



UNIVERSIDAD  
**NACIONAL**  
DE COLOMBIA

# **Etiología de la pudrición del tallo del maíz (*Zea mays* L.) en el trópico frío Colombiano, el caso del valle de Ubaté**

**Germán Yesid Maldonado Archila**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias Agrarias, Departamento de Agronomía  
Bogotá, Colombia

2019



# **Etiología de la pudrición del tallo del maíz (*Zea mays* L.) en el trópico frío Colombiano, el caso del valle de Ubaté**

**Germán Yesid Maldonado Archila**

Tesis o trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al título  
de:

**Magister en Ciencias Agrarias**

Director (a):

Ingeniera Agrónoma, M. Sc. Ph. D Sandra Gómez Caro

Codirector (a):

Ingeniero Agrónomo, M. Sc. Ph. D Gustavo Adolfo Ligarreto Moreno

Línea de Investigación:

Fitopatología

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias Agrarias, Departamento de Agronomía

Bogotá, Colombia

2019



*A mi madre Gloria, a mi padre Germán, a mis hermanas Andrea y Sarah, a mis amigos, a mis maestros de vida y escuela, a mis gatos...sin ninguno de ustedes, sin su cariño, sus enseñanzas y consejos no habría tenido la fuerza suficiente y el ánimo para seguir adelante ante el siempre cambiante caleidoscopio de la vida...*

*"I am pessimistic about humanity because it is too ingenious for its own good. Our approach to the nature is to beat it into submission. We would stand a better chance of survival if we accommodated ourselves to this planet and viewed it appreciatively instead of skeptically and dictatorially"*

**Elwyn Brooks White**

*"Concern for man and his fate must always form the chief interest of all technical endeavors. Never forget this in the mist of your diagrams and equations"*

**Albert Einstein**

*"After of all that's what plant pathology is all about - helping people"*

**David Thurston**



## Agradecimientos

Es difícil imaginar lo útil que puede ser un café y como las ideas pueden surgir de la más inusitada y desprevenida conversación. Es también difícil recordar todas las personas que participaron de una u otra manera en la planeación, ejecución y finalización de este trabajo, sin embargo, quiero hacer un especial reconocimiento a la profesora Sandra Gómez Caro, por su paciencia, guía, comprensión y apoyo en momentos clave de la investigación, por creer en mí y por su valiosa amistad, al profesor Gustavo Adolfo Ligarreto Moreno, líder del proyecto macro dentro del cual esta tesis fue desarrollada, por su guía, orientación y voto de confianza para hacer parte de su equipo de trabajo. A las profesoras Celsa García Domínguez, Adriana González Almario y Nancy Eunice Niño Castañeda por sus valiosos puntos de vista, su disposición y orientación en el trabajo de laboratorio e interpretación biológica de los datos. A la profesora María Isabel Chacón Sánchez por su orientación en la interpretación de los análisis filogenéticos de identificación de especies.

A la profesora Sandra Esperanza Melo Martínez, por su valiosa ayuda en el tratamiento estadístico de los datos y su interpretación, al profesor Jesús Efrén Ospina Noñera y Andrés Leonardo Leguizamón García por la valiosa construcción de la información climatológica base de este estudio, por su ayuda y orientación. A los profesionales de campo Saúl Roberto Murcia López, Luis Daniel Pinzón Sierra, Sergio Fabián Bustos Cardona, por el manejo agronómico, toma de datos y muestras de las parcelas

experimentales establecidas en Simijaca, sin su constancia, disciplina y compromiso, nada de esto habría sido posible.

Un reconocimiento también a Natalia Piñeros Guerrero, por su valioso apoyo en las actividades propias del laboratorio e invernadero y por desarrollar su tesis de pregrado derivada de esta investigación bajo mi acompañamiento y supervisión. A Jesús Alberto León Hoyos, analista de la Clínica de Plantas infinitas gracias por sus invaluable consejos, experiencia, puntos de vista y amistad incondicional.

A Rubén Darío Cruz Torres laboratorista del laboratorio de sanidad vegetal y Fabio Enrique Rincón García laboratorista del laboratorio de Fisiología vegetal por su siempre atenta disposición y ayuda técnica y operativa en los laboratorios. Un especial agradecimiento a Christian Camilo Pimentel Ladino, Alefsi David Sánchez Reinoso, Diana Marcela Sánchez Guio, Nixon Florez Velazco, Evelyn Gisela Arenas Ochoa quienes conformaron el grupo profesional de apoyo administrativo y técnico del proyecto, por su ayuda en el establecimiento de los ensayos, toma de datos, toma de muestras, valiosas ideas y puntos de vista. A Mateo Osorio Tamayo y Ricardo Antonio Ruíz por su ayuda en la toma de muestras, datos y cuidado de ensayos en invernadero.

A los agricultores Oscar Reina, Francisco Cristancho, Antonio Forero y Edgar Aguilar por permitirnos establecer las parcelas experimentales de campo en sus fincas, por su siempre atenta disposición y colaboración. Finalmente gracias al Sub-proyecto "*Mejoramiento de la competitividad de los cultivos de frijol y maíz en las regiones de Ubaté y el Guavio en el departamento de Cundinamarca*" enmarcado en el proyecto del Corredor tecnológico agroindustrial Bogotá-Cundinamarca CTA-2 "*Investigación, desarrollo y transferencia*

*tecnológica en el sector agropecuario y agroindustrial con el fin de mejorar todo el departamento, Cundinamarca, Centro oriente”* el cual financió este trabajo de investigación con recursos del Sistema General de Regalías, de la secretaria de Ciencia y Tecnología del Departamento de Cundinamarca, la Secretaria Distrital de Desarrollo Económico de Bogotá, D.C y contrapartidas de la Universidad Nacional de Colombia y la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria CORPOICA.

