poae* (Lenart *et al.*, 2013).

Por otra parte, los estudios previos realizados en América, indican una alta diversidad de especies de *Fusarium* como responsables de la fusariosis en el maíz. Por ejemplo, Broders *et al.* (2007), en su estudio realizado en E.U.A. determinó que una gran cantidad de especies infectan semillas de maíz, entre las cuales se encuentran *F. graminearum*, *F. oxysporum* y *F. equiseti*.

Estudios realizados en México, muestran de igual manera una amplia gama de especies causando la fusariosis en el maíz, Figueroa-Rivera *et al.* (2010) determinaron a *F. verticillioides*, *F. subglutinans*, *F. heterosporum* y *F. proliferatum*, como las causantes de la pudrición del tallo en el maíz; Morales-Rodríguez *et al.* (2007) encontraron la presencia de *F. chlamydosporum*, *F. napiforme*, *F. pseudonygamai* y *F. solani*. Los estudios locales, aunque escasos hasta la fecha, lograron identificar parte de la diversidad de las especies de *Fusarium* que están presentes en el estado de Sinaloa, así como el realizado por Leyva-Madrigal *et al.* (2015), donde *F. verticillioides* fue la especie más frecuente al ser aislada de semillas de maíz, y donde *F. nygamai*, se obtuvo de raíces de plantas de maíz enfermas.

5.8. Historia y antecedentes del género *Fusarium*

Link (1809) fue el primero en plantear el concepto genérico de *Fusarium*, tomando como punto de partida la presencia de conidios, con su peculiar forma de canoa o banana. Durante los siguientes 100 años existió una gran confusión en torno a la clasificación de las especies de *Fusarium*, ya que se pensaba que una especie individual de hongo era específica para cada hospedero, identificando cada cepa como una especie diferente, lo que llevó a la clasificación de alrededor de casi 1000 especies para el inicio del siglo XX (Leslie y Summerell, 2006; Summerell *et al.*, 2001).

Wollenweber y Reinking (1935) reformularon los criterios para el concepto de especie dentro del género y establecieron las pautas para la identificación correcta de las cepas, con base en las características morfológicas de cada cepa. A través de un sistema de subgénero dividieron el género *Fusarium* en 16 secciones, 65

especies y 77 variedades, añadiendo formas sub específicas. Este trabajo se considera como el punto de partida para los sistemas taxonómicos modernos de *Fusarium* (Munkvold, 2017).

Snyder y Hansen (1941; 1945), mediante el uso de cultivos monospóricos redujeron el número de especies del género a 9 y afirmaron que sólo bajo este método se podían realizar identificaciones confiables. Las nueve especies reconocidas por Snyder y Hansen fueron: *F. oxysporum*, *F. solani*, *F. moniliforme*, *F. roseum*, *F. lateritium*, *F. tricinctum*, *F. nivale*, *F. rigidiuscula* y *F. episphaeria*. El método propuesto por Snyder y Hansen, se hizo muy famoso entre los estudiosos del área, ya que brindaba claves de identificación muy fáciles de aplicar y cada especie se podía identificar rápidamente (Leslie y Summerell, 2006; Summerell *et al.*, 2001).

En trabajos posteriores, Gordon (1952) realizó una combinación, tomando aspectos del sistema de clasificación de Wollenweber y Reinking (1935) con algunos de los componentes del sistema de Snyder y Hansen. En su sistema Gordon, reconoce un total de 26 especies dentro del género *Fusarium* (Leslie y Summerell, 2006; Summerell *et al.*, 2001).

Años más tarde, utilizando como guía los conceptos de Wollenweber y Reinking, Booth (1971) publicó su trabajo titulado “The Genus *Fusarium*”, en donde se reconocieron 44 especies. La investigación iniciada en “Die Fusarien” por Wollenweber y Reinking (1935), fue retomada por Gerlach y Nirenberg (1982), llevándolos a publicar el trabajo titulado “The Genus *Fusarium*: A pictorial atlas”, en dicho trabajo se reconocieron más de 90 especies y variedades (Leslie y Summerell, 2006; Summerell *et al.*, 2001).

Nelson *et al.* (1983) elaboraron un manual de identificación para *Fusarium* spp., el cual aportó valiosa información sobre técnicas de aislamiento y métodos de cultivo; también contiene fotografías a color de las coloraciones en las cual se

torna el hongo en su medio de cultivo y una serie de micrografías de una amplia variedad de especies (Leslie y Summerell, 2006; Summerell *et al.*, 2001).

Leslie y Summerell (2006), realizaron la única publicación de *Fusarium* spp. que toma en cuenta los criterios morfológicos, biológicas y filogenéticos para su clasificación, en el libro “The *Fusarium* Laboratory Manual”. En su obra Leslie y Summerell, reconocen 70 especies dentro del género *Fusarium*; además incluyeron información sobre los sistemas taxonómicos existentes, así como información sobre la patogenicidad y la toxicidad de las diferentes especies contenidas en su obra (Leslie y Summerell, 2006; Summerell *et al.*, 2001).

5.9. Clasificación Taxonómica del género *Fusarium*

De acuerdo con Leslie y Summerell (2006), la clasificación de *Fusarium* se encuentra ubicada de la siguiente manera:

División: Ascomycota

Subdivisión: Pezizomycotina

Clase: Sordariomycetes

Subclase: Hypocreomycetidae

Orden: Hypocreales

Familia: Nectriaceae

Género: *Fusarium*

Especies: *F. verticillioides*, *F. subglutinans*, *F. proliferatum*, *F. temperatum*, *F. pseudograminearum*, *F. boothii*, *F. acuminatum*, *F. circinatum*, *F. culmorum*, *F. avenaceum*, *F. fujikuroi*, *F. oxysporum*, *F. solani*.

5.10. Efectos de los hongos sobre plantas hospederas

5.10.1. Efecto sobre la fotosíntesis en la planta

La fotosíntesis es el proceso mediante el cual las plantas transforman energía luminosa emitida por el sol en energía química, esta última es la responsable de que la planta realice de forma adecuada sus actividades celulares. En el proceso de la fotosíntesis la planta captura el dióxido de carbono disponible en la atmósfera, y el agua que es absorbida mediante las raíces son translocadas hacia los cloroplastos los cuales se encuentran en las partes verdes de la planta, una vez allí los cloroplastos captan energía luminosa y como resultado generan glucosa y liberan oxígeno a la atmósfera. Por lo tanto, si llegase a ocurrir una alteración en sus orgánulos fotosintéticos, por la infección de un patógeno en la planta, se generaría una disminución en la producción de carbohidratos y en la liberación de oxígeno, y empezaría la primera etapa de la enfermedad. Algunos de los síntomas más comunes generados por los patógenos son la clorosis y la necrosis en las hojas, los cuales disminuyen la superficie fotosintética de las plantas (Agrios, 2011).

5.10.2. Efecto sobre la translocación del agua y nutrientes en la planta

La absorción del agua y los nutrientes inorgánicos del suelo, se realiza a través de su sistema radicular. Estos son transportados hacia los órganos que se encuentran en la parte superior de la planta a través de los conductos xilemáticos que se encuentran en el tallo. El agua y los minerales inorgánicos son utilizados por las células de las hojas y otros órganos para producir sustancias vitales para el funcionamiento de la planta. Las sustancias orgánicas producidas en la fotosíntesis son traslocadas de manera descendente hacia los demás órganos de la planta. Por consiguiente, el bloqueo del movimiento de las sustancias por los conductos xilemáticos, debido a la infestación o acumulación de estructuras de los patógenos, ya sea de manera ascendente o descendente provocará la enfermedad en la planta por deficiencia (Agrios, 2011).

5.10.3. Efecto en la respiración de la planta

Se le conoce como respiración al proceso en el cual las células de las plantas por medio de la oxidación de ácidos grasos y carbohidratos, liberan energía para que sea utilizada en procesos celulares. Las plantas utilizan esta energía para la realización de todas las funciones celulares, ya sea la acumulación y translocación de compuestos, síntesis de proteínas, activación de enzimas y el crecimiento de la planta. La tasa respiratoria de la planta, suele aumentar cuando sufre la infección de algún patógeno, provocando que los tejidos infectados utilicen con mayor rapidez sus reservas de carbohidratos, en comparación de los tejidos sanos. El aumento de la respiración se debe al consumo mayoritario de energía disponible, la cual produce la energía necesaria para que la planta realice sus funciones de una manera acelerada, lo que puede traducirse como el resultado del aumento de su metabolismo (Agrios, 2011).

5.11. Factores abióticos que afectan el desarrollo de los hongos

Los factores del medio ambiente que marcan el inicio e influyen en el desarrollo de las enfermedades en las plantas son la temperatura, humedad, la luz, los nutrientes y el pH del suelo. Los efectos que estos ejercen sobre las enfermedades de las plantas son el resultado del grado de influencia que tienen estos sobre su desarrollo, como la propagación, actividad del patógeno o sobre la interacción que se presenta entre el patógeno y el hospedante (Agrios, 2011).

5.11.1. Factor Temperatura

Para lograr su desarrollo y efectuar sus actividades, tanto el patógeno como la planta necesitan de una temperatura adecuada. Gracias a las temperaturas bajas que se presentan en las temporadas de otoño, invierno y primavera, es casi seguro que los patógenos prevalezcan inertes y los que hayan logrado provocar alguna infección se verán interrumpidos. No obstante, una vez la temperatura aumente y otras condiciones favorables se sumen, los patógenos podrán volver a su actividad e infectar plantas y provocar enfermedades. Tal factor es una limitante a su vez, ya que esto obliga a los patógenos a establecerse en ciertas

áreas limitadas y a estaciones, donde la temperatura prevalezca favorable para su desarrollo (Agrios, 2011).

En diversos ensayos se ha encontrado que la temperatura óptima para llevar a cabo la germinación de especies de *Fusarium* comunes en la planta de maíz ocurre entre los 25 °C a 37 °C, mientras que su crecimiento lo realiza entre los 20 °C a 35 °C (Marín *et al.*, 1995).

5.11.2. Factor Humedad

El efecto más importante de la humedad hacia los hongos, se centra en su germinación y la penetración del tubo germinativo en el hospedante. Cuando la humedad se presenta en forma de lluvia y en flujos de agua, esta tiene un importante papel en la distribución y diseminación de este patógeno y otros más, ya sea sobre el mismo cultivo o de un cultivo a otro. También la humedad aumenta la susceptibilidad de las plantas hospederas, al proveerse del agua necesaria para tener un buen desarrollo y translocación de nutrientes, lo que da como resultado un aumento en la succulencia de las plantas hospederas, que para los patógenos son mucho más atractivas (Agrios, 2011).

El desarrollo de los hongos comienza cuando la humedad relativa alcanza el 65 % y se manifiesta primero en granos o semillas muertas o con poca vitalidad o bien también suele desarrollarse primero en granos vivos y con vitalidad, pero que estos tengan daños o aberturas en su cubierta. Los hongos del género *Fusarium* tienen la capacidad de provocar infecciones tanto en campo como en almacén, el rango de humedad relativa donde su desarrollo es óptimo es de 65 a 90 % y la humedad del grano es de 24 a 25 % (Deras, 2014).

5.12. Identificación morfológica y caracterización molecular de *Fusarium* spp.

Tradicionalmente la identificación de las especies del género *Fusarium* se había basado en las características morfológicas, como la coloración y desarrollo de micelio, a nivel macroscópico y mientras que para nivel microscópico, se observa

la disposición de fiálides, tamaño y forma de sus macroconidios, así como de sus microconidios. Estas caracterizaciones se realizan en diferentes medios de cultivo, dependiendo qué estructura de *Fusarium* spp. se pretenda observar ya sea a simple vista o en el microscopio. Para caracterizar la coloración y desarrollo del micelio aéreo, se utiliza el medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA). En tanto que, para realizar la caracterización de fiálides, macroconidios y microconidias, se realiza en medio de cultivo agar de hoja de clavel (CLA, por sus siglas en inglés) y también existe el medio Cloruro potásico, en el cual también se pueden observar bien definidas las estructuras microscópicas de las especies del género *Fusarium* spp. Pero no basta con realizar la identificación morfológica, ya que la gran similitud entre sus estructuras morfológicas, tanto macro como microscópicas, resulta un problema para realizar una determinación certera y precisa, de la especie. Para esto, se utilizan métodos complementarios como las técnicas de biología molecular, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés).

5.13. Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction, PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa es una reacción enzimática *in vitro* que amplifica millones de veces una secuencia específica de ADN durante varios ciclos repetidos en los que la secuencia blanco es copiada fielmente. Para ello, la reacción aprovecha la actividad de la enzima ADN polimerasa que tiene la capacidad de sintetizar naturalmente el ADN en las células. Los elementos importantes en la reacción son el templado o molde (ADN), la enzima, los oligonucleótidos o primers, los desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs: adenina, timina, citosina y guanina), el ión magnesio (Mg^{+}), una solución amortiguadora o buffer y H_2O . Todos estos elementos interactúan en tres etapas principales de las que se compone la PCR: desnaturalización, anileamiento y extensión (Tamay de Dios, 2013).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), es un proceso donde se generan copias de fragmentos específicos de ADN, imitando los

mecanismos por los cuales la célula realiza la replicación del ADN durante la división celular (Watson *et al.*, 1992).

El proceso de la reacción en cadena de la polimerasa se divide en las etapas siguientes (Delidow, 1993):

1. Desnaturalización del ADN en dos cadenas simples por fusión a temperatura elevada (1 min. 90 – 95 °C).
2. Anileamiento de dos oligonucleótidos (iniciadores) en las cadenas originales para la síntesis de una nueva cadena disminuyendo la temperatura a (45 s 40 - 60°C), estos iniciadores contienen comunmente entre 10 y 30 bases de ADN.
3. Extensión de la nueva cadena a partir de los iniciadores, añadiendo nucleótidos libres en forma de desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs) con una temperatura elevada a (2 min. 70 – 75 °C) en la cual se incorporan aproximadamente 100 nucleótidos por segundo, utilizando ADN polimerasa como catalizador cuya temperatura óptima oscila alrededor de los 72 °C e iones Mg^{2+} como cofactor.

Este ciclo se repite 25-35 veces en una reacción de PCR típica, que generalmente tarda 2-4 horas, según la longitud de la región de ADN que se copia.

5.14. Electroforesis

La electroforesis es una técnica de biología molecular que se utiliza para separar fragmentos de ADN dependiendo el tamaño de estos. En esta técnica se utilizan geles de agarosa donde se deposita el ADN y se lleva a cabo su separación, dependiendo del tamaño del fragmento. Esta separación se realiza generando un campo eléctrico en el gel de agarosa, en donde los fragmentos de ADN al poseer carga neta negativa migran hacia el ánodo, de manera inversa a su tamaño a causa de la fricción generada por el medio de gel agarosa. El medio de gel agarosa es el más utilizado en esta técnica, ya que permite la migración y separación de la moléculas de ADN de una manera rápida y precisa (Vera, 2013). La visualización del avance y la amplificación de las bandas de ADN en el medio

de gel agarosa, se debe a la aplicación de Gel Red, una tinción que al absorber radiación UV emite una coloración brillante.

5.15. Región del gen factor de elongación de la traducción 1 alfa (TEF-1 α)

El gen del factor de elongación de la transcripción-1 α (TEF-1 α , por sus siglas en inglés), es gen más utilizado para la identificación de especies pertenecientes al género *Fusarium*. Para lograr la amplificación de regiones específicas de dicho gen, se utilizan los primers específicos EF-1 y EF-2 (O'Donnell *et al.*, 1998). Estos primers amplifican una región del gen TEF-1 α , en la cual se localizan tres intrones que representan más de la mitad del amplicón. Esta región es amplificable para todas las especies del género *Fusarium*, en las cuales se obtiene un amplicón de aproximadamente 700 pares de base (bp).

Las características de este gen como su especificidad por el género *Fusarium*, alto grado de polimorfismo en secuencias para especies muy relacionadas y un tamaño superior de intrones en comparación con otras proteínas como calmodulina, β -tubulina e histoneladasa H3, han convertido al gen TEF-1 α , en el predilecto para realizar trabajos de identificación molecular de *Fusarium* (Kristensen, 2005).

5.16. Secuenciación de ADN

La secuenciación de ADN es el proceso que determina la secuencia de bases de los nucleótidos (A, T, C o G) de un fragmento de ADN amplificado, mediante el uso de una enzima; la ADN polimerasa, cuya actividad principal es la de crear una cadena de ADN polimerizando nucleótidos en uno de sus extremos (Starr y Taggart, 2006).

5.17. Análisis filogenético

La teoría de la evolución indica que todas las especies provienen de un ancestro común, además indica que la información genética de una especie se transmite de una generación a otra paulatinamente, permitiendo así que los individuos de una misma especie no sean idénticos. Estas variaciones están condicionadas por

diversos mecanismos evolutivos (aislamiento reproductivo, selección natural y competencia, migración genética). Dichos cambios con el paso del tiempo se acumulan y se fijan, lo cual permite la diferenciación de las especies, este proceso da origen a nuevas poblaciones. (Starr y Taggart, 2006). Para conocer qué tan diferentes entre sí son las especies de una misma población así como para comparar dos poblaciones), es necesario realizar un análisis filogenético. Por lo tanto, se puede definir que un análisis filogenético es una representación gráfica, en la cual se definen los principales clados (grupo de individuos que comparten un ancestro en común) y la similitud genética de los individuos con base en la comparación de la información molecular (secuencias de genes específicos) mediante metodologías matemáticas (Nayaka *et al.* 2011).

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Marco de muestreo

Se realizó un muestreo dirigido en predios con cultivos de maíz en los municipios de Culiacán (Figura 1) y Guasave (Figura 2) del estado de Sinaloa, tal muestreo fue dirigido a las plantas que presentaban síntomas evidentes de fusariosis, tomando como muestra mazorca, tallo y raíz.

Las muestras se tomaron durante los ciclos agrícolas Otoño-Invierno 2017/2018. Estas se llevaron al laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Agronomía, donde fueron procesadas. Todos los puntos de muestreo fueron georreferenciados mediante un GPS (Garmin eTrex Legend).



Figura 1.- Sitios de origen de los aislamientos de *Fusarium* spp. en el municipio de Culiacán, Sinaloa.



Figura 2.- Sitios de origen de los aislamientos de *Fusarium* spp. en el municipio de Guasave, Sinaloa.

6.2. Esterilización de materiales y medio de cultivo

La esterilización de los materiales y medios de cultivo se realizó en autoclave a una temperatura de 121 °C durante 15 minutos (Leslie y Summerell, 2006).