## Resumen

En años recientes los cultivos de maíz de la zona del valle de Ubaté vienen siendo afectados por una pudrición del tallo que produce el volcamiento de las plantas lo cual ha incidido negativamente en los rendimientos y siembra de esta especie en la zona. Por esto, el objetivo de este trabajo fue identificar el agente causal de la pudrición del tallo de maíz en el valle de Ubaté, determinar los aspectos etiológicos más importantes de la enfermedad y evaluar el efecto del manejo del potencial de inóculo sobre la enfermedad, el crecimiento y rendimiento del cultivo. En este estudio las variedades regionales de maíz Simijaca y Sogamoso fueron susceptibles a la pudrición del tallo. Los agentes causales de esta pudrición correspondieron a *Fusarium graminearum* (*Fusarium graminearum* species complex) (FGSC) y *Fusarium subglutinans* (*Fusarium fujikouii* species complex) (FFSC). El inóculo de *F. graminearum* (FGSC) fue detectado en los residuos de cosecha de maíz en pie, aire y semilla en tanto que, el inóculo de *F. subglutinans* fue encontrado en semilla y detritos del cultivo presentes en el suelo. Se observó que la planta de maíz es colonizada por *F. graminearum* y *F. subglutinans* desde la semilla y que la frecuencia de ambas especies se incrementa según el avance del ciclo del cultivo. La inoculación individual de *F. graminearum* y *F. subglutinans* generó plantas de mayor longitud, pero con reducido diámetro del tallo con respecto a la inoculación conjunta de ambas especies. A nivel histológico, se observaron acumulaciones de lignina en el tallo de plantas de maíz crecidas en suelo naturalmente infestado por *Fusarium* spp. En campo, mayor incidencia de pudrición del tallo y posterior volcamiento se asoció con episodios de limitada disponibilidad de agua y temperaturas inferiores a 10 °C hasta por seis horas. Los eventos de volcamiento se manifestaron uno o dos meses después del episodio de estrés dependiendo de la intensidad y estado de desarrollo del cultivo en el cual fue afectado.

Los resultados indican que, mayores valores de altura de la planta y diámetro del tallo se obtuvieron en lotes con historial de rotación, intermedios donde se retiraron los residuos de cosecha y bajos donde se mantuvieron. Por su parte, la incidencia de la pudrición del tallo y el diámetro de la mazorca fue mayor donde se dejaron los residuos de cosecha, intermedia donde se retiraron y baja en la rotación. El historial del lote del cultivo y los tratamientos térmicos a la semilla de forma individual no tuvieron efecto significativo sobre el porcentaje de volcamiento. Sin embargo, el tratamiento a la semilla por calor seco a 50 °C en el lote de rotación presentó menores porcentajes de incidencia y posterior volcamiento con una reducción neta del 54%. Finalmente, en cuanto al rendimiento, la rotación de cultivos redujo el número de mazorcas pese a que se obtuvieron mayores valores de altura y diámetro del tallo en este historial del lote del cultivo. Los lotes con historial maíz-maíz con o sin residuos de cosecha obtuvieron el doble de la producción destacando la importancia de la asociación del maíz variedad regional Simijaca con *F. graminearum* (FGSC) y *F. subglutinans* (FFSC) en el valle de Ubaté. Los resultados obtenidos permitieron la comprensión integral del volcamiento de maíz en el valle de Ubaté y son un aporte para el diseño de propuestas de manejo de la enfermedad las cuales deben estar enmarcadas en análisis de riesgo para el sistema de producción de maíz de clima frío.

**Palabras clave:** *Zea mays* L., *Fusarium graminearum*, *Fusarium graminearum* species complex (FGSC), *Fusarium subglutinans*, *Fusarium fujikuroi* species complex (FFSC), pudrición del tallo de maíz, volcamiento, variabilidad climática, *fitness*, rotación de cultivos, residuos de cosecha, tratamientos de semilla.

## Abstract

In recent years, maize crops in the Ubaté valley have been affected by stalk rot that causes plant lodging, which has had a negative impact on the yields and planting of this crop in the area. Therefore, the objectives of this work were to identify the causal agent of maize stalk rot in the Ubaté valley, determine the most important etiological aspects of the disease, and evaluate the effect of the inoculum potential management on disease development, and crop growth and yield. In this study the regional maize varieties Simijaca and Sogamoso were susceptible to stalk rot. The causal agents corresponded to *Fusarium graminearum* (*Fusarium graminearum* species complex) (FGSC) and *Fusarium subglutinans* (*Fusarium fujikuroi* species complex) (FFSC). The inoculum of *F. graminearum* was detected in standing crop debris, in the air and seeds, whereas *F. subglutinans* inoculum was found in seeds and crop debris present in the soil. It was observed that corn plants were colonized by *F. graminearum* and *F. subglutinans* from the seed and the frequency of both species increased as the crop cycle progressed. Individual *F. graminearum* and *F. subglutinans* inoculation generated taller plants but with reduced stem diameter compared to the joint inoculation of both species. At histological level, lignin accumulations were observed in the stem of maize plants grown in naturally infested soil by *Fusarium* spp. In the field, higher stalk rot incidence and subsequent lodging were associated with episodes of limited water supplies and temperatures below 10°C for up to six hours. Lodging events manifested one or two months after the stress episode depending on the intensity and crop development status. The results indicated that higher values of plant height and stem diameter were obtained in plots with a history of crop rotation, whereas intermediate ones were observed under crop residues removal, and low