6.3. Aislamiento y purificación de *Fusarium* spp. a partir de material vegetal infectado

Para el aislamiento de los hongos se implementó el método propuesto por Wang y Jeffers (2000), donde se realizaron cortes transversales a los tejidos vegetales infectados de las plantas de maíz y fueron desinfectados mediante lavados con alcohol al 90 %, seguido de un lavado con hipoclorito de sodio al 2 % y un último

lavado con agua destilada estéril, después del tercer lavado, los tejidos se colocaron sobre un papel absorbente para retirar los excesos de humedad. Una vez secos, los tejidos desinfectados se colocaron en medio de cultivo PDA. El medio de cultivo PDA se preparó agregando 39 g de Papa Dextrosa Agar (PDA) en un litro de agua destilada y se esterilizó en autoclave. Posteriormente, una vez realizada la esterilización y antes de solidificar el medio, a este se le agregó 750 mg de pentacloronitrobencono (PCNB) y 300 mg de sulfato de estreptomicina.

Para el desarrollo del hongo, las placas fueron colocadas en una incubadora a temperatura de 25 °C durante por 7 días (Figura 3).



Figura 3. Cortes transversales de tejidos vegetales infectados de las plantas de maíz colocados en medio de cultivo PDA.

6.4. Obtención de cultivos monospóricos

Los cultivos monospóricos se obtuvieron por el método planteado por Hansen y Smith (1932), para lo cual se colocó un disco de micelio (8 mm) en crecimiento activo en un tubo Eppendorf de 1.5 ml con 1 ml de agua destilada estéril y se agitaron en vortex durante 1 minuto, a partir de la cual se realizaron diluciones seriadas hasta la 10^{-6} . Se tomaron 20 μ l de la dilución 10^{-6} y se vertieron en una placa de Petri con medio de cultivo de PDA (Hansen y Smith, 1932). Una vez

germinadas las esporas, se identificó una espora individual y se tomó solo una con un asa y se transfirió a una nueva placa de Petri con medio de cultivo PDA, en donde se desarrolló el cultivo monospórico (Figura 4).

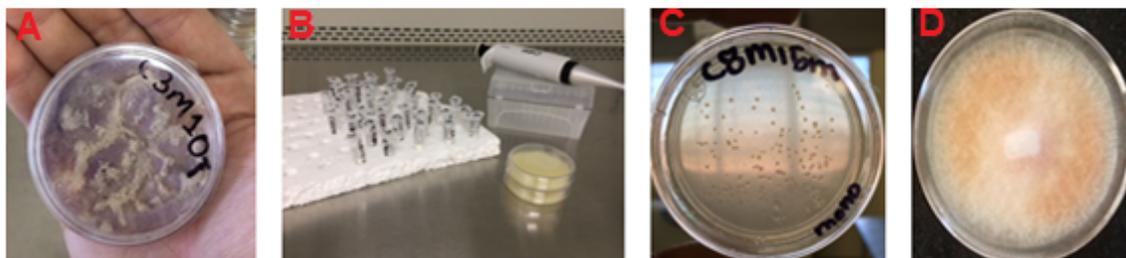


Figura 4. Obtención de cultivos monospóricos. A: Hongo desarrollado a partir del aislamiento del órgano de la planta infectada; B: Diluciones seriadas a partir de la extracción del disco de micelio colocado en el tubo Eppendorf; C: Esporas individuales germinadas en medio de cultivo PDA; D: Cultivo monospórico de *Fusarium* spp. en medio de cultivo PDA.

6.5. Caracterización morfológica

La caracterización morfológica se realizó de acuerdo con los criterios descritos por Leslie y Summerell (2006). Los aislamientos se cultivaron en medio PDA a 25 ° C en oscuridad durante 6 días. El color de la colonia y la formación de micelio aéreo se observaron después de 14 días de crecimiento en PDA incubado a 20 ° C. En medio de cultivo agar con hojas de clavel (CLA, por sus siglas en inglés), en las mismas condiciones mencionadas anteriormente, se observaron y midieron las macroconidias y microconidias, la disposición de las células conidiógenas y la presencia o ausencia de clamidosporas. Se realizó con ayuda de microscopio óptico (Figura 5).

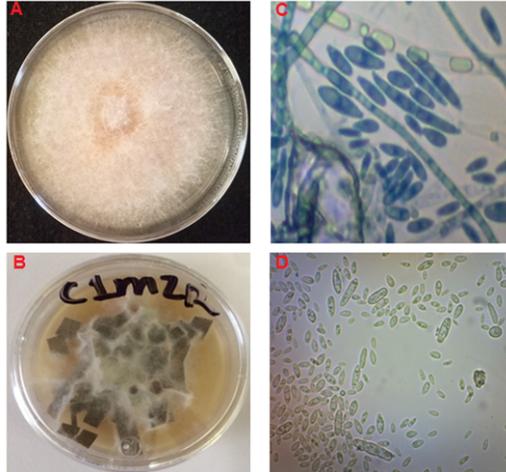


Figura 5. Identificación morfológica de *Fusarium* spp. A: Características culturales de *Fusarium* spp. en medio de cultivo PDA (Coloración y crecimiento de micelio); B: Medio de cultivo agar con hojas de clavel (CLA, por sus siglas en inglés), donde se las estructuras morfológicas se desarrollan con mayor uniformidad; C: Macroconidias de *Fusarium* spp; D: Microconidias de *Fusarium* spp.

6.6. Extracción de ADN

El micelio de cada aislado se recogió raspando la superficie de las colonias en crecimiento en medio PDA (previamente incubado durante 1 semana a 25 °C) (Figura 6). Después de moler el micelio de cada aislamiento en nitrógeno líquido, se extrajo el ADN genómico según el método descrito por Howland (1996). Se tomó 0.1 gr del triturado y se colocó en un tubo eppendorf de 2 ml, agregando a cada tubo 1 ml de buffer de extracción (CTAB, Tris, EDTA, NaCl), una vez mezcladas se homogeneizaron las muestras y se centrifugaron por 15 minutos a 14 000 r.p.m. La fase acuosa obtenida después de la centrifugación se transfirió a otro tubo y se agregó 1 ml de Cloroformo-Isoamílico (49:1), se centrifugó nuevamente durante 10 minutos a 14 000 r.p.m. De nueva cuenta se transfiere la fase acuosa a un nuevo tubo y se agrega V/V de acetato de sodio 3M y V/V de isopropanol absoluto frío, y se deja reposar cada muestra durante un periodo de 12 horas.



Figura 6. Trituración del micelio en los aislamientos de *Fusarium* spp. para su posterior extracción de ADN. A: Raspado del micelio en los aislamientos de *Fusarium* spp.; B: Rompimiento de células de los aislamientos de *Fusarium* spp. con la ayuda de nitrógeno líquido.

Después de tiempo del reposo de 12 horas se volvieron a centrifugar las muestras por 15 minutos a 14,000 r.p.m. y se desechó el contenido líquido, dejando en el tubo una pastilla a la cual se le agregó 1 ml de etanol 70%, después de esto se realizó el último proceso de centrifugación durante un tiempo de 5 minutos a 14 000 r.p.m., seguido de la centrifugación se retiró el etanol y se dejaron secar los tubos cada uno con una pastilla de ADN, una vez secos los tubos eppendorf con sus pastillas de ADN se les agregó 50 μ l de solución TE para conservar el ADN. La concentración y la calidad del ADN se estimaron utilizando un espectrofotómetro Thermo Scientific NanoDrop TM 1000 (Fisher Scientific). Las muestras de ADN fueron conservadas a -20 °C hasta su utilización.

6.7. Amplificación por PCR

El ADN extraído de los aislados de *Fusarium* se analizó mediante PCR con los primers enumerados en el Cuadro 2. La mezcla de reacción final (25 μ l) contenía 100 ng de ADN, una mezcla equimolar de dNTPs, 25 mM MgCl₂, buffer de PCR, 1U de Taq ADN polimerasa y 40 pmoles de cada oligonucleótido EF1 y EF2

(O'Donnell *et al.*, 1998). Las secuencias de los primers y las condiciones de PCR utilizadas se proporcionan en el Cuadro 2.

Los productos PCR fueron purificados y secuenciados por la empresa Macrogen Inc., en Corea del Sur.

Cuadro 2. Condiciones de temperatura de alineamiento y secuencias de primers utilizados para el análisis de PCR de *Fusarium* spp.

Primer	Secuencia (5' 3')	Temperatura de alineamiento (°C)	Tamaño del amplicón (bp)
D: EF1	ATGGGTAAGGA(A/G)GACAAGAC	53	700
R: EF2	GGA(G/A)GTACCAGT(G/C)ATCATGTT		

D: Directo; R: Reverso

6.8. Análisis filogenético

Las secuencias EF-1 α se alinearon con las secuencias de referencia de *Fusarium* obtenidas de GenBank utilizando la alineación múltiple en ClustalW con el software Geneious R9, y se infirieron relaciones filogenéticas con base en la alineación de secuencias de nucleótidos del gen entre los aislados de *Fusarium*. Los árboles se construyeron mediante el método Neighbor-Joining en función de las distancias determinadas por el método de Jukes y Cantor utilizando 1000 réplicas de arranque.

La identificación de los aislamientos fue confirmada vía Blast en las bases de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information), Fusarium ID y Fusarium MLST.

6.9. Pruebas de patogenicidad en semillas de maíz

Las semillas de maíz utilizadas en las pruebas fueron desinfectadas con alcohol al 90 %, un segundo lavado con hipoclorito de sodio al 3 % y un tercer lavado con agua destilada estéril. Se realizaron las placas de Petri para evaluar la patogenicidad en semillas de maíz de acuerdo al método propuesto por Broders *et al.* (2007), para lo cual se colocaron 10 semillas de maíz en cada placa de Petri con medio de cultivo PDA, sembrados con anterioridad los inóculos de *Fusarium*

spp., cada placa de Petri se incubó nuevamente durante siete días a una temperatura de 22 °C (Figura 7).



Figura 7. Placas de Petri para la evaluación de la patogenicidad en las semillas de maíz.

Para la evaluación de la capacidad de inhibición de germinación de las cepas de *Fusarium* spp. en semillas de maíz, se utilizó una escala de 1 al 10, donde se evaluó cada placa de Petri dependiendo la cantidad de semillas germinadas. Se utilizó un diseño completamente al azar, para 35 tratamientos y un control, utilizando 3 repeticiones y el experimento se realizó 2 veces, siendo la placa de Petri la unidad experimental.

6.10. Pruebas de patogenicidad en plántulas de maíz

Las semillas que se utilizaron para la prueba de patogenicidad en plántulas fueron del híbrido utilizado en la región “Dekalb 4050”, las cuales se desinfectaron con un triple lavado, una vez secas, fueron sembradas en charolas de germinación con arena y turba (50:50, V/V) a 22 °C, durante 16 horas de fotoperiodo. Para el desarrollo de las plántulas en el ensayo, se utilizaron charolas de germinación con 128 cavidades, donde fueron destinadas 5 cavidades para cada cepa de *Fusarium* spp. y cinco plantas no inoculadas como controles negativos (Figura 8).



Figura 8. Charolas donde se llevó a cabo la germinación y ensayo de patogenicidad de *Fusarium* spp. en plántulas de maíz.

Después de 4 días, antes de que la segunda hoja de la plántula se expandiera por completo, se llevó a cabo la inoculación de acuerdo a Simpson *et al.* (2000), con modificaciones. Las plántulas de maíz se inocularon con 5 ml de solución conidial (Figura 9). El inóculo se obtuvo a partir del crecimiento de cada cepa de *Fusarium* spp. en medios de cultivo PDA durante dos semanas a 20 °C. Una vez alcanzado un desarrollo de micelio, se procedió a moler cada cepa de *Fusarium* spp. desarrollada con ayuda de un triturador, agregando 250 ml de agua destilada estéril. La concentración de la solución conidial se ajustó a 10^{-6} conidios mL^{-1} .



Figura 9. Inoculación de plántulas de maíz con solución fúngica de *Fusarium* spp.

A los 70 días de la germinación de las plantas, se llevó a cabo la evaluación de los síntomas visibles de la enfermedad, utilizando una escala de severidad propuesta por Marlatt *et al.* (1996) con modificaciones: 0 = Raíces sin síntomas; 1 = ≤ 10 % de síntomas en raíces; 2 = ≥ 10 % de síntomas en raíces, observándose ligeros síntomas de necrosis; 3 = ≥ 50 % de síntomas observados; 4 = raíces totalmente infectadas. Estos datos fueron convertidos a índice de severidad utilizando la fórmula:

$$DSI = \sum [P \times Q / M \times N] \times 100$$

Dónde: P = punto de severidad; Q = número de plantas infectadas con alguna escala; M = total de número de plantas observadas; N = máxima clasificación en el número de la escala. Para la realización del experimento se utilizó un diseño completamente al azar, con 5 repeticiones por cepa (tratamiento), realizando 3 veces el experimento, se utilizó la plántula como unidad experimental.

También se midió el contenido de clorofila en plantas con un SPAD 502 (Spectrum Technologies, Inc.); altura de planta (cm) desde la base del tallo hasta la parte más alta de la planta; peso de la biomasa húmeda (g); y peso de la biomasa seca (g) de las plantas deshidratadas en estufa a 80 °C por 24 horas.

6.11. Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron con el software XLSTAT para Excel (Addinsoft, 2018). Se realizó un análisis no paramétrico a partir de los datos obtenidos en los dos ensayos de patogenicidad, llevando a cabo la prueba de Kruskal-Wallis y una comparación de medias por la Prueba de Dunn, ya que los datos no cumplieron con los supuestos de distribución normal y homogeneidad de varianzas de Bartlett, aun después de ser sometidos a una transformación de raíz cuadrada. Se calculó la correlación entre la severidad en el ensayo de patogenicidad en plántulas de maíz y las variables: altura, peso fresco, peso seco y verdor de las plántulas de maíz, utilizando la Prueba de correlación de Spearman. El valor de α máximo para aceptar diferencia estadística fue de 0.05 (Daniel, 2002).

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. Distribución de cultivos monospóricos obtenidos

Del muestreo realizado en 20 localidades distribuidas entre los municipios de Culiacán y Guasave, Sinaloa, se lograron recolectar 600 muestras de tejidos infectados de maíz por *Fusarium* spp., de diferentes órganos de la planta como mazorca, tallo y raíz. A partir de las cuales se obtuvieron 35 aislamientos monospóricos, como se muestra en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Cantidad de aislamientos monospóricos de *Fusarium* spp. obtenidos a partir de las muestras colectadas en cultivos de maíz en los municipios de Culiacán y Guasave en el estado de Sinaloa.

Municipio	Órgano vegetal		
	Mazorca	Tallo	Raíz
Culiacán	5	12	0
Guasave	11	7	0
Total	16	19	0

7.2. Caracterización morfológica

La caracterización morfológica de los 35 aislamientos monospóricos (Cuadro 4) obtenidos en este estudio se realizó con base en los criterios propuestos por Leslie y Summerell (2006). Se identificaron 29 aislamientos como *F. proliferatum*, un aislamiento como *F. falciforme*, un aislamiento *F. solani*, un aislamiento de *F. nygamai* y tres como *F. verticillioides*.

En cuanto a los 29 aislamientos de *F. proliferatum*, 13 de ellos fueron obtenidos de granos de maíz, 16 obtenidos de tallo, mientras que de la raíz no se obtuvo ninguno. Los aislamientos de *F. proliferatum* en medio de cultivo PDA presentaron abundante micelio aéreo de coloración blanca, que cambió a rosáceo con la edad del cultivo, esto coincidió en todos los aislamientos de *F. proliferatum*. Con un

desarrollo de 10 días en medio de cultivo CLA, las macroconidias en los aislamientos fueron muy abundantes, delgadas y finas con una variante de 4-5 septas, las cuales midieron 54.52-9.91 x 26.7 μm (n=50); microconidias fueron piriformes, sin septas y midieron de 9.31-10.23 x 5.48-6.47 μm (n=50), y la presencia de clamidosporas no fue observada (Figura 10).

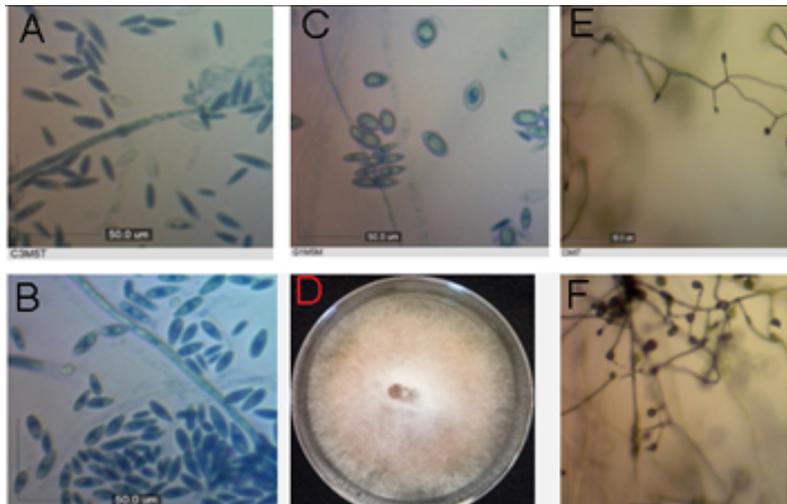


Figura 10. *Fusarium proliferatum*. A-B: Macroconidias producidas en medio de cultivo PDA; C: Microconidias producidas en micelio aéreo en medio de cultivo PDA; D: Cultivo monospórico de *F. proliferatum* en medio de cultivo PDA; E-F: Microconidias *in situ* en medio de cultivo CLA. A-C, E-F escala= 50 μm .

F. proliferatum fue la especie con mayor cantidad de aislamientos obtenidos a partir de tallos de maíz. Por otra parte, otros investigadores reportan a *F. subglutinans* y FGSC, como las especies con mayor frecuencia identificadas en sus estudios a partir de tallos de maíz (Hao *et al.*, 2017; Figueroa-Rivera *et al.*, 2010). Así mismo, otros autores reportan a *F. poae*, *F. napiforme* y *F. verticillioides*, como las especies con mayor frecuencia aisladas de mazorcas (Morales-Rodríguez *et al.*, 2007; Rahjoo *et al.*, 2008; Lenart *et al.*, 2013).