values were obtained in places where debris was kept. On the other hand, stalk rot incidence and cob diameter were higher in the places where crop residues were left, whereas intermediate values of these variables were obtained where debris was removed and in plots with low crop rotation. The history of the crop lot and seed treatments did not have a significant effect on the lodging percentage individually. However, seed treatment with dry heat at 50°C in the plot with crop rotation showed lower incidence and lodging percentages with a net reduction of 54%. Finally, regarding yield, crop rotation reduced the number of ears despite the fact that higher height and stem diameter values were obtained in this history of the crop plot. Plots with maize-maize history with or without crop debris obtained twice the production, highlighting the importance of the association of the Simijaca regional variety with *F. graminearum* (FGSC) and *F. subglutinans* (FFSC) in the Ubate valley. The obtained results allowed the compressive understating of maize lodging in the Ubate valley and are a contribution to the design of disease management proposals which should consider the risk analysis for maize production systems in cold weather.

**Key words:** *Zea mays* L., *Fusarium graminearum*, *Fusarium graminearum* species complex (FGSC), *Fusarium subglutinans*, *Fusarium fujikuroi* species complex (FFSC), maize stalk rot, lodging, climate variability, *fitness*, crop rotation, crop debris, seed treatments



# Contenido

|  |          |
|--|----------|
| Resumen .....  | X        |
| Lista de figuras.....  | XVIII    |
| Lista de tablas .....  | XXIV     |
| Lista de Símbolos y abreviaturas.....  | XXV      |
| Introducción general .....   | 1        |
| Objetivos.....   | 6        |
| <b>1. Capítulo I: Identificación del agente causal de la pudrición del tallo del maíz (<i>Zea mays</i> L.) en el valle de Ubaté.....</b> | <b>9</b> |
| 1.1 Resumen.....   | 9        |
| 1.2 Introducción.....  | 10       |
| 1.3 Metodología .....  | 17       |
| 1.3.1 Síntomas y signos asociados a la pudrición del tallo en dos variedades regionales .....  | 17       |
| 1.3.2 Obtención de aislamientos a partir de plantas adultas de maíz.....   | 17       |
| 1.3.3 Identificación morfológica de aislamientos de <i>Fusarium</i> spp. obtenidos de plantas adultas de maíz.....                       | 19       |
| 1.3.4 Identificación molecular de aislamientos de <i>Fusarium</i> spp. obtenidos de plantas adultas de maíz .....                        | 21       |
| 1.3.5 Prueba de patogenicidad de <i>F. graminearum</i> y <i>F. subglutinans</i> en plantas de maíz variedad regional Simijaca.....       | 22       |
| 1.4 Resultados .....   | 25       |
| 1.4.1 Síntomas y signos asociados a la pudrición del tallo en dos variedades regionales .....  | 25       |
| 1.4.2 Obtención de aislamientos a partir de plantas adultas de maíz.....   | 27       |
| 1.4.3 Identificación morfológica de aislamientos de <i>Fusarium</i> spp. obtenidos de plantas adultas de maíz.....                       | 29       |
| 1.4.4 Identificación molecular de aislamientos de <i>Fusarium</i> spp. obtenidos de plantas adultas de maíz .....                        | 33       |
| 1.4.5 Prueba de patogenicidad de <i>F. graminearum</i> y <i>F. subglutinans</i> en plantas de maíz variedad regional Simijaca.....       | 37       |
| 1.5 Discusión .....  | 39       |
| 1.6 Conclusiones.....  | 45       |
| 1.7 Bibliografía .....   | 46       |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>2. Capítulo II: Asociación <i>Fusarium graminearum</i> y <i>Fusarium subglutinans</i> - maíz (<i>Zea mays</i> L.) bajo condiciones del valle de Ubaté .....</b>   | <b>52</b> |
| 2.1 Resumen .....  | 52        |
| 2.2 Introducción .....   | 53        |
| 2.3 Metodología .....  | 58        |
| 2.3.1 Sintomatología y aislamientos de <i>Fusarium</i> spp. a partir de semilla de maíz  | 58        |
| 2.3.2 Aislamientos de <i>Fusarium</i> spp. asociados a la pudrición del tallo de maíz a partir de suelo .....  | 58        |
| 2.3.3 Aislamientos de <i>Fusarium</i> spp. asociados a la pudrición del tallo de maíz a partir de detritos .....   | 59        |
| 2.3.4 Aislamientos de <i>Fusarium</i> spp. asociados a la pudrición del tallo de maíz a partir de aire .....   | 60        |
| 2.3.5 Frecuencia de aislamiento de <i>Fusarium graminearum</i> y <i>F. subglutinans</i> durante el ciclo del cultivo .....   | 61        |
| 2.3.6 Efecto de la inoculación de <i>Fusarium</i> spp. en el crecimiento y desarrollo de maíz  | 61        |
| 2.3.7 Efecto de la infección de <i>Fusarium</i> spp. sobre la lignificación del tallo de maíz  | 63        |
| 2.3.8 Detección de fumonisinas y deoxinivalenol en semillas de maíz .....  | 64        |
| 2.3.9 Condiciones climáticas y de paisaje en el valle de Ubaté y su relación con eventos de pudrición del tallo de maíz .....  | 65        |
| 2.4 Resultados .....   | 66        |
| 2.4.1 Sintomatología y aislamientos de <i>Fusarium</i> spp. a partir de semilla de maíz  | 66        |
| 2.4.2 Aislamientos de <i>Fusarium</i> spp. asociados a la pudrición del tallo de maíz a partir de suelo .....  | 67        |
| 2.4.3 Aislamientos de <i>Fusarium</i> spp. asociados a la pudrición del tallo de maíz a partir de detritos .....   | 68        |
| 2.4.4 Aislamientos de <i>Fusarium</i> spp. asociados a la pudrición del tallo de maíz a partir de aire .....   | 69        |
| 2.4.5 Frecuencia de aislamiento de <i>Fusarium graminearum</i> y <i>F. subglutinans</i> durante el ciclo del cultivo .....   | 70        |
| 2.4.6 Efecto de la inoculación de <i>Fusarium</i> spp. en el crecimiento y desarrollo de maíz  | 71        |
| 2.4.7 Efecto de la infección de <i>Fusarium</i> spp. sobre la lignificación del tallo de maíz  | 73        |
| 2.4.8 Detección de fumonisinas y deoxinivalenol en semillas de maíz .....  | 75        |
| 2.4.9 Condiciones climáticas y de paisaje en el valle de Ubaté y su relación con eventos de pudrición del tallo de maíz .....  | 75        |
| 2.5 Discusión .....  | 81        |
| 2.6 Conclusiones .....   | 88        |
| 2.7 Bibliografía .....   | 90        |
| <b>3. Capítulo III: Efecto del potencial de inóculo de <i>Fusarium graminearum</i> y <i>Fusarium subglutinans</i> en semilla y residuos de cosecha sobre la pudrición del tallo, volcamiento, crecimiento y rendimiento de plantas de maíz de clima frío (<i>Zea mays</i> L.) en el valle de Ubaté .....</b> | <b>96</b> |
| 3.1 Resumen .....  | 96        |
| 3.2 Introducción .....   | 97        |
| 3.3 Metodología .....  | 101       |
| 3.3.1 Tratamientos evaluados .....   | 101       |

---

|           |  |            |
|-----------|--|------------|
| 3.3.2     | Montaje de los ensayos en campo.....   | 102        |
| 3.3.3     | VARIABLES AVALUADAS .....  | 102        |
| 3.3.4     | Diseño experimental .....  | 103        |
| 3.4       | Resultados .....   | 105        |
| 3.4.1     | Efecto de tratamiento de semillas, manejo de residuos e historial del lote del cultivo sobre la pudrición del tallo y volcamiento de maíz variedad regional Simijaca<br>105  |            |
| 3.4.2     | Efecto de tratamiento de semillas, manejo de residuos e historial del lote del cultivo sobre el establecimiento del cultivo, parámetros de crecimiento, desarrollo y componentes de rendimiento de maíz variedad regional Simijaca ..... | 111        |
| 3.5       | Discusión .....  | 118        |
| 3.6       | Conclusiones.....  | 125        |
| 3.7       | Bibliografía .....   | 126        |
| <b>4.</b> | <b>Discusión general .....</b>   | <b>131</b> |
| <b>5.</b> | <b>Conclusiones y recomendaciones.....</b>   | <b>141</b> |
| 5.1       | Conclusiones generales .....   | 141        |
| 5.2       | Recomendaciones.....   | 144        |
| <b>6.</b> | <b>Bibliografía .....</b>  | <b>147</b> |

## Lista de figuras

- Figura 1-1.** Sintomatología externa en plantas de maíz variedad regional Simijaca tres meses después de siembra, en Simijaca (Cundinamarca, Colombia) durante el segundo semestre de 2016. A) clorosis apical de las hojas. B) antocianescencia en hojas. C) enanismo de la planta. (Fotografías: Alefsi David Sánchez Reinoso).....25
- Figura 1-2.** Sintomatología interna del tallo en corte longitudinal de plantas de maíz variedad regional Simijaca, durante el segundo semestre de 2016 en Simijaca (Cundinamarca, Colombia). A) planta sana tres meses después de siembra (V9). B) necrosis en cuello y nudos tres meses después de siembra (V9). C) avance de la lesión desde los nudos hacia los entrenudos cuatro meses después de siembra (VT). D) pudrición y desintegración de la base del tallo cinco meses después de siembra (R1). .....26
- Figura 1-3.** Corte longitudinal de una planta de maíz variedad regional Simijaca dos meses después de siembra (V6) la cual presentaba síntomas de pudrición del tallo en un lote ubicado en Simijaca (Cundinamarca, Colombia) durante el primer semestre de 2017 donde se aprecia: A) diseminación de la enfermedad por medio de los nudos en plantas de maíz y B) acercamiento de la zona meristemática. ....26
- Figura 1-4.** Peritecios de *Fusarium graminearum* (FGSC) sobre los residuos de cosecha de maíz variedad regional Simijaca durante el segundo semestre de 2016 en lotes en Simijaca (Cundinamarca, Colombia). A y B) peritecios asociados al nudo. C) observación de peritecios en corte a mano alzada. D) peritecio liberando asca con ascosporas en formación. E) detalle de un asca con ascosporas maduras dentro.....27
- Figura 1-5.** Porcentaje de aislamiento de colonias tipo *Fusarium* spp. A) por variedad de maíz y B) origen de explante en estados de desarrollo de tres, seis, nueve hojas verdaderas (V3, V6, V9) y espigamiento (VT) a los 30, 60, 90 y 120 días después de siembra respectivamente. ....28
- Figura 1-6.** Apariencia de aislamientos tipo de tres especies de *Fusarium* aislados a partir de maíz en cuatro medios de cultivo siete días después de siembra. De arriba hacia abajo: *F. graminearum* (FGSC) (26B), *F. subglutinans* (FFSC) (45D) y *F. oxysporum* (61A). De izquierda a derecha, PDA: Potato Dextrose Agar, CLA: Carnation Leaf Agar, SNA: Spezieller Nährstoffarmer Agar y WA: Water Agar.....29
- Figura 1-7.** Características morfológicas de *Fusarium graminearum* (FGSC) aislamiento 26B. A) derecha: apariencia de la colonia e izquierda: pigmentación del reverso de la caja Petri en medio PDA quince días después de siembra. B) esporodocios de color marrón en medio CLA. C) peritecios in situ en medio CLA. D) macroconidias en medio CLA con cinco a seis septos. PDA: *Potato Dextrose Agar*, CLA: *Carnation Leaf Agar*. ....30
- Figura 1-8.** Características morfológicas de *Fusarium subglutinans* (FFSC) aislamiento 45D. A) derecha: apariencia de la colonia e izquierda: pigmentación del reverso de la caja