En cuanto a *F. solani* (Figura 11), este se obtuvo a partir de tallo de maíz, sin encontrar aislamientos a partir de granos o de la raíz de la planta de maíz. Por otra parte, Morales-Rodríguez *et al.* (2007), en su estudio encontró mayormente a *F. solani* entre sus aislamientos obtenidos de granos de maíz. *F. solani* en medio PDA presentó micelio aéreo blanco que se tornó a crema. En el medio CLA, las

macroconidias fueron robustas, alargadas, con célula basal y apical bien distinguidas por su forma cilíndrica, de cinco a siete septas, con una longitud de 50.46-51.13 x 9.18-9.33 μm (n=50); las microconidias presentaron una forma ovalada elipsoide y sus septas van desde cero a dos, y tuvieron una medida de 10.51-51 x 5.66-7.32 μm (n=50), también se observaron falsas cabezas de microconidias. No se observó la presencia de clamidosporas.

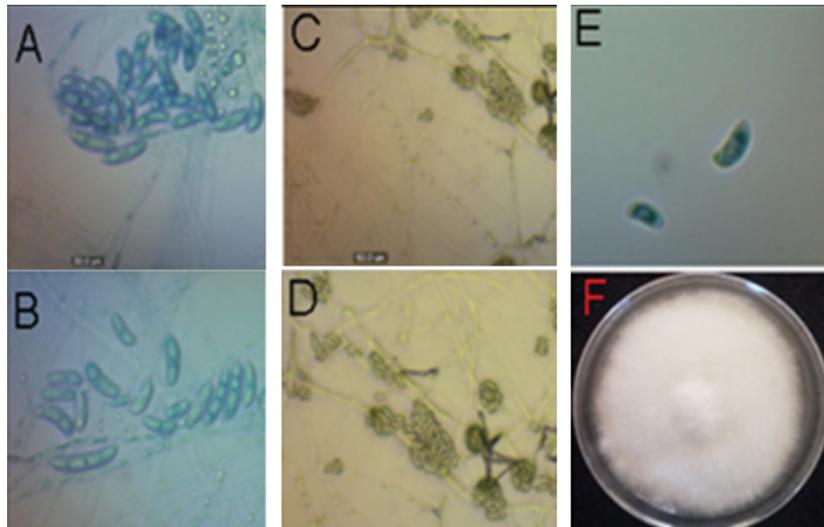


Figura 11. *Fusarium solani*. A-B: Macroconidios en medio de cultivo PDA; C-D: Microconidios *in situ* en medio de cultivo CLA; E: Microconidios en medio de cultivo PDA; F: Cultivo monospórico de *Fusarium solani* en medio de cultivo PDA. A-E escala= 50 μm .

Se obtuvo también un aislamiento de *F. falciforme* (Figura 12), el cual fue obtenido de tallo de maíz infectado y de igual manera que *F. solani*, no se obtuvieron cultivos a partir de semillas y raíz de maíz. *F. falciforme* forma parte del Complejo de Especies de *Fusarium solani* (FSSC, por sus siglas en inglés), al igual que *F. solani*, comparten características morfológicas similares (Figura 4). El aislamiento de *F. falciforme* a los 10 días de edad en medio CLA, presentó macroconidias que fueron falciformes, hialinas, con 4-5 septas y midieron 41.64-55.66 x 6.54-8.05 μm (n = 50); los microconidios fueron hialinos, unicelulares, oblongos, de cero a dos septas, y midieron de 9.6 a 14.9 x 4.0 a 6.3 μm (n = 50), y se presentaron en cabezas falsas que midieron 7.8-16.9 x 2.1-4.8 μm (n = 50); no se observó la presencia de clamidosporas.

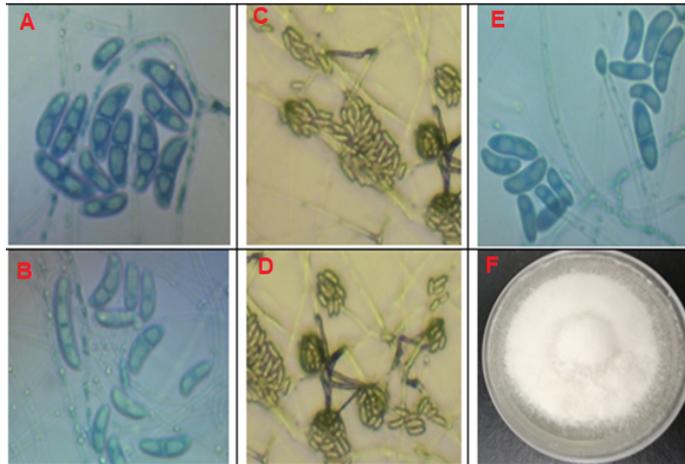


Figura 12. *Fusarium falciforme*. A-B: Macroconidios en medio de cultivo PDA; C-D: Microconidios *in situ* en medio de cultivo CLA; E: Microconidios en medio de cultivo PDA; F: Cultivo monospórico de *Fusarium falciforme* en medio de cultivo PDA. A-E escala= 50 μ m.

En cuanto a los aislamientos de *Fusarium verticillioides* (Figura 13), el micelio aéreo fue blanco en los cultivos jóvenes, el cual se tornó en una coloración violeta, esto fue similar para los tres aislamientos de *F. verticillioides* en medio de cultivo PDA. En el medio de cultivo CLA, las macroconidias no fueron abundantes, aun así formaron esporodoquios. Las macroconidias fueron delgadas, rectas y falcadas, con tres a cinco septas, y una medida de 20.87-26.17 x 6.78-5.43 μ m (n=50); las microconidias fueron ovaladas y no presentaron septas con una longitud de 5.70-2.11 x 5.75-1.87 μ m (n=50), también se observaron microconidias formando estructuras de cadenas largas y no se observó presencia de clamidosporas

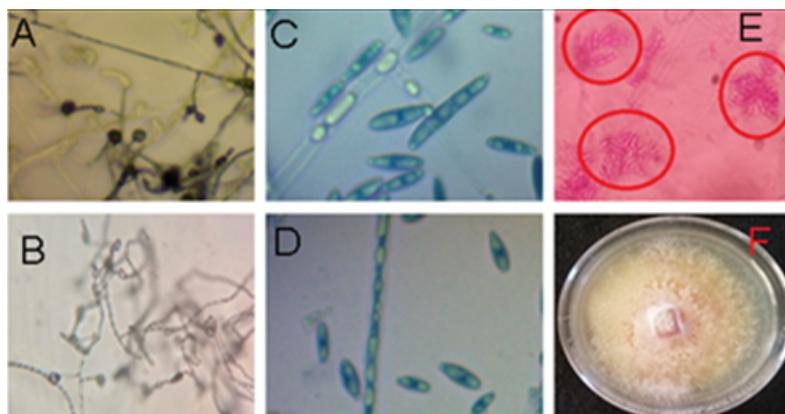


Figura 13. *Fusarium verticillioides*. A-B: Cadenas de microconidios *in situ* en medio de cultivo PDA; C: Macroconidios *in situ* en medio de cultivo PDA; D: Microconidias *in situ* en medio de cultivo PDA; E: Esporodoquios de macroconidias en medio de cultivo PDA; F: Cultivo monospórico de *F. verticillioides* en medio de cultivo PDA. A-E escala= 50 μ m.

Un aislamiento fue identificado como *Fusarium nygamai* (Figura 14), y fue obtenido del tallo de una planta infectada. El aislamiento en medio de cultivo PDA presentó un abundante crecimiento de micelio aéreo, el cual fue algodonoso y de coloración blanca y se tornó a un violeta pálido con el paso de los días. Mientras el desarrollo del aislamiento en medio de cultivo CLA, presentó macroconidias hialinas ligeramente curvas y alargadas, con 3 septas, célula apical y basal apuntadas, con una medida de 30.11-35.28 x 33.41-35.10 μm (n=50); las microconidias tuvieron una morfología ovalada elíptica sin septas con una longitud de 14.72-15.51 x 3.66-4.01 μm (n=50), y no se observó presencia de clamidosporas.

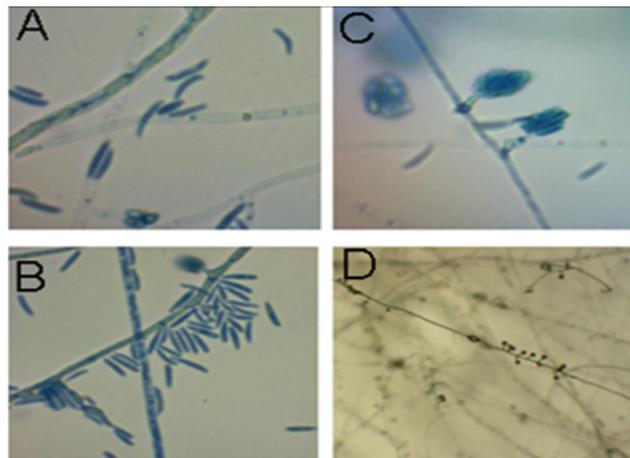


Figura 14. *Fusarium nygamai*. A-B: Macroconidias en medio de cultivo PDA; C-D: Microconidias *in situ* en medio de cultivo PDA. A-D escala= 50 μm .

El lugar de origen de los aislamientos de *Fusarium* obtenidos en el presente estudio se indican en el Cuadro 4. De total de aislamientos (n=35), el 82.85 % fue *F. proliferatum*, el 8.57 % fue *F. verticillioides*, 2.85 % *F. solani*, 2.85 % *F. falciforme* y el 2.85 % *F. nygamai*.

La temperatura juega un papel importante en la distribución de las plantas, por ende también lo es para la distribución de las especies de *Fusarium* que las afectan (Woodward, 1988). En el cultivo del maíz, el factor precipitación juega un

papel de suma importancia influyendo en la competencia y por lo tanto, en el predominio de especies particulares de *Fusarium*, según Vigier *et al.* (1997).

Los cambios en el medio ambiente ejercidos por la combinación de estos factores pueden influir en el crecimiento, reproducción y supervivencia del patógeno, aumentando la tasa de desarrollo y el rango geográfico de enfermedades ocasionadas (Jeger y Pautasso, 2008).

Los muestreos realizados en el presente estudio fueron durante el mes de mayo del 2018, donde los dos municipios presentaron el mismo clima y las mismas características ambientales, con una temperatura máxima de 34 °C y una mínima de 18 °C, menos del 2 % de probabilidad de lluvia y una energía solar de entre 7-8 kWh, las cuales parecen favorecer al desarrollo de la especie de *F. proliferatum*.

Zainuddin *et al.* (2017), en un estudio similar de caracterización de especies de *Fusarium* en Malasia, determinó la presencia de las especies de *F. verticillioides*, *F. proliferatum* y *F. solani* como las responsables de provocar la fusariosis en los cultivos de maíz. Malasia cuenta con un clima tropical y condiciones ambientales muy similares a los puntos de muestreo del presente estudio, sin embargo, Malasia tiene una mayor precipitación anual, 2 873 mm, mucho mayor a el municipio de Culiacán, donde apenas se alcanzó una precipitación anual en el 2017 de 527.4 mm (UAS, 2018).

Por lo tanto, se asume que la predominancia de la especie *F. proliferatum*, es posiblemente a su mejor adaptación en lugares más secos, en comparación, con la especie predominante en el territorio de Malasia, *F. verticillioides*, la que al parecer prefiere lugares mucho más húmedos lo cual es sustentado por diversos trabajos, por ejemplo: Magculia *et al.*, 2011, en Filipinas, donde la precipitación media anual llega a los 2 233 mm; Rahjoo *et al.*, 2008, llevado a cabo en Irán, donde la precipitación media es de 1 011 mm, en todos estos trabajos la especie predominante fue *F. verticillioides*.

Cuadro 4. Origen de las especies de *Fusarium* identificadas morfológicamente en muestras de maíz en Culiacán y Guasave, Sinaloa.

CLAVE	ESPECIE	TEJIDO	LOCALIDAD
C1M19T	<i>F. proliferatum</i>	TALLO	El Trébol
C3M5T	<i>F. proliferatum</i>	TALLO	El Torito
C4M20T	<i>F. falciforme</i>	TALLO	Salida Norte
C4M4M	<i>F. proliferatum</i>	MAZORCA	Salida Norte
C4M8T	<i>F. proliferatum</i>	TALLO	Salida Norte
C6M10T	<i>F. proliferatum</i>	TALLO	El Quemadito
C7M6M	<i>F. proliferatum</i>	MAZORCA	Desv. Villa Juárez
C7M2T	<i>F. proliferatum</i>	TALLO	Desv. Villa Juárez
C7M18T	<i>F. proliferatum</i>	TALLO	Desv. Villa Juárez
C7M4T	<i>F. proliferatum</i>	TALLO	Desv. Villa Juárez
C8M16T	<i>F. proliferatum</i>	TALLO	CAFELI
C8M8T	<i>F. proliferatum</i>	TALLO	CAFELI
C10M18T	<i>F. proliferatum</i>	TALLO	Luxemburgo
C10M15T	<i>F. proliferatum</i>	TALLO	Luxemburgo
C10M19M	<i>F. verticillioides</i>	MAZORCA	Luxemburgo
C10M8M	<i>F. proliferatum</i>	MAZORCA	Luxemburgo
C10M10M	<i>F. proliferatum</i>	MAZORCA	Luxemburgo
G1M7M	<i>F. verticillioides</i>	MAZORCA	Lázaro Cárdenas
G1M5M	<i>F. proliferatum</i>	MAZORCA	Lázaro Cárdenas
G2M8M	<i>F. verticillioides</i>	MAZORCA	Lázaro Cárdenas 2
G3M9T	<i>F. proliferatum</i>	TALLO	Solidaridad
G3M7T	<i>F. proliferatum</i>	TALLO	Solidaridad
G4M1M	<i>F. proliferatum</i>	MAZORCA	Tres De Mayo
G4M3M	<i>F. proliferatum</i>	MAZORCA	Tres De Mayo
G5M8T	<i>F. solani</i>	TALLO	Tamazula
G5M5T	<i>F. proliferatum</i>	TALLO	Tamazula
G5M9M	<i>F. proliferatum</i>	MAZORCA	Tamazula
G6M6M	<i>F. proliferatum</i>	MAZORCA	Las Cañadas No.1
G6M10M	<i>F. proliferatum</i>	MAZORCA	Las Cañadas No.1
G6M5M	<i>F. proliferatum</i>	MAZORCA	Las Cañadas No.1
G6M2T	<i>F. proliferatum</i>	TALLO	Las Cañadas No.1
G6M10T	<i>F. proliferatum</i>	TALLO	Las Cañadas No.1
G7M4M	<i>F. proliferatum</i>	MAZORCA	El Cubilete
G7M7M	<i>F. proliferatum</i>	MAZORCA	El Cubilete
G8M2T	<i>F. nygamai</i>	TALLO	San Pedro

7.3. Identificación molecular y análisis filogenético

El análisis de PCR de los aislamientos de *Fusarium* spp. generó el amplicón esperado de aproximadamente 700 pb para el gen EF-1 α (Fig. 15).

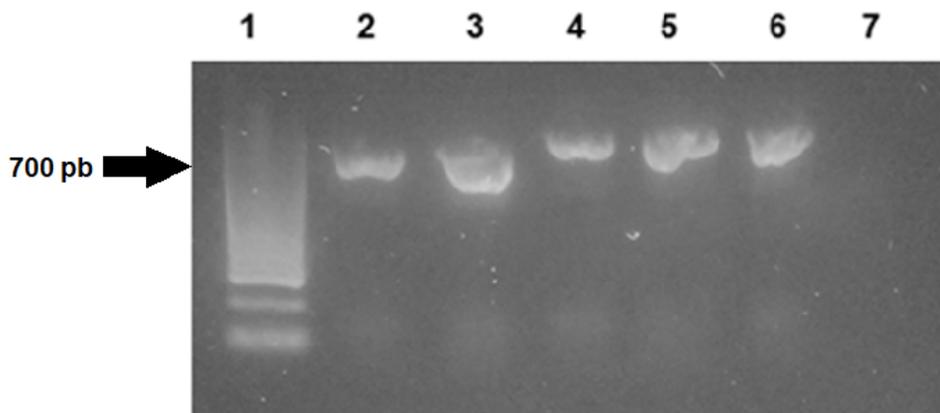


Figura 15. Análisis electroforético de los fragmentos amplificados con los primers EF-1/EF-2 mediante PCR. Línea 1: Marcador de peso molecular 100 bp; Línea 2: aislamiento C4M20T; Línea 3: aislamiento G8M2T; Línea 4: C10M19M; Línea 5: G1M7M; Línea 6: G2M8M; Línea 7: Control negativo.

Se secuenciaron cinco cepas representativas, las secuencias fueron depositadas en GenBank bajo los números de accesión MK887198-MK887202 (Cuadro 5), y se analizaron vía Blast en las bases de datos del *Fusarium* ID y *Fusarium* MLST, lo cual evidenció que el aislamiento C4M20T (MK887202) mostró un 99.88 % de similitud con los aislamientos de *Fusarium falciforme* (FSSC 3+4) NRRL 32547 (DQ247012) y NRRL32709 (DQ247029). Así mismo, el análisis filogenético por el método Neighbor-Joining de las secuencias del gen EF-1 α con las secuencias del aislamiento C4M20T (MK887202) y otras secuencias del Complejo de Especies de *Fusarium Solani*, mostró que la secuencia MK887202 se agrupó con las secuencias de la especie *Fusarium falciforme* (FSSC 3+4) (Fig. 16). Así mismo, los aislamientos C10M19M, G1M7M y G2M8M (MK887200, MK887199 y MK887201) mostraron porcentajes de similitud del 99.19 al 99.51 % con el aislamiento de *F. verticilloides*, CBS119825 (FN552083). El aislamiento G8M2T (MK887198) mostró un 100 % de similitud con el aislamiento CBS140.95 de *F. nygamai* (HM347121).

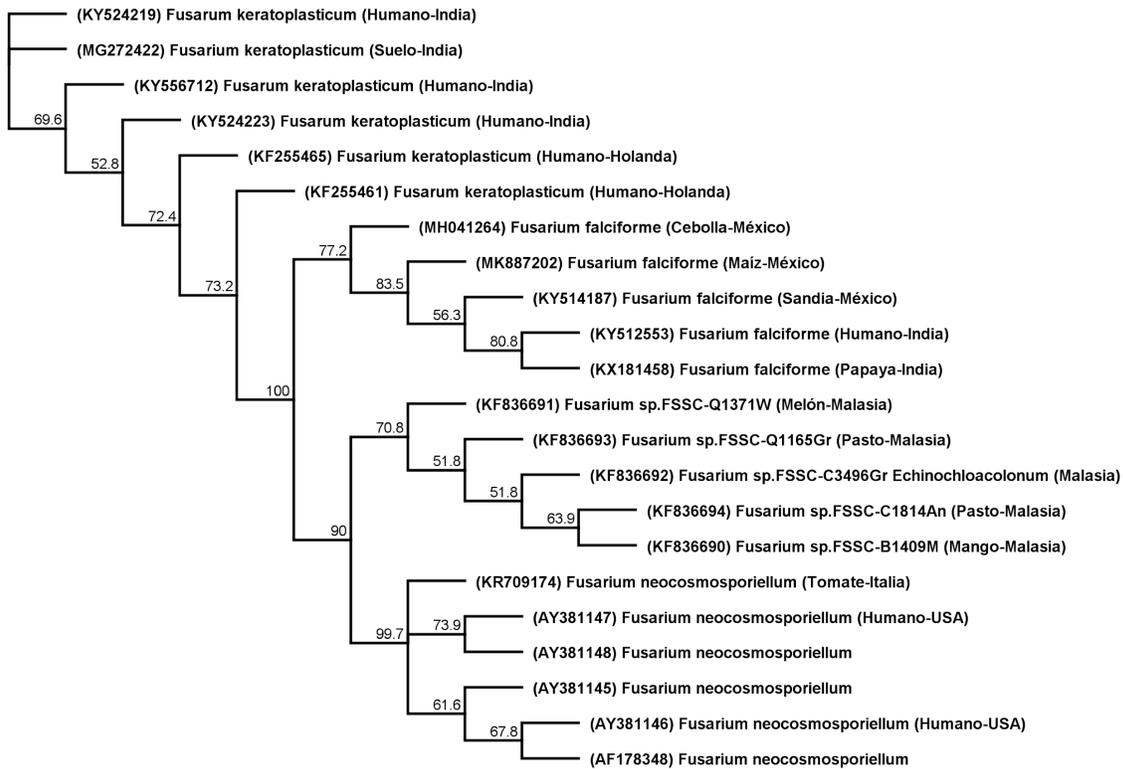


Figura 16. Árbol filogenético construido con base en el método Neighbor-Joining utilizando secuencias EF-1 α de especies del Complejo de Especies de *Fusarium solani*.

El árbol filogenético resultante del análisis por el método Neighbor-Joining de las secuencias del gen EF-1 α (Figura 17) mostró la agrupación de los aislados en 3 clados principales con valores de similitud mostrados en las ramas, alineando cada especie de *Fusarium* en cada clado. El primer clado principal incluye a *Fusarium falciforme*, dentro del cual se incluyen pequeños clados, donde el aislamiento obtenido se agrupa en diferentes subgrupos de esta especie que difiere de origen geográfico y hospedante.

El segundo clado principal está conformado por la especie *Fusarium verticillioides* (Figura 17), donde dos los aislamientos del presente estudio (MK887200 y MK887201) se agrupan en el mismo subclado, al mostrar una alta similitud, sin embargo el aislamiento con número de accesión MK887199 presentó mayor similitud con aislamientos de México y China reportados en otros estudios.

Así mismo, el tercer clado principal estuvo conformado por aislamientos de *Fusarium nygamai* (Figura 17), donde el aislamiento del presente estudio (MK887198) se agrupó junto con aislamientos de *F. nygamai* también originarios de México.

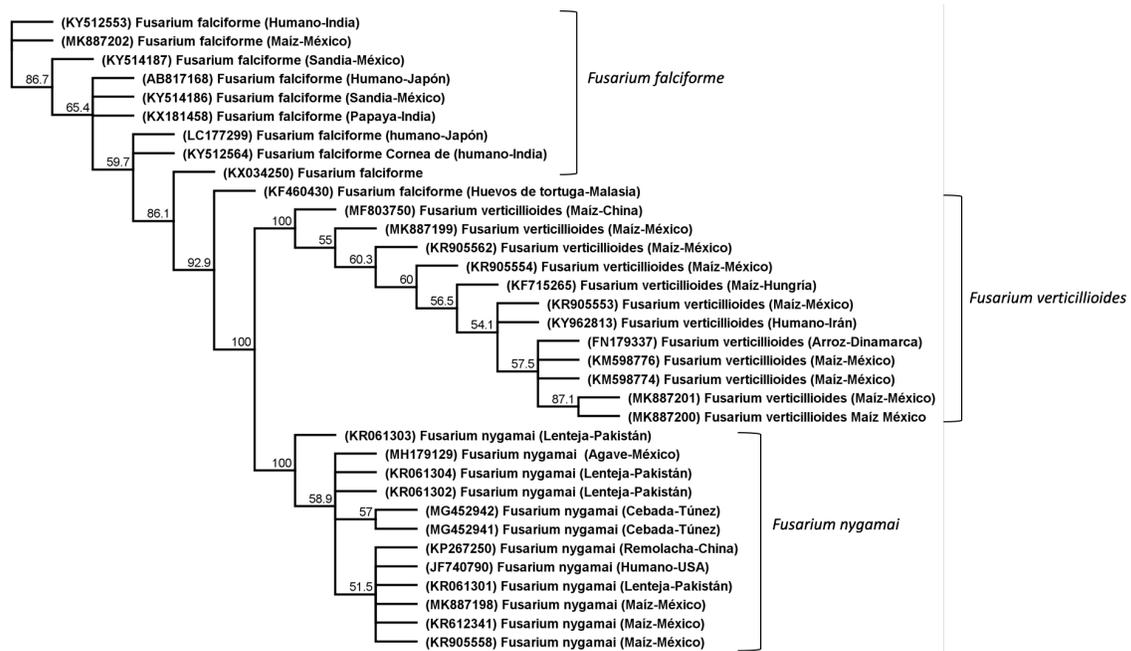


Figura 17. Árbol filogenético construido con base en el método Neighbor-Joining utilizando las secuencias EF-1 α de *Fusarium* spp.

La variabilidad genética entre los aislamientos que se muestra en el árbol filogenético (Fig. 17) puede estar relacionado con los diferentes orígenes geográficos del hospedante del que fueron aislados, ya que de acuerdo con los resultados obtenidos en diversos trabajos de filogenia, señalan que las poblaciones de hongos fitopatógenos que afectan múltiples especies de plantas hospedantes pueden dividirse de acuerdo al origen geográfico. Las diversas variaciones genéticas encontradas de acuerdo a la longitud de las ramas del árbol pueden atribuirse a variaciones de las condiciones climáticas que presentan los sitios de donde proceden los aislamientos, lo que favorece la co-evolución genética independiente del patógeno (Daami-Remadi, 2006).

Cuadro 5. Número de accesión de las secuencias de *Fusarium* spp. obtenidas en el presente estudio.

Especie	Código aislamiento	Hospedante	Origen	Tamaño del fragmento (bp)	No. Accesión GenBank
<i>F. falciforme</i>	C4M20T	Tallo de maíz	Salida Norte	668	MK887202
<i>F. verticillioides</i>	C10M19M	Mazorca de maíz	Luxemburgo	638	MK887200
<i>F. verticillioides</i>	G1M7M	Mazorca de maíz	Lázaro Cárdenas	643	MK887199
<i>F. verticillioides</i>	G2M8M	Mazorca de maíz	Lázaro Cárdenas 2	651	MK887201
<i>F. nygamai</i>	G8M2T	Tallo de maíz	San Pedro	642	MK887198

7.4. Ensayos de patogenicidad

En el presente estudio, se realizaron dos ensayos: 1) patogenicidad de *Fusarium* spp. sobre semilla de maíz, donde se tomó como variable la germinación de semillas de maíz, como medida de virulencia de las cepas de *Fusarium* spp. (Figura 18); 2) ensayo de patogenicidad de *Fusarium* spp. en plántula de maíz, donde se tomaron como variables: daño en raíces de plántulas (Figura 19), altura de plántula de maíz, biomasa húmeda (g) de la plántula de maíz, biomasa seca (g) de la plántula de maíz y contenido de clorofila (cinco evaluaciones).

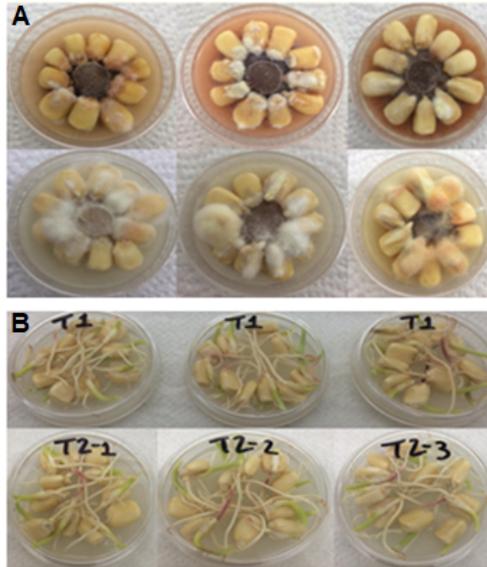


Figura 18. Prueba de patogenicidad de *Fusarium* spp. sobre semilla de maíz. A: Inhibición total de la germinación en las semillas de maíz por el aislamiento C1M19T. B: Placas de Petri con testigos negativos, donde todas la semillas lograron germinar exitosamente.

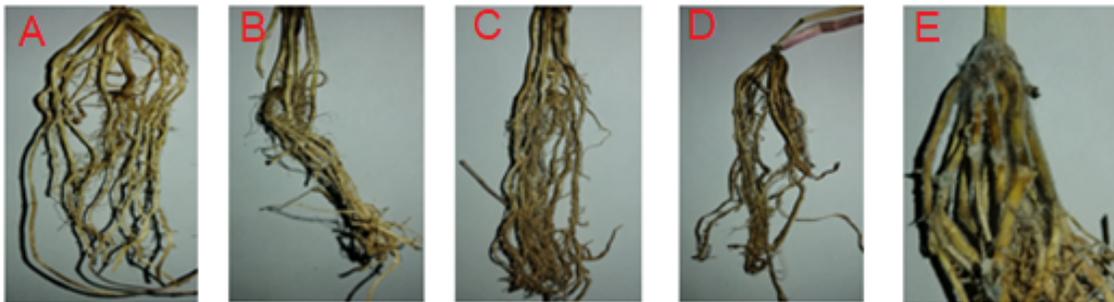


Figura 19. Ensayo de patogenicidad de *Fusarium* spp. en plántulas de maíz. A: Raíz totalmente sana, muestra obtenida del testigo negativo; B: Muestra con 10 % o menos de síntomas de necrosis, muestra obtenida de la plántula inoculada con el aislamiento C10M19M; C: Muestra con 10 % o más de síntomas de necrosis, raíz obtenida a partir de la plántula inoculada con el aislamiento G1M5M; D: Muestra con 50 % o más síntomas de necrosis, muestra obtenida a partir de la plántula inoculada con el aislamiento C10M18T; E: Raíces totalmente infectadas por el hongo, muestra obtenida a partir de la raíz de la plántula inoculada con el aislamiento C7M6M.

7.4.1. Pruebas de patogenicidad en placas de Petri para semillas de maíz

Se encontró que los tratamientos evaluados tienen diferente nivel de patogenicidad. En el Cuadro 6 el análisis estadístico no paramétrico muestra que hay diferencia significativa entre los diferentes tratamientos.

Cuadro 6. Análisis no paramétrico de la varianza con la Prueba de Kruskal-Wallis para el ensayo de patogenicidad en placas de Petri.

K (Valor observado)	K (Valor crítico)	GL	valor-p (unilateral)	alfa
151,060	49,802	35	< 0,0001	0,05

Las cepas que lograron mayor inhibición en la germinación de las semillas de maíz en el ensayo de patogenicidad en placas de Petri fueron C1M19T, C4M4M y C4M8T (Figura 20), las cuales fueron identificadas como *Fusarium proliferatum*. En un ensayo similar realizado por Broders *et al.* (2007), encontraron que la especie que logró una mayor inhibición en la germinación de las semillas de maíz fue *Fusarium graminearum*, cabe mencionar que en su ensayo no experimentó con la especie *F. proliferatum*, por lo cual sería interesante realizar un estudio donde estas dos especies sean comparadas en un ensayo de germinación en placas de Petri. En cuanto a las cepas que permitieron la germinación a mayor cantidad de semillas fueron G6M2T, G6M6M, G7M7M y el control (Figura 20), identificadas también como *F. proliferatum*.

Así mismo, Zainudin *et al.* (2017), en su ensayo de patogenicidad llevado a cabo en granos de maíz, determinó que la cepa de *Fusarium* que ocasionó un mayor índice de severidad fue *F. proliferatum*, así mismo fue la especie que provocó el índice más bajo de severidad, tal y como se reporta en los resultados obtenidos en el presente trabajo.

En cuanto a la patogenicidad en semillas de maíz, se observó correlación con base en la zona de origen de los aislamientos. Las cepas más patogénicas y que ocasionaron la mayor inhibición de germinación fueron recolectadas en el

municipio de Culiacán, mientras que las cepas que afectaron en menor medida la germinación de las semillas fueron recolectadas en el municipio de Guasave.

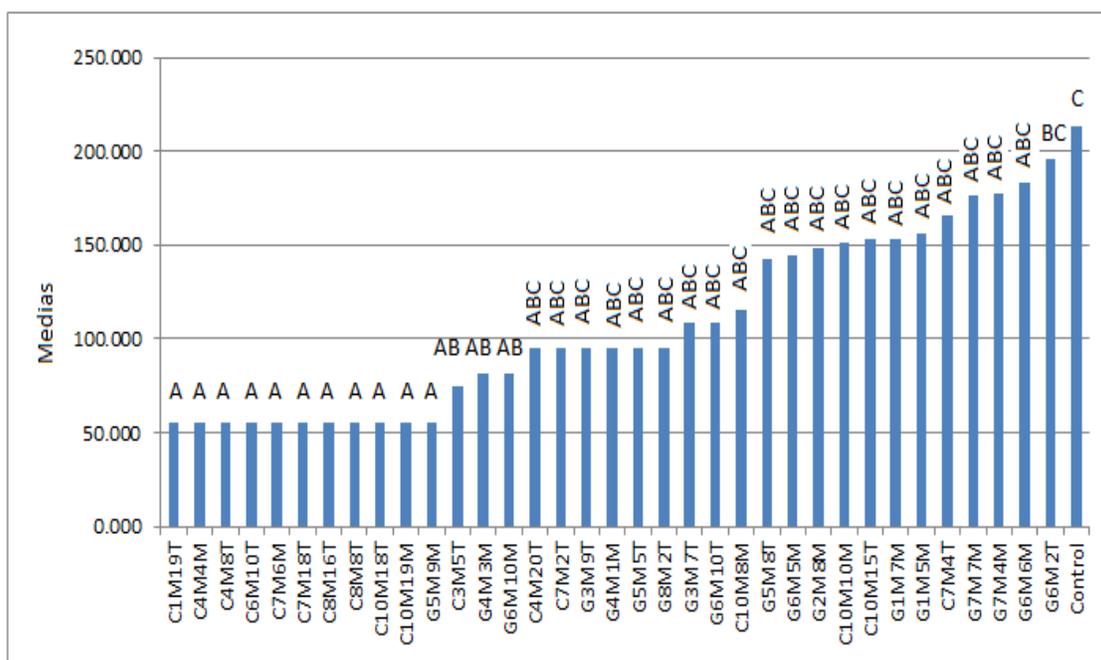


Figura 20.- Medias de rangos de la patogenicidad de 35 cepas de *Fusarium* spp. en el ensayo de placas de Petri.

7.4.2. Pruebas de patogenicidad en plántulas de maíz

Se encontró diferencia estadística significativa entre los diferentes tratamientos en comparación con el control del ensayo (Cuadro 7).

Cuadro 7. Análisis no paramétrico de la varianza con la Prueba de Kruskal-Wallis para el ensayo de patogenicidad en plántulas de maíz.

K (Valor observado)	K (Valor crítico)	GL	valor-p (unilateral)	alfa
127,215	49,802	35	< 0,0001	0,05

Con base en la escala de severidad de Marlatt *et al.*, (1996), las cepas que lograron provocar una mayor severidad en el ensayo de plántulas de maíz fueron C7M6M, C4M8T, G7M7M, C10M15T y G8M2T (Figura 21), tales cepas fueron identificadas como *F. proliferatum*, a excepción de la cepa G8M2T, la cual fue identificada como *F. nygamai*.

En cuanto a las cepas menos patogénicas, estas fueron C3M5T, C10M19M, C8M16T, C6M10T y G3M7T (Figura 21).. Además, todas las cepas fueron determinadas como *F. proliferatum*, a excepción de la cepa C10M19M, la cual fue determinada como *F. verticillioides*.

En el ensayo de severidad de plántulas no se observó correlación entre el lugar de origen y la patogenicidad de los aislamientos. En el presente trabajo de investigación se observó que las especies que ocasionaron un mayor índice de severidad fueron recolectadas tanto del municipio de Culiacán, como en el municipio de Guasave. Así mismo, las cepas que ocasionaron la más baja severidad fueron obtenidas tanto de Culiacán como de Guasave.

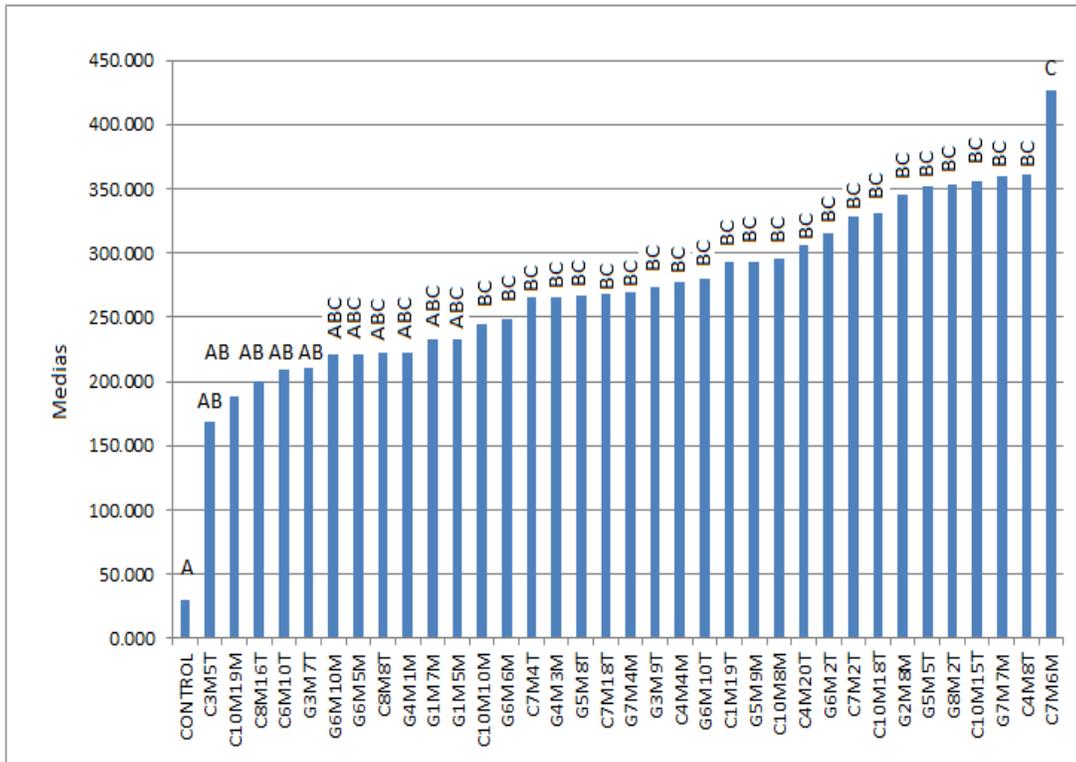


Figura 21.- Medias de rangos de la patogenicidad de 35 cepas de *Fusarium* spp. en el ensayo de plántulas de maíz.