Petri en medio PDA quince días después de siembra. B) esporodoquios de color naranja en medio CLA. C) macroconidias típicas del complejo fujikuroi y microconidias ovales y usualmente sin septos. D) microconidias in situ en medio CLA formando falsas cabezas. PDA: *Potato Dextrose Agar*, CLA: *Carnation Leaf Agar*..... 31

**Figura 1-9.** Curva de crecimiento radial de *F. graminearum* (FGSC), *F. subglutinans* (FFSC) y *F. oxysporum*, obtenido a partir de maíz variedad regional Simijaca en medio: A) Potato Dextrose Agar (PDA). B) Carnation Leaf Agar (CLA). C) Spezieller Nährstoffarmer Agar (SNF) y D) Water Agar (WA). Las curvas representan el promedio de al menos 18 monospóricos de cada especie. Las colonias fueron incubadas a 25 °C con fotoperiodo de 12:12 horas luz: oscuridad por 10 días. Letras diferentes indican diferencias estadísticas (Tukey  $p < 0,05$ )..... 31

**Figura 1-10.** Area Bajo la Curva de Crecimiento Micelial (AUMGC) de *F. graminearum* (FGSC), *F. subglutinans* (FFSC) y *F. oxysporum*, aislados a partir de plantas de maíz variedad regional Simijaca en medio: A) *Potato Dextrose Agar* (PDA). B) *Carnation Leaf Agar* (CLA). C) *Spezieller Nährstoffarmer Agar* (SNA) y D) *Water Agar* (WA). Letras diferentes indican diferencias estadísticas (Tukey  $p < 0,05$ )..... 32

**Figura 1-11.** Árbol filogenético (*Neighbor-joining*) de la región intergénica ribosomal (ITS) construido con la base de datos Ribosomal *Database Project* de los aislamientos fúngicos 26B y 45D. .... 34

**Figura 1-12.** Árbol filogenético (*Neighbor-joining*) del factor de elongación 1- $\alpha$  (EF1) construido de los aislamientos fúngicos de *Fusarium* spp. 26B y 45D..... 36

**Figura 1-13.** Sintomatología en cortes longitudinales de plantas de maíz variedad regional Simijaca inoculadas con dos especies de *Fusarium* y su combinación tres meses después de siembra (V9) bajo condiciones de invernadero. A) plantas inoculadas con la mezcla *F. subglutinans* (FFSC) y *F. graminearum* (FGSC). B) *F. graminearum*. C) *F. subglutinans* D) control absoluto (semillas sin tratamiento) y E) control térmico (semillas tratadas con agua caliente a 52 °C)..... 37

**Figura 1-14.** Incidencia de sintomatología en el tallo y porcentaje de aislamiento de *F. graminearum* (FGSC) y *F. subglutinans* (FFSC) en medio PDA-BOA, de plantas de maíz variedad regional Simijaca inoculadas con *F. graminearum* (FGSC), *F. subglutinans* (FFSC) y la combinación, tres meses después de siembra respecto al control absoluto y térmico. .... 38

**Figura 2-1.** Sintomatología en semillas y plántulas de la variedad regional Simijaca bajo condiciones de test de Blotter diez días después de siembra. A) colonias del género *Fusarium* spp. sobre la semilla. B) raíces púrpura. C) avance de la lesión en corte longitudinal del mesocotilo. D) aislamiento de colonias de *Fusarium* spp. a partir de explantes de raíces de maíz variedad regional Simijaca sobre medio PDA-BOA cinco días después de siembra (Fotografía: Natalia Piñeros Guerrero)..... 66

**Figura 2-2.** Captura de *Fusarium subglutinans* (FFSC) a partir de suelo con historial de pudrición del tallo mediante cebos de hojas de clavel. A) colonización micelial y formación de esporodoquios de color salmón sobre suelo de Simijaca con historial de pudrición del tallo 30 días después del montaje. B) suelo de uso no agrícola +hojas de clavel. C) suelo con historial de pudrición del tallo + hojas de clavel, y D) aislamiento directo de *F.*