7.4.2.1. Altura de planta

Se observó diferencia altamente significativa entre los tratamientos y en comparación con el control (Cuadro 8).

Cuadro 8. Análisis no paramétrico de la varianza con la Prueba de Kruskal-Wallis para la variable altura en el ensayo de patogenicidad en plántulas de maíz.

K (Valor observado)	K (Valor crítico)	GL	valor-p (unilateral)	alfa
365,525	49,802	35	< 0,0001	0,05

Las cepas que mostraron una alta capacidad para reducir la altura de las plantas de maíz fueron C10M18T, C4M4M, G6M5M, C4M8T y G7M7M (Figura 22), y

todas ellas determinadas como *F. proliferatum*, donde la mayoría de ellas fueron recolectadas en el municipio de Culiacán. Mientras que las cepas que permitieron un mayor desarrollo de altura en las plántulas de maíz se encuentran G1M7M y G4M3M, aislamientos determinados como *F. verticillioides*, así como también los aislamientos G7M4M G1M5M y C8M8T, que fueron identificados como *F. proliferatum*, y todas estas cepas fueron recolectadas en el municipio de Guasave, a excepción del aislamiento C8M8T.

Covarelli *et al.* (2012) demostraron la capacidad de *F. verticillioides* para provocar una disminución en el desarrollo de la altura de las plantas de maíz en Italia. Una de las primeras funciones afectadas por la infección de los patógenos es la respiración de los tejidos vegetales. En este proceso las plantas obtienen la energía para realizar todas las funciones celulares, la acumulación y translocación de los compuestos, síntesis de proteínas, activación de enzimas, el crecimiento y la división celular, entre muchos otros procesos. Cuando un patógeno infecta una planta, se induce un cambio en su tasa respiratoria, en la mayoría de los casos, un aumento. De este modo, se obliga a los tejidos infectados a utilizar con mayor rapidez sus reservas de carbohidratos en comparación con los tejidos sanos, provocando así una disminución en el desarrollo de la altura de plántulas enfermas (Agrios, 2011).

Se observó una correlación negativa entre la altura de las plántulas y la severidad en el ensayo de patogenicidad en plántulas de maíz ($r = -0.221$, $P = 0.0001$).

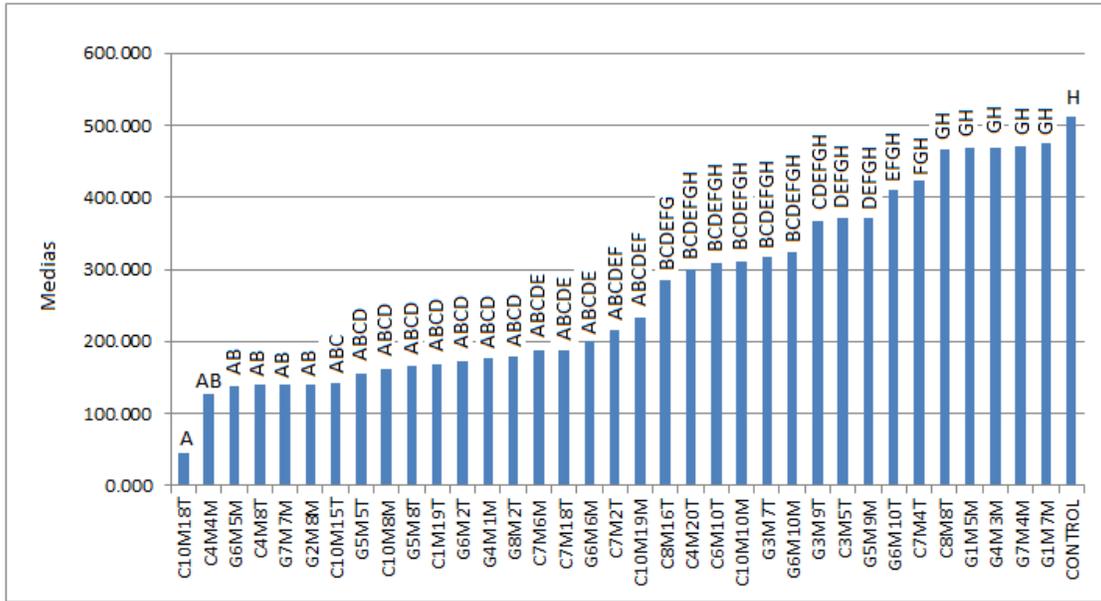


Figura 22.- Medias de rangos de la variable altura en el ensayo de patogenicidad en plántulas de maíz en 35 cepas de *Fusarium* spp.

7.4.2.2. Biomasa húmeda y seca de las plántulas

Los aislamientos con la mayor capacidad de disminución de la biomasa húmeda fueron C10M15T, G7M7M, C4M4M, C4M8T y G5M9M, todos los aislamientos fueron determinados como *F. proliferatum*. Mientras que las aislamientos con la mayor capacidad de disminución de biomasa seca fueron G6M6M, G7M7M y C3M5T, los cuales son de la especie *F. proliferatum*, así mismo el aislamiento C4M20T, la cual fue determinada como *F. falciforme*; mientras que el aislamiento G2M8M se identificó como *F. verticillioides*.

La disminución del peso en las plantas está asociada a la interferencia que causan los patógenos en la translocación del agua y los nutrientes inorgánicos, o el movimiento descendente de las sustancias orgánicas. Una de las maneras en que esto es ocasionado por lo patógenos es la afcción de la integridad o el buen funcionamiento de la raíces, provocando que estas absorban una menor cantidad a la que necesita la planta para su correcto funcionamiento.

Otra forma en la que se ve afectada la translocación del agua a través del tallo se da cuando los patógenos se desarrollan en los vasos xilemáticos. Los patógenos infestan los vasos xilemáticos con sus estructuras, sustancias secretadas por el patógeno o sustancias secretadas por la planta en respuesta al patógeno, de este modo tapando los vasos xilemáticos, dejando de funcionar correctamente, permitiendo que muy poca o nula cantidad de agua pase a través de ellos.

En un estudio realizado por Leyva-Madrigal *et al.* (2014), se confirmó la colonización fúngica de las plantas de maíz utilizadas en sus ensayos de patogenicidad por medio de observaciones en la raíz, utilizando microscopía confocal. Aplicando una tinción WGA a los cortes transversales, se lograron observar las estructuras hifales infestando en los espacios intra e intercelulares, por donde se transporta el agua y otros nutrientes.

7.4.2.2.1 Biomasa húmeda (g) de las plántulas

Existe diferencia altamente significativa entre todas las cepas analizadas y en relación con el control (Cuadro 9).

Cuadro 9. Análisis no paramétrico de la varianza con la Prueba de Kruskal-Wallis para la variable biomasa húmeda (g) en el ensayo de patogenicidad en plántulas de maíz.

K (Valor observado)	K (Valor crítico)	GL	valor-p (unilateral)	alfa
432,960	49,802	35	< 0,0001	0,05

Las cepas que presentaron una capacidad mayor de disminución de biomasa húmeda de las plántulas de maíz fueron C10M15T, G7M7M, C4M4M, C4M8T y G5M9M (Figura 23), respectivamente, todas estas cepas fueron identificadas como *F. proliferatum*, mientras que las cepas que la menor capacidad de reducción de biomasa húmeda en las plántulas de maíz fueron las cepas C6M10T, G4M3M y G4M1M, estos aislamientos resultaron pertenecer a la especie *F.*

proliferatum; mientras que G1M7M, se identificó como la especie *F. verticillioides*. La correlación existente entre el peso fresco de la planta y la severidad en el ensayo de patogenicidad en plántulas de maíz resultó ser negativa ($r = -0.208$, $P = 0.0001$).

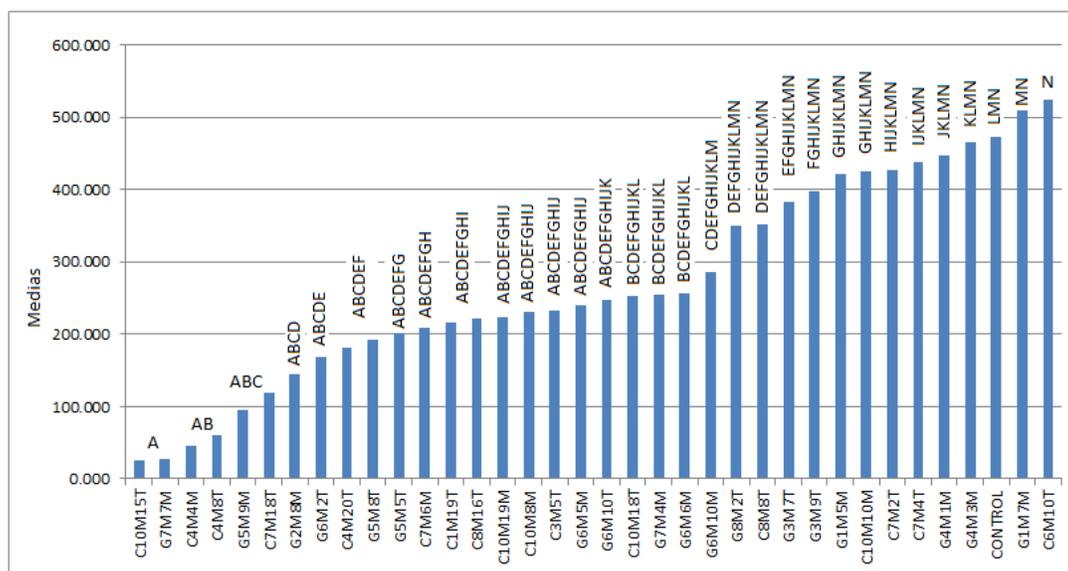


Figura 23.-Medias de rango de la variable biomasa húmeda (g) en el ensayo de patogenicidad en plántulas de maíz en 35 cepas de *Fusarium* spp.

7.4.2.2.2. Biomasa seca (g) seco de la planta

Se determinó que existe una diferencia significativamente entre los diferentes tratamientos de cepas en comparación con el control negativo (Cuadro 10).

Cuadro 10. Análisis no paramétrico de la varianza con la Prueba de Kruskal-Wallis para la variable biomasa seca (g) en el ensayo de patogenicidad en plántulas de maíz

K (Valor observado)	K (Valor crítico)	GL	valor-p (unilateral)	alfa
208,972	49,802	35	< 0,0001	0,05

Las cepas con la capacidad más alta para la reducción de la biomasa seca fueron G7M7M, G6M6M y C3M5T (Figura 24), las cuales pertenecen a la especie *F. proliferatum*; así mismo, el aislamiento C4M20T (*F. falciforme*), y el aislamiento G2M8M (*F. verticillioides*) mostraron alta capacidad de reducción de biomasa

seca. Mientras que los aislamientos que mostraron una capacidad menor de reducción de la biomasa seca de las plántulas de maíz son G6M10T, C8M8T, G6M10M y G4M3M (Figura 24), donde todas las cepas pertenecen a la especie *F. proliferatum*. Así mismo, se observó una correlación negativa entre el biomasa seca de las plantas y la severidad en el ensayo de patogenicidad en plántulas de maíz ($r = -0.125$, $P = 0.004$).

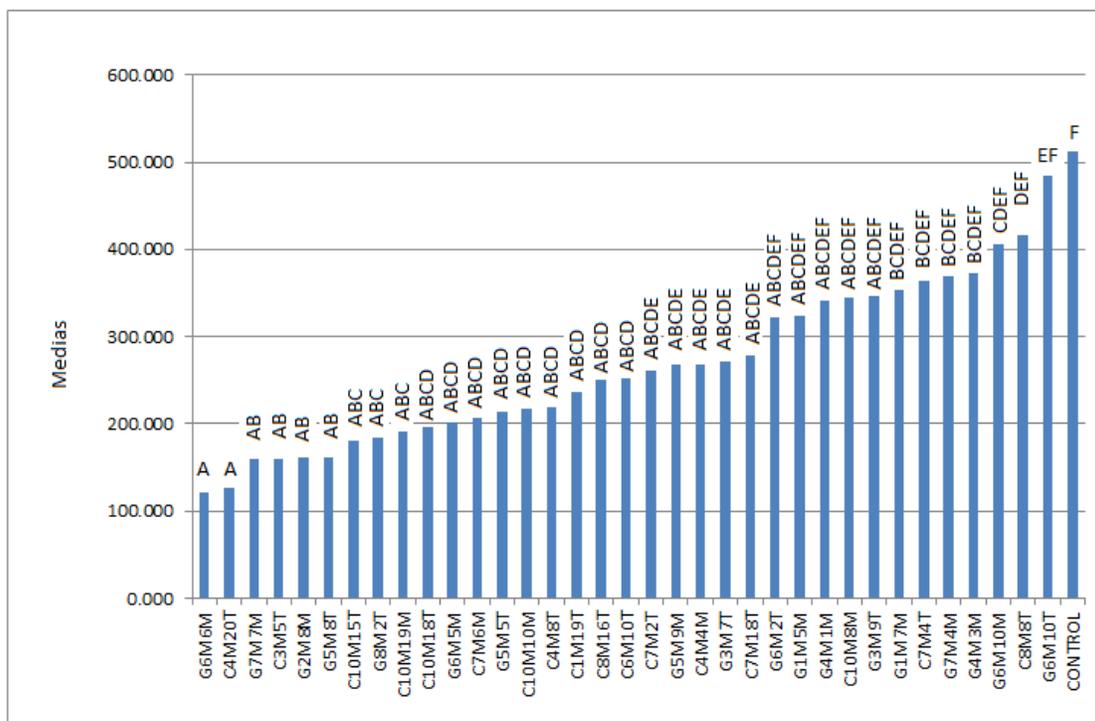


Figura 24. Medias de rangos de la variable biomasa seca (g) de la planta en el ensayo de patogenicidad en plántulas de maíz en 35 cepas de *Fusarium* spp.

7.4.2.3. Contenido de clorofila de la planta

Con base en la evaluación número 5 de esta variable, las cepas que presentaron la mayor capacidad de disminución de contenido de clorofila en las plántulas fueron los aislamientos C4M4M, C10M10M, C6M10T, G1M5M y G6M10M (Figura 29), donde todas las cepas pertenecen a la especie *F. proliferatum*, excepto la cepa G2M8M, la cual pertenece a la especie *F. verticillioides*.

El primer síntoma de la interferencia en el proceso de la fotosíntesis por parte de los patógenos es la aparición de manchas cloróticas y necrosis en las plántulas

infectadas, el cual fue el primer síntoma presentado por nuestras plantas, fue la clorosis. Este síntoma es el resultado de la reducción en la superficie fotosintética, degeneración de cloroplastos y/o a la producción de micotoxinas por el hongo, que provocan la inhibición de enzimas que intervienen de manera directa o indirecta en el proceso de la fotosíntesis (Agrios, 2011).

7.4.2.3.1. Contenido de clorofila en la planta (Evaluación 1)

Se observó diferencia significativa entre los tratamientos, así como en comparación con el control negativo (Cuadro 11).

Cuadro 11. Análisis no paramétrico de la varianza con la Prueba de Kruskal-Wallis para la variable verdor de la planta (Evaluación 1) en el ensayo de patogenicidad en plántulas de maíz.

K (Valor observado)	K (Valor crítico)	GL	valor-p (unilateral)	alfa
133,070	49,802	35	< 0,0001	0,05

Las cepas que presentaron una capacidad mayor para la disminución del contenido de clorofila en las plántulas de maíz fueron los aislamientos C4M4M, C6M10T, G3M7T y C10M10 (Figura 25), las cuales pertenecen a la especie *F. proliferatum*, y el aislamiento G8M2T, fue identificado como *F. nygamai*, el cual también presentó una mayor capacidad de disminución del contenido de clorofila.

Las cepas que lograron la menor disminución del contenido de clorofila en las plántulas de maíz son G6M10T, C10M15T, G7M4M y G1M7M (Figura 25), donde todas las cepas pertenecen a *F. proliferatum*, a excepción de la cepa G1M7M, la cual pertenece a *F. verticillioides*. El contenido de clorofila en la planta de maíz no está correlacionado de manera positiva con la severidad en el ensayo de patogenicidad en plántulas de maíz ($r = -0.137$, $P = 0.001$).

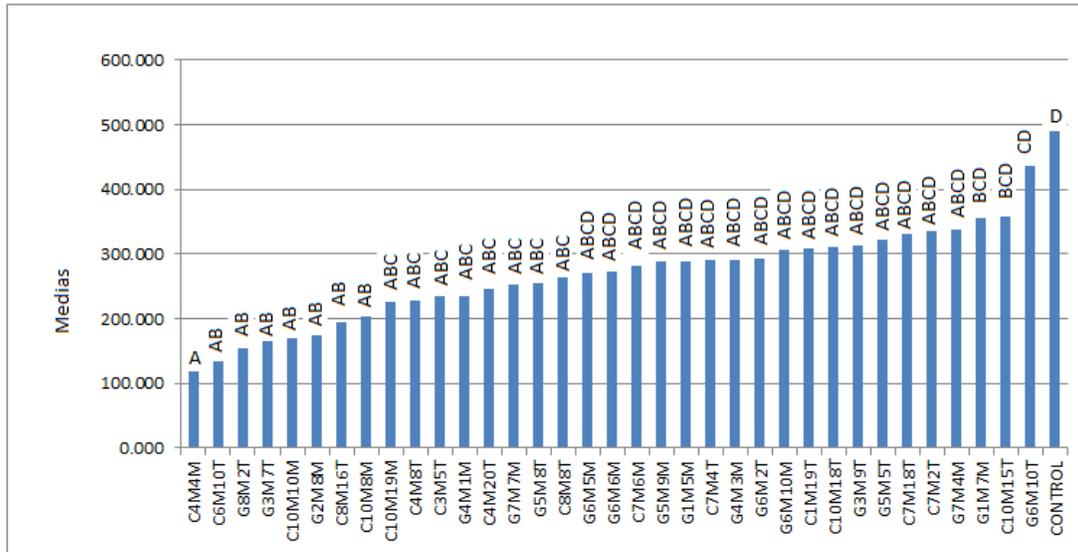


Figura 25. Medias de rangos de la variable verdor de la planta (Evaluación 1) en el ensayo de patogenicidad en plántulas de maíz en 35 cepas de *Fusarium* spp.

7.4.2.3.2. Contenido de clorofila en la planta (Evaluación 2)

Existe diferencia altamente significativa entre los tratamientos con respecto al control utilizado (Cuadro 12).

Cuadro 12. Análisis no paramétrico de la varianza con la Prueba de Kruskal-Wallis para el variable verdor de la planta (Evaluación 2) en el ensayo de patogenicidad en plántulas de maíz.

K (Valor observado)	K (Valor crítico)	GL	valor-p (unilateral)	alfa
279,090	49,802	35	< 0,0001	0,05

Las cepas con mayor capacidad en la disminución del contenido de clorofila en la planta fueron C10M10M, G6M6M, C6M10T, G3M7T y C4M20T (Figura 26), donde todas las cepas pertenecen a la especie *F. proliferatum*, a excepción de C4M20T, que pertenece a la especie *F. falciforme*. Mientras que las especies que tuvieron una baja capacidad para la disminución del verdor en las plántulas de maíz se encuentran G6M10T, C10M15T C7M18T, G1M5M y G1M7M (Figura 26), donde

todas las cepas pertenecen a la especie *F. proliferatum*, excepto la cepa G1M7M, la cual pertenece a la especie *F. verticillioides*. No se observó una correlación positiva entre el contenido de clorofila de la plantas de maíz y la severidad en el ensayo de patogenicidad en las plántulas de maíz ($r = -0.058$, $P = 0.181$).

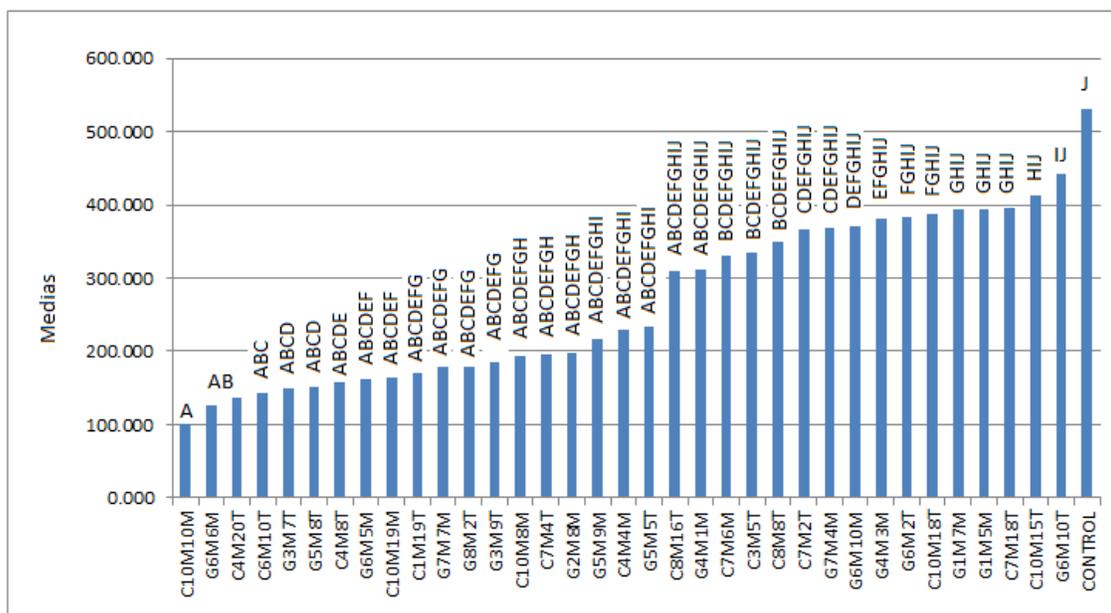


Figura 26. Medias de rangos de la variable verdor de la planta (Evaluación 2) en el ensayo de patogenicidad en plántulas de maíz en 35 cepas de *Fusarium* spp.

7.4.2.3.3. Contenido de clorofila en la planta (evaluación 3)

Se encontró diferencia significativa entre los tratamientos y con respecto al control (Cuadro 13).

Cuadro 13. Análisis no paramétrico de la varianza con la Prueba de Kruskal-Wallis para la variable verdor de la planta (Evaluación 3) en el ensayo de patogenicidad en plántulas de maíz.

K (Valor observado)	K (Valor crítico)	GL	valor-p (unilateral)	alfa
76,634	49,802	35	< 0,0001	0,05

Las cepas que lograron tener una mayor capacidad en la disminución del verdor de la planta fueron C7M6M, C10M10M, C3M5T, C4M8T y C4M4M (Figura 27), donde todas las cepas pertenecen a la especie *F. proliferatum*. Mientras que las

especies que tuvieron una baja capacidad para la disminución del contenido de clorofila en las plántulas de maíz se encuentran C10M15T, G4M3M, C7M2T, G6M10M y C10M8M (Figura 27), donde todas las cepas pertenecen a la especie *F. proliferatum*. El verdor de las plántulas y la severidad se correlacionaron negativamente ($r = -0.86$, $P = 0.046$).

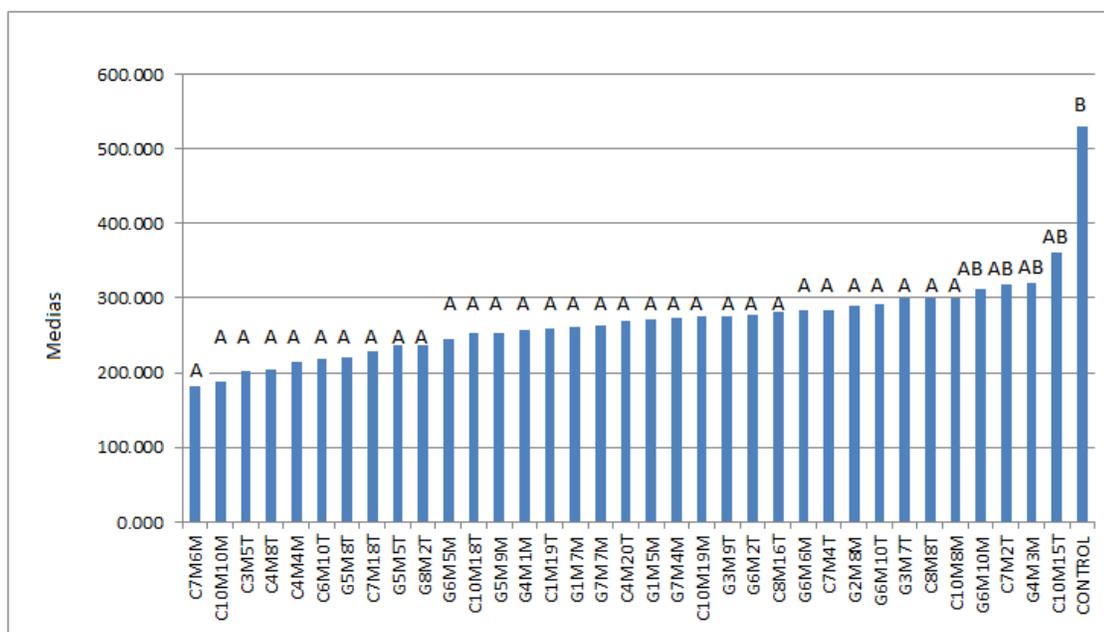


Figura 27. Medias de los rangos de la variable verdor de la planta (Evaluación 3) en el ensayo de patogenicidad en plántulas.

7.4.2.3.4. Contenido de clorofila en la planta (Evaluación 4)

Existe diferencia altamente significativa entre los tratamientos y con respecto al control (Cuadro 14).

Cuadro 14. Análisis no paramétrico de la varianza con la Prueba de Kruskal-Wallis para la variable verdor de la planta (Evaluación 4) en el ensayo de patogenicidad en plántulas de maíz.

K (Valor observado)	K (Valor crítico)	GL	valor-p (unilateral)	alfa
149,905	49,802	35	< 0,0001	0,05

Las cepas que lograron tener una mayor capacidad en la disminución del contenido de clorofila en la planta fueron C1M19T, C10M10M, C7M6M, G2M8M y G8M2T (Figura 28), donde todas las cepas pertenecen a la especie *F. proliferatum*, a excepción de G8M2T, que pertenece a la especie *F. nygamai*. Mientras que las especies que tuvieron una baja capacidad para la disminución del verdor en las plántulas de maíz se encuentran C8M16T, C7M4T, C7M2T, G4M3M y G1M7M (Figura 28), donde todas las cepas pertenecen a la especie *F. proliferatum*, excepto la cepa G1M7M, la cual pertenece a la especie *F. verticillioides*. El contenido de clorofila de las plántula se correlacionó de manera negativa con el grado de severidad en el ensayo de patogenicidad de plántulas de maíz ($r = -0.084$, $P = 0.05$).

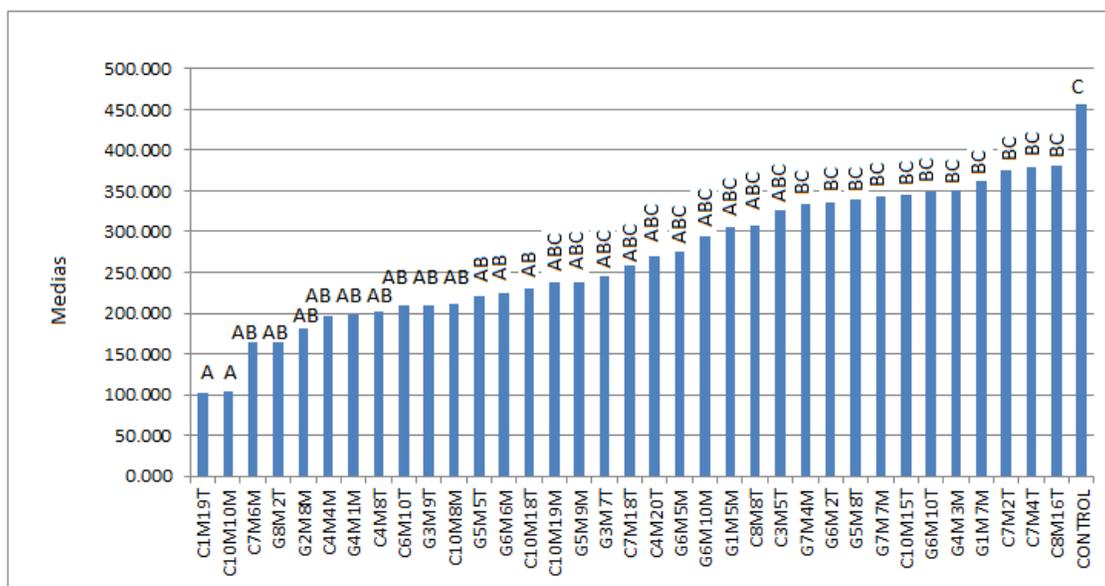


Figura 28. Medias de los rangos de la variable verdor de la planta (Evaluación 4) en el ensayo de patogenicidad en plántulas de maíz en 35 cepas de *Fusarium* spp.

7.4.2.3.5. Contenido de clorofila en la planta (Evaluación 5)

Existe diferencia altamente significativa entre los tratamientos y con respecto al control (Cuadro 15).

Cuadro 15. Análisis no paramétrico de la varianza con la Prueba de Kruskal-Wallis para la variable verdor de la planta (Evaluación 5) en el ensayo de patogenicidad en plántulas de maíz.

K (Valor observado)	K (Valor crítico)	GL	valor-p (unilateral)	alfa
87,004	49,802	35	< 0,0001	0,05

Las cepas que lograron tener una mayor capacidad en la disminución del contenido de clorofila en la planta fueron C4M4M, C10M10M, C6M10T, G1M5M y G6M10M (Figura 29), donde todas las cepas pertenecen a la especie *F. proliferatum*. Mientras que los aislamientos que tuvieron una baja capacidad para la disminución del contenido de clorofila en las plántulas de maíz se encuentran G6M10T, C8M16T, C3M5T, C10M8M y G2M8M (Figura 29), donde todas las cepas pertenecen a la especie *F. proliferatum*, excepto la cepa G2M8M, la cual pertenece a la especie *F. verticillioides*. Existe una correlación positiva relativamente baja entre el verdor y la severidad en el ensayo de patogenicidad en plántulas de maíz ($r= 0.001$, $P=0.991$).

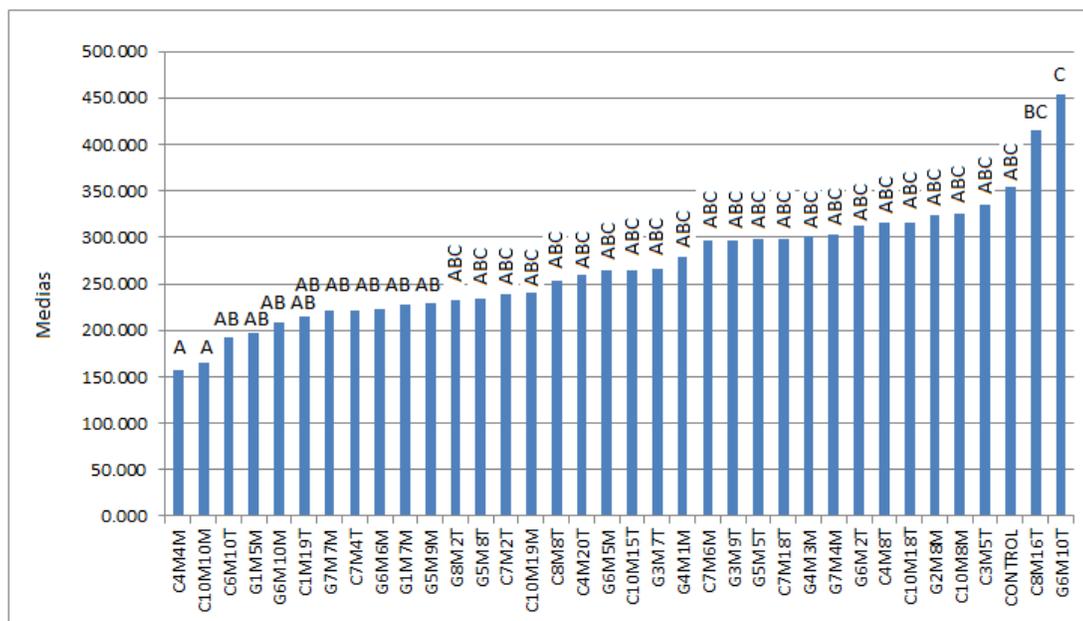


Figura 29. Medias de los rangos de la variable verdor de la planta (Evaluación 5) en el ensayo de patogenicidad en plántulas de maíz en 35 cepas de *Fusarium* spp.

La variación de patogenicidad existente entre los aislamientos de la misma especie puede deberse a la presión que ejerce la combinación de los factores climáticos temperatura y humedad en su lugar de origen sobre estos. Aunque la temperatura es un factor muy importante respecto al nivel de severidad de un organismo patógeno, el factor humedad es mucho más determinante para estos organismos. Puesto que, el nivel de severidad de un organismo patógeno es proporcional a la disponibilidad de humedad presente en el suelo, la cual aumenta cerca del punto de saturación (Agrios, 2011). Por otra parte, la recolección de estos aislamientos se llevó a cabo durante el mes de mayo del 2018, en los municipios de Culiacán y Guasave, donde las características ambientales presentan una alta similitud, con una temperatura máxima de 34 °C, una mínima de 18 °C, y una precipitación media anual de 142-154 mm., estas condiciones parecen favorecer a la especie de *F. proliferatum*. Por otra parte hay que tener en cuenta que la disponibilidad del agua de riego no está disponible en la misma medida para todas las regiones para el riego de los cultivo, así que este podría ser un factor que influya en la proliferación y severidad de estos organismos patógenos y sería muy prudente incluirlo en trabajos futuros.

VIII.-CONCLUSIONES

Identificación y frecuencia de distribución de especies de *Fusarium* causantes de la fusariosis del maíz en el estado de Sinaloa

Del total de aislamientos (n=35), se identificaron 29 aislados como *F. proliferatum* (82.85 %), un aislamiento de *F. falciforme* (2.85 %), un aislamiento de *F. solani* (2.85 %), un aislamiento de *F. nygamai* (2.85 %) y tres de *F. verticillioides* (8.57 %).

De los 29 aislamientos de *F. proliferatum*, 16 fueron obtenidos a partir de tallo de maíz y 13 de grano (mazorca), no se encontró en raíz. Sin embargo, los 3 aislamientos de *F. verticillioides* fueron obtenidos sólo de grano (mazorca), no encontrándose en tallo ni en raíz. Así mismo, los aislamientos de *F. solani*, *F. nygamai* y *F. falciforme* fueron encontrados sólo en tallo. Así mismo, el presente trabajo reporta por vez primera a *F. falciforme* como causante de la fusariosis en maíz en México.

F. proliferatum fue la especie más frecuente en el estudio, sin embargo no se encontró ninguna relación entre las especies de *Fusarium* identificadas con las áreas muestreadas y el sistema de producción, esto muestra la alta capacidad de las especies de *Fusarium* para afectar el cultivo de maíz establecido en cualquier condición debido a la variabilidad genética de *Fusarium*.

Potencial patogénico de las especies de *Fusarium* causantes de la fusariosis en maíz en el estado de Sinaloa

Con base en los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación, se observó que en los ensayos de patogenicidad en semillas de maíz, aislamientos de *F. proliferatum* (C1M19T, C4M4M, C4M8T) fueron los más agresivos.

Así mismo, con base en los resultados de patogenicidad en plantulas de maíz, se observó la mayor agresividad en aislamientos de *F. proliferatum* (C7M6M, C4M8T, G7M7M, C10M15T) y *F. nygamai* (G8M2T).