- subglutinans* en medio PDA-BOA a partir del micelio crecido sobre las hojas de clavel cinco días después de siembra. .... 67
- Figura 2-3.** Aislamiento de *F. subglutinans* (FFSC) a partir de detritos de residuos de cosecha. A) suelo de lotes comerciales de maíz con historial de pudrición del tallo, B) apariencia de las colonias a partir de detritos sobre medio PDA-BOA diez días después de siembra. C) macroconidias típicas del complejo *fujikuroi* y microconidias ovales y usualmente sin septos en medio CLA. D) microconidias *in situ* formando falsas cabezas en medio CLA. .... 68
- Figura 2-4.** Aislamiento de *F. graminearum* (FGSC) a partir de aire sobre medio BOA. A) espora germinando de *Fusarium* sp. sobre medio agar-agua 24 horas después de la captura. B) trampa de captura de medio agar-agua con colonias crecidas de *Fusarium* spp. diez días después de la captura y sembrada sobre medio BOA. C) crecimiento de colonias fúngica de *Fusarium* sp. sobre medio BOA quince días después de siembra a  $\pm 25$  °C y D) aislamientos de *F. graminearum* a partir de siembra directa de la colonia crecida sobre medio BOA en medio PDA-BOA diez días después de siembra a  $\pm 25$  °C. .... 69
- Figura 2-5.** Dinámica de la frecuencia de *F. subglutinans* (FFSC) y *F. graminearum* (FGSC) en distintos estados fenológicos del cultivo de maíz variedad regional Simijaca. VE: Emergencia; V3, V6 y V9, tres, seis y nueve hojas verdaderas respectivamente; VT: espigamiento. .... 70
- Figura 2-6.** Efecto de la inoculación de *F. graminearum* (FGSC), *F. subglutinans* (FFSC) y su combinación sobre la longitud de la planta (n = 40) de maíz variedad regional Simijaca, tres meses después de siembra (V9) respecto al control absoluto y térmico. Letras diferentes denotan diferencia estadística ( $p < 0,05$ ) según Tukey. .... 72
- Figura 2-7.** Efecto de la inoculación de *Fusarium* spp. sobre el canopi (imágenes superiores) y vigor (imágenes inferiores) de plantas de maíz variedad regional Simijaca tres meses después de siembra. A) control absoluto: plantas provenientes de semillas usadas por agricultores naturalmente infestada con *Fusarium* spp. B) control térmico: plantas provenientes de semillas desinfectadas por medio de calor. C) plantas inoculadas con *F. subglutinans* (FFSC). D) plantas inoculadas con *F. graminearum* (FGSC). E) plantas inoculadas con ambas especies de *Fusarium*. .... 73
- Figura 2-8.** Efecto de la asociación entre *Fusarium* spp. y maíz variedad regional Simijaca sobre la acumulación de lignina en el tallo 35 días después de siembra evaluada mediante la tinción de Weisner. A) plantas libres de patógeno en suelo y semillas. B) plantas provenientes de semillas usada por agricultores naturalmente infestada con *Fusarium* spp. y sembradas en suelo sin uso agrícola. C) plantas sin inóculo en la semilla y puestas a crecer en suelo con historial de pudrición del tallo y D) plantas provenientes de semillas usadas por los agricultores y sembradas en suelo con historial de pudrición del tallo. X: vasos conductores, RA: raíces adventicias. Las flechas indican la acumulación de lignina en la parte exterior del tallo en forma de anillo. .... 74
- Figura 2-9.** Comportamiento de variables climáticas desde mayo de 2016 a septiembre de 2017 en el municipio de Simijaca, Cundinamarca con respecto a datos históricos de 30 años para esta localidad. A) precipitación acumulada por mes. B) humedad relativa promedio por mes. C) temperatura máxima promedio por mes. D) temperatura mínima

promedio por mes. E) delta de temperatura calculado como la diferencia entre la temperatura máxima y mínima y F) velocidad del viento promedio por mes..... 76

**Figura 2-10.** Comportamiento de la temperatura mínima y horas frío por día desde mayo de 2016 a agosto de 2017 en el municipio de Simijaca, Cundinamarca. Las flechas rojas indican eventos de frío de alta intensidad (temperatura mínima inferior a 10 °C por más de diez horas). Datos de clima obtenidos con estaciones meteorológicas iMETOS® en lotes comerciales de maíz..... 77

**Figura 2-11.** Volcamiento en campos de maíz variedad regional Simijaca sembrados en el municipio de Simijaca (Cundinamarca) durante 2016. A) lote de cinco meses sembrado en marzo el cual estuvo expuesto a varios episodios intensos de frío entre junio y agosto de 2016 el cual se volcó tarde en el ciclo del cultivo (VT), (Fotografía: Alefsi David Sánchez Reinoso). B) lote de tres meses sembrado en septiembre de 2016, el cual estuvo expuesto a varios episodios intensos de frío desde la siembra hasta diciembre y se volcó de forma temprana en el ciclo del cultivo (V9). ..... 78

**Figura 2-12.** Comportamiento de la temperatura mínima promedio por mes, horas frío promedio por día y la precipitación acumulada desde mayo de 2016 a septiembre de 2017 en el municipio de Simijaca, Cundinamarca. .... 79

**Figura 2-13.** Plantas asintomáticas de maíz sembrado en el Centro Agropecuario Marengo (CAM) y el municipio de Gama (Cundinamarca) durante mayo de 2017. A y B) plantas sembradas en CAM. A) variedad ICA 508. B) variedad regional Simijaca. C y D) plantas sembradas en Gama. C) variedad regional Gama y D) variedad regional Simijaca..... 80