La mayor capacidad de reducción de altura de las plantas de maíz fue por ocasionada por los aislamientos de *F. proliferatum* (C10M18T, C4M4M, G6M5M, C4M8T, G7M7M), así como la mayor capacidad de reducción de biomasa húmeda fue también por aislamientos de *F. proliferatum* (C10M15T, G7M7M, C4M4M, C4M8T, G5M9M).

Con respecto a la mayor reducción de biomasa seca fue ocasionada por aislamientos de *F. proliferatum* (G6M6M, G7M7M, C3M5T), *F. falciforme* (C4M20T) y *F. verticillioides* (G2M8M).

Con respecto a la producción de clorofila, los menores valores de clorofila fueron en los tratamientos con la especie de *F. proliferatum* (C4M4M, C10M10M, C6M10T, G1M5M, G6M10M).

Aislamientos de la especie *Fusarium proliferatum* presentaron la mayor agresividad en las variables de inhibición de germinación de semillas, altura de planta, biomasa húmeda y contenido de clorofila. Sin embargo, en las variables de severidad en plantula también *F. proliferatum* fue la más agresiva junto con *F. nygamai*. En el caso de producción de biomasa seca, la mayor reducción fue ocasionada por *F. proliferatum* junto con *F. falciforme* y *F. verticillioides*.

Aunado a lo anterior, aislamientos de *F. proliferatum* variaron en virulencia según los síntomas que causaron la enfermedad en las plantas de maíz, inhibición de germinación de semillas de maíz, contenido de clorofila, biomasa húmeda y biomasa seca de las plantas puesto que también se observó que aislamientos de la misma especie fueron de los menos agresivos.

Análisis filogenético de las especies de *Fusarium* causantes de la fusariosis en maíz en el estado de Sinaloa

El análisis filogenético por el método Neighbor-Joining de las secuencias del gen EF-1 α con las secuencias del aislamiento C4M20T (MK887202) y otras

secuencias del Complejo de Especies de *Fusarium Solani*, mostró que la secuencia MK887202 se agrupó con las secuencias de la especie *Fusarium falciforme* (FSSC 3+4). Siendo el primer reporte de *F. falciforme* causando la fusariosis en maíz en México.

Así mismo, el análisis filogenético de las secuencias obtenidas en el presente estudio confirmó que cada especie esta constituida por un linaje filogenético distinto. Así mismo, se observó variación genética en los árboles filogenéticos, lo que puede estar relacionado con los diferentes orígenes geográficos y las condiciones ambientales de donde se obtuvieron los aislamientos, lo que pudo haber favorecido una co-evolución independiente del patógeno.

IX.-LITERATURA CITADA

- Acosta, R. 2009. El cultivo del maíz, su origen y clasificación. El maíz en Cuba. Cultivos Tropicales. 30 (2): 00-00.
- Addinsoft. 2008. XLSTAT Software. Versión 2018. 451393. Addinsoft1995-2018.
- Agrios, G.N. 2011. Fitopatología. Limusa. Distrito Federal, México. 856pp.
- Aguín, O., Cao A., Pintos C., Santiago R., Mansilla P., Butron A. 2014. Occurrence of *Fusarium* species in maize kernels grown in northwestern. Journal of Plant Pathology. 63: 946-951.
- Bai, G.H., Shaner, G. 1996. Variation in *Fusarium graminearum* and cultivar resistance to wheat scab. Plant Disease. 80: 975-979.
- Broders, K.D., Lipps, P.E., Paul, P.A., Dorrance, A. E. 2007. Evaluation of *Fusarium graminearum* associated with corn and soybean seed and seedling disease in Ohio. Plant disease. 91: 1155-1160.
- Boutigny, A.L., Ward, T. J., Ballois, N., Iancu, G., Iloos, R. 2014. Diversity of the *Fusarium graminearum* species complex on French cereals. European journal of plant pathology. 138 (1): 133-148.
- CIMMYT. Programa de Maíz del CIMMYT. 2004. Enfermedades del maíz: una guía para su identificación en el campo. Cuarta edición. Ciudad de México, México: CIMMYT.
- Cruz, O. 2013. El cultivo del maíz, Manual para el cultivo de maíz en Honduras. Secretaria de Agricultura y Ganadería de Honduras. <http://www.dicta.hn/files/2013,-Manual-cultivo-de-maiz--G.pdf> (Consulta, enero 2018).
- CONABIO. 2006. Elementos para la determinación de centros de origen y centros de diversidad genética en general y el caso específico de la liberación experimental de maíz transgénico al medio ambiente en México. Revista de Geografía Agrícola. 38: 121-140.
- Covarelli, L., Stifano, S., Beccari, G., Raggi, L., Lattanzio, V.M.T., Albertini, E. 2012. Characterization of *Fusarium verticillioides* strains isolated from maize in Italy: Fumonisin production, pathogenicity and genetic variability. Food microbiology. 31 (1): 17-24.
- Daami-Remadi, M. 2006. Etude des fusarioses de la pomme de terre [Study of fusariosis of the potato]. These Institut Superieur. Agronomique de Chott-Mariem. 424: 77.
- Delidow, B.C., Lynch, J.P., Peluso, J.J., White, B.A. 1993. Polymerase chain reaction. In PCR Protocols. Humana Press, Totowa, N.J. pp. 1-29.
- Deras, H. 2014. Guía técnica: El cultivo de maíz. <http://repiica.iica.int/docs/b3469e/b3469e.pdf> (Consulta, noviembre 2017).
- Desjardins, A.E. 2006. *Fusarium* mycotoxins: chemistry, genetics, and biology. APS. Press. San Paul, E.U.A. 2266pp.
- Farnham, D., Benson, G., Pearce, R. 2003. Corn: chemistry and technology. American Association of Cereal Chemist. St. Paul, Minnesota, USA. Pp: 5-7.
- Figuroa, R.M.G., Rodríguez, G.R., Guerrero, A.B.Z., González, C.M.M., Pons, H.J.L., Jiménez, B.J.F., Ramírez, P.J.G., Andrio, E.E., Mendoza, E.M. 2010. Caracterización de especies de *Fusarium* asociadas a la pudrición de raíz de maíz en Guanajuato. Revista Mexicana de Fitopatología. 28: 124-134.

- García, G.C., Lizárraga, S.G.L., Armenta, B.A.D., Apodaca, S. M.A. 2012. Efecto de productos biorracionales en la incidencia de hongos y concentración de aflatoxinas en maíz blanco cultivado en Sinaloa, México. *Revista Científica UDO Agrícola*. 12: 830-838.
- Hansen, H.N., Smith, R.E. (1932). The mechanism of variation in imperfect fungi: *Botrytis cinerea*. *Phytopathology*. 22 (12).
- Hao, J.J., Xie, S.N., Sun, J., Yang, G.Q., Liu, J.Z., Xu F., Ru, Y.Y., Song, Y.L. 2007. Analysis of *Fusarium graminearum* species complex from Wheat-Maize Rotation Regions in Henan (China). *Plant Disease*. 101: 720-725.
- Howland, J.L. 1996. Short protocols in molecular biology. Third edition: Edited by F. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith y K. Struhl. John Wiley & Sons, New York. 1995. 836 pp.
- Jeger, M.J., Pautasso, M. (2008). Plant disease and global change—the importance of long-term data sets. *New Phytologist*, 177(1): 8-11.
- Kato, T.A., Mapes, C., Mera, L., Serratos, J., Bye, R. 2009. Origen y diversificación del maíz: una revisión analítica. Editorial Impresora Apolo. Ciudad de México, México. 116pp.
- Kawakami, A., Kato, N., Sasaya, T., Tomioka, K., Inoue, H., Miyasaka, A., Hirayae, K. 2015. Gibberella ear rot of corn caused by *Fusarium asiaticum* in Japan. *Journal of General Plant Pathology*. 81 (4): 324-327.
- Kristensen, R., Mona, T.O.R.P., Kosiak, B., Holst-Jensen, A. 2005. Phylogeny and toxigenic potential is correlated in *Fusarium* species as revealed by partial translation elongation factor 1 alpha gene sequences. *Mycological research*. 109 (2): 173-186.
- Lenart, A. M., Klimek-Kopyra, A., Boroń, P. M. (2013). Morphological and molecular identification and PCR amplification to determine the toxigenic potential of *Fusarium* spp. isolated from maize ears in southern Poland. *Phytoparasitica*. 41 (3): 241-248.
- Leslie, J.F., Summerell, B.A. 2006. The *Fusarium* laboratory manual. John Wiley & Sons. Iowa, USA. 388pp.
- Lesur, L. 2005. Una guía paso a paso: Manual del cultivo del maíz. Trillas. Ciudad de México, México. 80pp.
- Leyva, M.K.Y., Larralde, C.C.P., Apodaca, S.M.A., Quiroz, F.F.R., Mexia, B.P.A., Portillo, V.S., Ordaz, O.J., Maldonado, M.I.E. 2015. *Fusarium* species from the *Fusarium fujikuroi* species complex involved in mixed infections of maize in Northern Sinaloa, Mexico. *Journal of Phytopathology*. 163: 486-497.
- Magculia, N.J.F., Cumagun, C.J.R. 2011. Genetic diversity and PCR-based identification of potential fumonisin-producing *Fusarium verticillioides* isolates infecting corn in the Philippines. *Tropical Plant Pathology*. 36 (4): 225-232.
- Marín, S., Sanchis, V., Magan, N. 1995. Water activity, temperature, and pH effects on growth of *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* isolates from maize. *Canadian journal of microbiology*. 41 (12): 1063-1070.
- Marlatt, M.L.J., Correll, J.C., Kauffman, P., Cooper, P.E. 1996. Two genetically distinct populations of *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici* race 3 in the United States. *Plant Disease*. 80 (12): 1336-1342.
- Miedaner, T., Reinbrecht, C., Schilling, A.G. 2000. Association among aggressiveness, fungal colonization, and mycotoxin production of 26 isolates of *Fusarium*

- graminearum* in Winter rye head blight. Journal of Plant Diseases and Protection. 107: 124-134.
- Morales-Rodríguez, I., de Yanz-Morales, M. J., Silva-Rojas, H. V., García-de-los- Santos, G., Guzmán-de-Pena, D. A. 2007. Biodiversity of *Fusarium* species in 79 Mexico associated with ear rot in maize, and their identification using a phylogenetic approach. Mycopathologia, 163 (1): 31-39.
- Munkvold, G.P. 2017. *Fusarium* Species and Their Associated Mycotoxins. Mycotoxigenic Fungi: Methods and Protocols. Humana Press. Nueva York, E.U.A. pp: 51-106.
- Nakaya, K., Tohyama, J., Naik, S., Tanigawa, H., Jaye, M., MacPhee, C., Billheimer, J.T., Rader, D.J. 2011. PPAR α activation promotes macrophage reverse cholesterol transport through an LXR-dependent pathway. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 31(6): 1276–1282.
- O'Donnell, K., Kistler, H.C., Cigelnik, E., Ploetz, R. C. 1998. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. Proceedings of the National Academy of Sciences. 95 (5): 2044-2049.
- Rahjoo, V., Zad, J., Javan-Nikkhah, M., Gohari, A. M., Okhovvat, S. M., Bihamta, M. R., Klemsdal, S. S. 2008. Morphological and molecular identification of *Fusarium* isolated from maize ears in Iran. Journal of Plant Pathology. 463-468.
- Serratos, H. 2009. El origen y la diversidad del maíz en el continente americano. Greenpeace. Ciudad de México, México. 36pp.
- SIAP. 2018. Producción agrícola. www.siap.gob.mx (Consulta, Julio 2018).
- Simpson, D.R., Rezanoor, H.N., Parry, D.W., Nicholson, P. 2000. Evidence for differential host preference in *Microdochium nivale* var. *Majus*, *M. nivale* var. *Nivale*. Plant Pathology. 49: 261-268.
- Starr, C., Taggart, R. 2008. Biología La unidad y la diversidad de la vida. Innovacion educativa. 8 (45).
- Summerell, B.A., Leslie, J.F., Backhouse, D., Bryden, W.L., Burgess, L. W. 2001. *Fusarium*: Paul E. Nelson Memorial Symposium. In *Fusarium*: Paul E. Nelson Memorial Symposium. American Phytopathological Society (APS Press). St. Paul, Minnesota, E.U.A. 392pp.
- Tamay de Dios, L., Ibarra, C., Velasquillo, C. 2013. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. Investigación en discapacidad. 2 (2): 70-78.
- UAS. 2018. Universidad Autónoma de Sinaloa. Estación climatológica. Disponible en: <http://www.uas.edu.mx/servicios/clima/boletines> (Consultado el 20 de junio de 2019).
- Vera, E. 2013. Identificación morfológica y molecular de especies de *Fusarium* en plantas de nochebuena. Tesis Bach. Puebla, México, Instituto Tecnológico de Tehuacán. 40 p.
- Vigier, B., Reid, L.M., Seifert, K.A., Stewart, D.W., Hamilton, R. I. 1997. Distribution and prediction of *Fusarium* species associated with maize ear rot in Ontario. Canadian Journal of Plant Pathology. 19 (1): 60-65.
- Wang, B., Jeffers, S.N. 2000. *Fusarium* root and crown rot: a disease of container grown hostas. Plant disease. 84: 980-988.
- Daniel, W. (2002). Bioestadística. Base para el análisis de las ciencias de la salud.

4ta. Edicion. Editorial Limusa. Ciudad de México, México. 755pp.

Woodward, F.I. 1988. Temperature and the distribution of plant species. In Symposia of the Society for Experimental Biology. 42: 59-75.

Zainudin, N.A.I.M., Hamzah, F.A., Kusai, N.A., Zambri, N.S., Salleh, S. 2017. Characterization and pathogenicity of *Fusarium proliferatum* and *Fusarium verticillioides*, causal agents of *Fusarium* ear rot of corn. Turkish Journal of Biology. 41(1): 220-230.

X. ANEXOS

Anexo 1. Coordenadas de los sitios de origen de los aislamientos de *Fusarium* spp. en el municipio de Culiacán y Guasave, Sinaloa.

Localización	Coordenadas
El Trébol	24°44'38.5"N 107°27'13.4"W
Agronomía	24°37'29.5"N 107°26'42.1"W
El Torito	24°53'58.1"N 107°29'59.5"W
Salida Norte Culiacán	24°50'26.7"N 107°26'25.2"W
Centagri	24°42'00.4"N 107°26'41.6"W
El Quemadito	24°41'38.7"N 107°26'34.7"W
Desv. Villa Juárez	24°39'57.2"N 107°26'43.0"W
CAFELI	24°39'30.5"N 107°26'41.9"W
La Presita	24°50'48.0"N 107°26'45.0"W
Luxemburgo	24°51'03.2"N 107°27'03.7"W
Lázaro Cárdenas	24°44'38.5"N 107°27'13.4"W
Lázaro Cárdenas 2	24°37'29.5"N 107°26'42.1"W
Solidaridad	24°53'58.1"N 107°29'59.5"W
Tres De Mayo	24°50'26.7"N 107°26'25.2"W
Tamazula	24°42'00.4"N 107°26'41.6"W
Las Cañadas Numero 1	24°41'38.7"N 107°26'34.7"W
El Cubilete	24°39'57.2"N 107°26'43.0"W
San Pedro	24°39'30.5"N 107°26'41.9"W
Rancho El Colorado	24°50'48.0"N 107°26'45.0"W
Burriocito	24°51'03.2"N 107°27'03.7"W

Anexo 2. Comparaciones múltiples por pares mediante la prueba de Dunn, para el ensayo de patogenicidad en placas de Petri.

Cepa	Frecuencia	Suma de rangos	Media de rangos	Grupos
C1M19T	6	330,000	55,000	A
C4M4M	6	330,000	55,000	A
C4M8T	6	330,000	55,000	A
C6M10T	6	330,000	55,000	A
C7M6M	6	330,000	55,000	A
C7M18T	6	330,000	55,000	A
C8M16T	6	330,000	55,000	A
C8M8T	6	330,000	55,000	A
C10M18T	6	330,000	55,000	A
C10M19M	6	330,000	55,000	A
G5M9M	6	330,000	55,000	A
C3M5T	6	450,000	75,000	AB
G4M3M	6	490,000	81,667	AB
G6M10M	6	490,000	81,667	AB
C4M20T	6	570,000	95,000	ABC
C7M2T	6	570,000	95,000	ABC
G3M9T	6	570,000	95,000	ABC
G4M1M	6	570,000	95,000	ABC
G5M5T	6	570,000	95,000	ABC
G8M2T	6	570,000	95,000	ABC
G3M7T	6	650,000	108,333	ABC
G6M10T	6	650,000	108,333	ABC
C10M8M	6	690,000	115,000	ABC
G5M8T	6	856,500	142,750	ABC
G6M5M	6	868,500	144,750	ABC
G2M8M	6	890,000	148,333	ABC
C10M10M	6	908,500	151,417	ABC
C10M15T	6	918,000	153,000	ABC
G1M7M	6	918,000	153,000	ABC
G1M5M	6	936,500	156,083	ABC
C7M4T	6	992,500	165,417	ABC
G7M7M	6	1056,500	176,083	ABC
G7M4M	6	1066,000	177,667	ABC
G6M6M	6	1096,500	182,750	ABC
G6M2T	6	1177,500	196,250	BC
Control	6	1281,000	213,500	C

Anexo 3. Comparaciones múltiples por pares mediante la prueba de Dunn, para el ensayo de patogenicidad e índice de severidad (DSI), en plántulas de maíz.