**Figura 2-14.** Comportamiento de la temperatura mínima y las horas frío por día durante septiembre de 2017 en el Centro Agropecuario Marengo (CAM) ubicado en el municipio de Mosquera, Cundinamarca asociadas a pudrición del tallo y afectación de la parte aérea de la planta de maíz ICA 508 y variedad regional Simijaca. .... 80

**Figura 2-15.** Sintomatología en plantas de maíz variedad regional Simijaca sembrada en el Centro Agropecuario Marengo (CAM) en el municipio de Mosquera, Cundinamarca, un mes después del episodio estrés por frío. A) plantas sintomáticas en campo con necrosis exterior evidente del tercer entrenudo. B) corte longitudinal de la base del tallo donde no se aprecia daño en el cuello. C) corte longitudinal de estratos superiores de la planta donde se evidencia la sintomatología asociada con *Fusarium* spp. D) corte longitudinal y E) corte transversal de una sección del tallo sintomático. (Fotografías: Sandra Gómez Caro)..... 81

**Figura 3-1.** Incidencia de la pudrición del tallo de maíz variedad regional Simijaca bajo tres historiales del lote del cultivo y condiciones de manejo de residuos. A). según historial del lote del cultivo donde letras diferentes denotan diferencias estadísticas según Tukey ( $p < 0,05$ ) y B) comportamiento de la incidencia de la pudrición del tallo en el tiempo en los estados de desarrollo de seis y nueve hojas verdaderas (V6, V9), espigamiento (VT) e inicio de la formación de la mazorca (R1). ..... 105

**Figura 3-2.** Incidencia de la pudrición del tallo de maíz, en el estado de aparición de estigmas de la mazorca (R1) 140 días después de la siembra en plantas de la variedad regional Simijaca provenientes de semillas tratadas por medio de calor. H: calor seco mediante horno a 50, 55 y 60 °C; BM: calor húmedo mediante baño maría a 50, 55 y 60 °C. Letras diferentes denotan diferencia estadística según Tukey ( $p < 0,05$ ). ..... 106

- Figura 3-3.** Comportamiento del porcentaje de volcamiento de maíz variedad regional Simijaca según: A) la fecha de evaluación y B) el historial del lote del cultivo y las condiciones de manejo de residuos. (V6, V9): estados de desarrollo de seis y nueve hojas verdaderas, (VT): espigamiento, (R1): inicio de la formación de la mazorca. Letras diferentes denotan diferencia estadística según Tukey ( $p < 0,05$ )..... 108
- Figura 3-4.** Sintomatología interna en cortes longitudinales del tallo de plantas de maíz variedad regional Simijaca en estado de espigamiento (VT), 106 días después de siembra según el historial del lote del cultivo y manejo de los residuos de cosecha. .... 110
- Figura 3-5.** Porcentaje de germinación de semilla de maíz variedad regional Simijaca por historial del lote del cultivo y manejo de los residuos de cosecha 30 días después de siembra. Letras diferentes denotan diferencia estadística según Duncan ( $p < 0,05$ ). ..... 111
- Figura 3-6.** Efecto del historial del lote del cultivo y el manejo de los residuos de cosecha sobre el crecimiento de planta de maíz variedad regional Simijaca en el momento de espigamiento (VT) 106 días después de siembra. A) Diámetro del tallo y B) altura de la planta. Letras diferentes denotan diferencia estadística según Tukey ( $p < 0,05$ ). ..... 112
- Figura 3-7.** Diferencia en altura de plantas de maíz variedad regional Simijaca en estado de espigamiento (VT) 106 días después de la siembra en dos historiales del lote del cultivo con distinto manejo de los residuos de cosecha. A) Historial de rotación y B) historial de monocultivo de maíz con residuos de cosecha. Como referencia se muestra la diferencia en altura de las plantas de maíz respecto la altura de una persona que mide 1,70 m... 113
- Figura 3-8.** Efecto del historial del lote del cultivo y manejo de los residuos de cosecha sobre parámetros de rendimiento de plantas de maíz variedad regional Simijaca al momento de la cosecha (R4) 161 días después de la siembra. A) Número total de mazorcas y B) peso total de las mazorcas. Letras diferentes denotan diferencias estadísticas según Tukey ( $p < 0,05$ )..... 113
- Figura 3-9.** Efecto del historial del lote del cultivo, manejo de los residuos de cosecha y tratamientos a la semilla de maíz variedad regional Simijaca sobre el número de mazorcas por planta. A) Efecto según el historial de lote del cultivo y B) efecto según el tratamiento a la semilla. Letras diferentes denotan diferencia estadística según Tukey ( $P = 0,0547$ ). 114
- Figura 3-10.** Interacciones entre historial del lote de cultivo y manejo de los residuos de cosecha y el tratamiento a la semilla sobre el número de mazorcas por planta de maíz variedad regional Simijaca. Letras diferentes denotan efecto significativo según Tukey ( $p < 0,05$ ). ..... 115
- Figura 3-11.** Efecto del historial del lote del cultivo y manejo de los residuos de cosecha sobre parámetros de rendimiento de plantas de maíz variedad regional Simijaca al momento de la cosecha (R4) 161 días después de la siembra. A) diámetro de la mazorca, donde letras diferentes denotan diferencia estadística según Tukey ( $p < 0,05$ ) y B) longitud de la mazorca en plantas, donde letras diferentes muestran diferencia estadística según Duncan ( $p < 0,05$ ). ..... 116
- Figura 4-1.** Ciclo de patogénesis para la pudrición del tallo causada por *F. graminearum* (FGSC) y *F. subglutinans* (FFSC) en maíz (*Zea mays* L.) bajo la condiciones climáticas del valle de Ubaté las cuales modulan la relación entre endofitismo y enfermedad dependiendo del contexto climático. VE: emergencia de la semilla. V3, V6 y V9: tres, seis y nueve hojas