Cepa	Frecuencia	Suma de rangos	Media de rangos	Grupos	DSI (%)
CONTROL	15	450,000	30,000	A	0
C3M5T	15	2529,500	168,633	AB	21,67
C10M19M	15	2830,500	188,700	AB	25
C8M16T	15	3008,500	200,567	AB	26,67
C6M10T	15	3131,500	208,767	AB	28,33
G3M7T	15	3165,500	211,033	AB	26,67
G6M10M	15	3316,000	221,067	ABC	28,33
G6M5M	15	3316,000	221,067	ABC	28,33
C8M8T	15	3343,500	222,900	ABC	30
G4M1M	15	3343,500	222,900	ABC	30
G1M7M	15	3487,500	232,500	ABC	30
G1M5M	15	3494,000	232,933	ABC	30
C10M10M	15	3672,000	244,800	BC	31,67
G6M6M	15	3733,500	248,900	BC	33,33
C7M4T	15	3979,500	265,300	BC	35
G4M3M	15	3979,500	265,300	BC	35
G5M8T	15	4000,500	266,700	BC	36,67
C7M18T	15	4018,000	267,867	BC	41,67
G7M4M	15	4062,000	270,800	BC	36,67
G3M9T	15	4102,500	273,500	BC	35
C4M4M	15	4157,500	277,167	BC	36,67
G6M10T	15	4191,500	279,433	BC	36,67
C1M19T	15	4403,500	293,567	BC	50
G5M9M	15	4403,500	293,567	BC	38,33
C10M8M	15	4424,500	294,967	BC	40
C4M20T	15	4597,000	306,467	BC	43,33
G6M2T	15	4732,000	315,467	BC	41,67
C7M2T	15	4944,000	329,600	BC	43,33
C10M18T	15	4965,000	331,000	BC	45
G2M8M	15	5177,000	345,133	BC	46,67
G5M5T	15	5272,500	351,500	BC	46,67
G8M2T	15	5301,000	353,400	BC	53,33
C10M15T	15	5343,000	356,200	BC	51,67
G7M7M	15	5389,000	359,267	BC	48,33
C4M8T	15	5410,000	360,667	BC	50
C7M6M	15	6395,500	426,367	C	60

Anexo 4. Comparaciones múltiples por pares mediante la prueba de Dunn, para la variable altura en el ensayo de patogenicidad en plántulas de maíz.

Cepa	Frecuencia	Suma de rangos	Media de rangos	Grupos
C10M18T	15	666,000	44,400	A
C4M4M	15	1904,000	126,933	AB
G6M5M	15	2084,000	138,933	AB
C4M8T	15	2089,500	139,300	AB
G7M7M	15	2113,500	140,900	AB
G2M8M	15	2133,500	142,233	AB
C10M15T	15	2158,500	143,900	ABC
G5M5T	15	2316,500	154,433	ABCD
C10M8M	15	2426,000	161,733	ABCD
G5M8T	15	2491,000	166,067	ABCD
C1M19T	15	2531,500	168,767	ABCD
G6M2T	15	2602,500	173,500	ABCD
G4M1M	15	2654,000	176,933	ABCD
G8M2T	15	2680,500	178,700	ABCD
C7M6M	15	2802,000	186,800	ABCDE
C7M18T	15	2808,500	187,233	ABCDE
G6M6M	15	3010,500	200,700	ABCDE
C7M2T	15	3243,000	216,200	ABCDEF
C10M19M	15	3495,000	233,000	ABCDEF
C8M16T	15	4267,500	284,500	BCDEFGH
C4M20T	15	4514,500	300,967	BCDEFGH
C6M10T	15	4644,500	309,633	BCDEFGH
C10M10M	15	4661,000	310,733	BCDEFGH
G3M7T	15	4748,500	316,567	BCDEFGH
G6M10M	15	4866,500	324,433	BCDEFGH
G3M9T	15	5517,500	367,833	CDEFGH
C3M5T	15	5575,500	371,700	DEFGH
G5M9M	15	5581,500	372,100	DEFGH
G6M10T	15	6147,000	409,800	EFGH
C7M4T	15	6406,500	427,100	FGH
C8M8T	15	7010,000	467,333	GH
G1M5M	15	7015,500	467,700	GH
G4M3M	15	7033,000	468,867	GH
G7M4M	15	7052,000	470,133	GH
G1M7M	15	7134,500	475,633	GH
CONTROL	15	7684,500	512,300	H

Anexo 5. Comparaciones múltiples por pares mediante la prueba de Dunn, para la variable biomasa húmeda (g) en el ensayo de patogenicidad en plántulas de maíz.

Cepa	Frecuencia	Suma de rangos	Media de rangos	Grupos
C10M15T	15	379,000	25,267	A
G7M7M	15	404,000	26,933	A
C4M4M	15	675,000	45,000	AB
C4M8T	15	899,000	59,933	AB
G5M9M	15	1422,500	94,833	ABC
C7M18T	15	1781,500	118,767	ABC
G2M8M	15	2157,500	143,833	ABCD
G6M2T	15	2527,000	168,467	ABCDE
C4M20T	15	2716,000	181,067	ABCDEF
G5M8T	15	2890,000	192,667	ABCDEF
G5M5T	15	3026,000	201,733	ABCDEFG
C7M6M	15	3121,000	208,067	ABCDEFGH
C1M19T	15	3250,500	216,700	ABCDEFGHI
C8M16T	15	3314,500	220,967	ABCDEFGHI
C10M19M	15	3345,500	223,033	ABCDEFGHIJ
C10M8M	15	3471,500	231,433	ABCDEFGHIJ
C3M5T	15	3490,000	232,667	ABCDEFGHIJ
G6M5M	15	3590,500	239,367	ABCDEFGHIJ
G6M10T	15	3702,000	246,800	ABCDEFGHIJK
C10M18T	15	3798,000	253,200	BCDEFGHIJKL
G7M4M	15	3812,500	254,167	BCDEFGHIJKL
G6M6M	15	3840,500	256,033	BCDEFGHIJKL
G6M10M	15	4286,000	285,733	CDEFGHIJKLM
G8M2T	15	5234,500	348,967	DEFGHIJKLMN
C8M8T	15	5286,000	352,400	DEFGHIJKLMN
G3M7T	15	5755,500	383,700	EFGHIJKLMN
G3M9T	15	5966,000	397,733	FGHIJKLMN
G1M5M	15	6327,000	421,800	GHIJKLMN
C10M10M	15	6375,000	425,000	GHIJKLMN
C7M2T	15	6409,000	427,267	HIJKLMN
C7M4T	15	6562,500	437,500	IJKLMN
G4M1M	15	6709,000	447,267	JKLMN
G4M3M	15	6969,500	464,633	KLMN
CONTROL	15	7078,500	471,900	LMN
G1M7M	15	7645,500	509,700	MN
C6M10T	15	7852,000	523,467	N

Anexo 6. Comparaciones múltiples por pares mediante la prueba de Dunn, para la variable biomasa seca (g) en el ensayo de patogenicidad en plántulas de maíz.

Cepa	Frecuencia	Suma de rangos	Media de rangos	Grupos
G6M6M	15	1824,500	121,633	A
C4M20T	15	1894,000	126,267	A
G7M7M	15	2394,000	159,600	AB
C3M5T	15	2394,500	159,633	AB
G2M8M	15	2423,000	161,533	AB
G5M8T	15	2433,500	162,233	AB
C10M15T	15	2712,500	180,833	ABC
G8M2T	15	2753,000	183,533	ABC
C10M19M	15	2855,000	190,333	ABC
C10M18T	15	2939,000	195,933	ABCD
G6M5M	15	3032,500	202,167	ABCD
C7M6M	15	3091,000	206,067	ABCD
G5M5T	15	3198,000	213,200	ABCD
C10M10M	15	3260,500	217,367	ABCD
C4M8T	15	3282,500	218,833	ABCD
C1M19T	15	3546,500	236,433	ABCD
C8M16T	15	3758,000	250,533	ABCD
C6M10T	15	3788,000	252,533	ABCD
C7M2T	15	3922,500	261,500	ABCDE
G5M9M	15	4009,000	267,267	ABCDE
C4M4M	15	4029,000	268,600	ABCDE
G3M7T	15	4069,500	271,300	ABCDE
C7M18T	15	4164,000	277,600	ABCDE
G6M2T	15	4820,000	321,333	ABCDEF
G1M5M	15	4848,500	323,233	ABCDEF
G4M1M	15	5111,000	340,733	ABCDEF
C10M8M	15	5177,000	345,133	ABCDEF
G3M9T	15	5194,000	346,267	ABCDEF
G1M7M	15	5311,000	354,067	BCDEF
C7M4T	15	5461,000	364,067	BCDEF
G7M4M	15	5530,000	368,667	BCDEF
G4M3M	15	5578,000	371,867	BCDEF
G6M10M	15	6079,000	405,267	CDEF
C8M8T	15	6237,000	415,800	DEF
G6M10T	15	7267,500	484,500	EF
CONTROL	15	7682,000	512,133	F

Anexo 7. Comparaciones múltiples por pares mediante la prueba de Dunn, para la variable verdor de la planta (Evaluación 1) en el ensayo de patogenicidad en plántulas de maíz.

Cepa	Frecuencia	Suma de rangos	Media de rangos	Grupos
C4M4M	15	1784,000	118,933	A
C6M10T	15	2025,000	135,000	AB
G8M2T	15	2310,500	154,033	AB
G3M7T	15	2498,000	166,533	AB
C10M10M	15	2561,000	170,733	AB
G2M8M	15	2608,000	173,867	AB
C8M16T	15	2932,500	195,500	AB
C10M8M	15	3037,500	202,500	AB
C10M19M	15	3379,500	225,300	ABC
C4M8T	15	3428,500	228,567	ABC
C3M5T	15	3505,500	233,700	ABC
G4M1M	15	3519,500	234,633	ABC
C4M20T	15	3700,000	246,667	ABC
G7M7M	15	3802,000	253,467	ABC
G5M8T	15	3834,500	255,633	ABC
C8M8T	15	3950,000	263,333	ABC
G6M5M	15	4062,000	270,800	ABCD
G6M6M	15	4087,500	272,500	ABCD
C7M6M	15	4223,000	281,533	ABCD
G5M9M	15	4321,000	288,067	ABCD
G1M5M	15	4332,000	288,800	ABCD
C7M4T	15	4365,500	291,033	ABCD
G4M3M	15	4375,500	291,700	ABCD
G6M2T	15	4386,500	292,433	ABCD
G6M10M	15	4595,000	306,333	ABCD
C1M19T	15	4643,500	309,567	ABCD
C10M18T	15	4668,500	311,233	ABCD
G3M9T	15	4699,000	313,267	ABCD
G5M5T	15	4829,000	321,933	ABCD
C7M18T	15	4971,500	331,433	ABCD
C7M2T	15	5019,000	334,600	ABCD
G7M4M	15	5058,500	337,233	ABCD
G1M7M	15	5322,000	354,800	BCD
C10M15T	15	5360,000	357,333	BCD
G6M10T	15	6539,500	435,967	CD
CONTROL	15	7335,500	489,033	D

Anexo 8. Comparaciones múltiples por pares mediante la prueba de Dunn, para la variable verdor de la planta (Evaluación 2) en el ensayo de patogenicidad en plántulas de maíz

Cepa	Frecuencia	Suma de rangos	Media de rangos	Grupos
C10M10M	15	1512,000	100,800	A
G6M6M	15	1889,500	125,967	AB
C4M20T	15	2058,000	137,200	AB
C6M10T	15	2155,500	143,700	ABC
G3M7T	15	2247,500	149,833	ABCD
G5M8T	15	2269,500	151,300	ABCD
C4M8T	15	2370,500	158,033	ABCDE
G6M5M	15	2441,000	162,733	ABCDEF
C10M19M	15	2473,000	164,867	ABCDEF
C1M19T	15	2556,000	170,400	ABCDEFG
G7M7M	15	2670,500	178,033	ABCDEFG
G8M2T	15	2692,500	179,500	ABCDEFG
G3M9T	15	2765,500	184,367	ABCDEFG
C10M8M	15	2900,000	193,333	ABCDEFGH
C7M4T	15	2927,500	195,167	ABCDEFGH
G2M8M	15	2979,000	198,600	ABCDEFGH
G5M9M	15	3254,500	216,967	ABCDEFGHI
C4M4M	15	3450,500	230,033	ABCDEFGHI
G5M5T	15	3498,500	233,233	ABCDEFGHI
C8M16T	15	4644,500	309,633	ABCDEFGHIJ
G4M1M	15	4713,500	314,233	ABCDEFGHIJ
C7M6M	15	4943,500	329,567	BCDEFGHIJ
C3M5T	15	5013,000	334,200	BCDEFGHIJ
C8M8T	15	5245,000	349,667	BCDEFGHIJ
C7M2T	15	5494,000	366,267	CDEFGHIJ
G7M4M	15	5527,500	368,500	CDEFGHIJ
G6M10M	15	5565,500	371,033	DEFGHIJ
G4M3M	15	5732,500	382,167	EFGHIJ
G6M2T	15	5747,500	383,167	FGHIJ
C10M18T	15	5811,000	387,400	FGHIJ
G1M7M	15	5907,500	393,833	GHIJ
G1M5M	15	5917,000	394,467	GHIJ
C7M18T	15	5926,000	395,067	GHIJ
C10M15T	15	6187,500	412,500	HIJ
G6M10T	15	6620,500	441,367	IJ
CONTROL	15	7963,000	530,867	J

Anexo 9. Comparaciones múltiples por pares mediante la prueba de Dunn, para la variable verdor de la planta (Evaluación 3) en el ensayo de patogenicidad en plántulas de maíz.

Cepa	Frecuencia	Suma de rangos	Media de rangos	Grupos
C7M6M	15	2724,500	181,633	A
C10M10M	15	2814,000	187,600	A
C3M5T	15	3025,500	201,700	A
C4M8T	15	3071,500	204,767	A
C4M4M	15	3215,000	214,333	A
C6M10T	15	3281,000	218,733	A
G5M8T	15	3308,000	220,533	A
C7M18T	15	3427,500	228,500	A
G5M5T	15	3545,000	236,333	A
G8M2T	15	3545,500	236,367	A
G6M5M	15	3677,500	245,167	A
C10M18T	15	3798,000	253,200	A
G5M9M	15	3811,000	254,067	A
G4M1M	15	3859,500	257,300	A
C1M19T	15	3891,000	259,400	A
G1M7M	15	3911,500	260,767	A
G7M7M	15	3935,500	262,367	A
C4M20T	15	4043,500	269,567	A
G1M5M	15	4064,000	270,933	A
G7M4M	15	4099,500	273,300	A
C10M19M	15	4131,000	275,400	A
G3M9T	15	4148,500	276,567	A
G6M2T	15	4174,500	278,300	A
C8M16T	15	4226,000	281,733	A
G6M6M	15	4242,500	282,833	A
C7M4T	15	4243,500	282,900	A
G2M8M	15	4333,000	288,867	A
G6M10T	15	4381,500	292,100	A
G3M7T	15	4491,000	299,400	A
C8M8T	15	4500,000	300,000	A
C10M8M	15	4503,000	300,200	A
G6M10M	15	4688,000	312,533	AB
C7M2T	15	4779,000	318,600	AB
G4M3M	15	4798,000	319,867	AB
C10M15T	15	5422,000	361,467	AB
CONTROL	15	7960,000	530,667	B

Anexo 10. Comparaciones múltiples por pares mediante la prueba de Dunn, para la variable verdor de la planta (Evaluación 4) en el ensayo de patogenicidad en plántulas de maíz.

Cepa	Frecuencia	Suma de rangos	Media de rangos	Grupos
C1M19T	15	1529,000	101,933	A
C10M10M	15	1570,000	104,667	A
C7M6M	15	2472,500	164,833	AB
G8M2T	15	2473,000	164,867	AB
G2M8M	15	2708,500	180,567	AB
C4M4M	15	2933,000	195,533	AB
G4M1M	15	2984,500	198,967	AB
C4M8T	15	3035,500	202,367	AB
C6M10T	15	3138,500	209,233	AB
G3M9T	15	3146,500	209,767	AB
C10M8M	15	3179,000	211,933	AB
G5M5T	15	3315,000	221,000	AB
G6M6M	15	3376,000	225,067	AB
C10M18T	15	3460,000	230,667	AB
C10M19M	15	3559,500	237,300	ABC
G5M9M	15	3564,500	237,633	ABC
G3M7T	15	3675,000	245,000	ABC
C7M18T	15	3889,000	259,267	ABC
C4M20T	15	4048,000	269,867	ABC
G6M5M	15	4135,000	275,667	ABC
G6M10M	15	4425,500	295,033	ABC
G1M5M	15	4607,500	307,167	ABC
C8M8T	15	4610,000	307,333	ABC
C3M5T	15	4889,500	325,967	ABC
G7M4M	15	5009,500	333,967	BC
G6M2T	15	5043,000	336,200	BC
G5M8T	15	5106,000	340,400	BC
G7M7M	15	5147,500	343,167	BC
C10M15T	15	5188,000	345,867	BC
G6M10T	15	5236,500	349,100	BC
G4M3M	15	5276,500	351,767	BC
G1M7M	15	5435,000	362,333	BC
C7M2T	15	5670,000	378,000	BC
C7M4T	15	5685,500	379,033	BC
C8M16T	15	5711,500	380,767	BC
CONTROL	15	6836,500	455,767	C

Anexo 11. Comparaciones múltiples por pares mediante la prueba de Dunn, para la variable verdor de la planta (Evaluación 5) en el ensayo de patogenicidad en plántulas de maíz.

Cepa	Frecuencia	Suma de rangos	Media de rangos	Grupos
C4M4M	15	2347,500	156,500	A
C10M10M	15	2480,500	165,367	A
C6M10T	15	2894,500	192,967	AB
G1M5M	15	2966,500	197,767	AB
G6M10M	15	3124,500	208,300	AB
C1M19T	15	3223,000	214,867	AB
G7M7M	15	3311,000	220,733	AB
C7M4T	15	3320,500	221,367	AB
G6M6M	15	3348,000	223,200	AB
G1M7M	15	3418,000	227,867	AB
G5M9M	15	3428,500	228,567	AB
G8M2T	15	3477,500	231,833	ABC
G5M8T	15	3498,500	233,233	ABC
C7M2T	15	3588,000	239,200	ABC
C10M19M	15	3612,000	240,800	ABC
C8M8T	15	3796,500	253,100	ABC
C4M20T	15	3907,000	260,467	ABC
G6M5M	15	3963,500	264,233	ABC
C10M15T	15	3970,500	264,700	ABC
G3M7T	15	3989,000	265,933	ABC
G4M1M	15	4181,500	278,767	ABC
C7M6M	15	4441,000	296,067	ABC
G3M9T	15	4456,000	297,067	ABC
G5M5T	15	4470,500	298,033	ABC
C7M18T	15	4479,500	298,633	ABC
G4M3M	15	4528,500	301,900	ABC
G7M4M	15	4546,000	303,067	ABC
G6M2T	15	4688,000	312,533	ABC
C4M8T	15	4731,000	315,400	ABC
C10M18T	15	4735,500	315,700	ABC
G2M8M	15	4858,000	323,867	ABC
C10M8M	15	4886,000	325,733	ABC
C3M5T	15	5033,000	335,533	ABC
CONTROL	15	5319,000	354,600	ABC
C8M16T	15	6240,000	416,000	BC
G6M10T	15	6811,500	454,100	C