---

verdaderas respectivamente. VT: aparición de la espiga (espigamiento). R1: aparición de los estigmas de la mazorca. R4: grano con el 40% de masa seca. Porcentajes de color rojo: frecuencias de aislamiento de *F. graminearum*. Porcentajes de color verde: frecuencias de aislamiento de *F. subglutinans*. .....138

**Figura 4-2.** Modelo conceptual del efecto del estado de desarrollo del maíz (*Zea mays* L.), el manejo de los residuos de cosecha y tratamientos térmicos a la semilla sobre la enfermedad, crecimiento de las plantas y rendimiento del cultivo bajo las condiciones climáticas del valle de Ubaté. A) Efecto del momento del ciclo del cultivo en la cual el maíz es afectado por episodios de sequía y frío. B) Efecto del manejo de residuos de cosecha, tratamientos a la semilla y su efecto esperado sobre la enfermedad, crecimiento y rendimiento del cultivo. Plantas de color amarillo: plantas con pudrición del tallo que se vuelcan. Plantas verdes: plantas sanas.....139

## Lista de tablas

|   |     |
|---|-----|
| <b>Tabla 1-1.</b> Agentes causales asociados a pudrición del tallo de maíz en el mundo agrupados por las condiciones de temperatura y humedad ambiental donde se reportan como más problemáticos. FGSC: <i>Fusarium graminearum species complex</i> . FFSC: <i>Fusarium fujikuroi species complex</i> .....   | 11  |
| <b>Tabla 1-2.</b> Secuencias consenso de la región intergénica ribosomal (ITS) de los aislamientos fúngicos 26B y 45D. ....   | 33  |
| <b>Tabla 1-3.</b> Secuencias consenso del factor de elongación 1- $\alpha$ (EF1) de los aislamiento 26B y 45D de <i>Fusarium</i> spp. ....  | 35  |
| <b>Tabla 2-1.</b> Contenido fumonisinas B1, B2, B3 y totales por HPLC acoplada a espectrofluorometría y de deoxinivalenol por HPLC acoplada a UV en semilla variedad regional Simijaca procedente del valle de Ubaté durante epidemias de pudrición del tallo en 2017 y semilla variedad regional Simijaca obtenida bajo condiciones de invernadero en la Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá durante 2017. <LOQ: la concentración encontrada es detectable, pero es menor al límite de cuantificación (<50 $\mu\text{g/Kg}$ ), N.D: No Detectable..... | 75  |
| <b>Tabla 3-1.</b> Interacciones entre el historial del cultivo y el tratamiento térmico a la semilla de maíz variedad regional Simijaca sobre la incidencia de la pudrición del tallo y el porcentaje de volcamiento. Letras diferentes indican efecto significativo según Duncan ( $p<0,05$ ) y Tukey ( $p<0,05$ ) para la incidencia y el volcamiento respectivamente. ....   | 107 |
| <b>Tabla 3-2.</b> Comparaciones múltiples entre medias de los tratamientos sobre el porcentaje de volcamiento que fueron significativas al 0,05 en la prueba de Tukey. ....   | 109 |
| <b>Tabla 3-3.</b> Interacciones entre el historial del cultivo y el tratamiento térmico a la semilla de maíz variedad regional Simijaca sobre el diámetro y la longitud de la mazorca de maíz variedad regional Simijaca al momento de la cosecha (R4) 161 días después de la siembra. Letras diferentes indican efecto significativo según Duncan ( $p<0,05$ ) .....   | 117 |

# Lista de Símbolos y abreviaturas

## Abreviaturas

| Abreviatura | Término  |
|-------------|--|
| FGSC        | <i>Fusarium graminearum species complex</i>    |
| FFSC        | <i>Fusarium fujikuroi species complex</i>      |
| FHB         | <i>Fusarium Head Blight</i>                    |
| AFLP        | <i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i>  |
| AUMGC       | <i>Area Under Micelial Growth Curve</i>        |
| ITS         | <i>Internal Transcriber Spacer</i>             |
| EF1         | <i>Elongation Factor 1-<math>\alpha</math></i> |
| CLA         | <i>Carnation Leaf Agar</i>                     |
| WA          | <i>Water Agar</i>                              |
| SNA         | <i>Spezieller Nährtoffarmer Agar</i>           |
| PDA         | <i>Potato Dextrose Agar</i>                    |
| NA          | <i>Nutrient Agar</i>                           |
| ADE         | Agua destilada estéril                         |
| DDS         | Días después de siembra                        |
| VE          | Emergencia de la semilla                       |
| V3, V6 y V9 | Tres, seis y nueve hojas verdaderas            |
| VT          | Aparición de la espiga (espigamiento)          |
| R1          | Aparición de los estigmas de la mazorca        |
| R4          | Grano con 40% de masa seca                     |
| Kg          | Kilogramos                                     |
| G           | Gramo  |
| $\mu$ g     | Microgramo                                     |
| L           | Litro  |
| mL          | Mililitro                                      |
| $\mu$ L     | Microlitro                                     |
| m           | Metro  |
| cm          | Centímetro                                     |
| mm          | Milímetro o Milímetros de lluvia               |
| v/v         | Relación volumen- volumen                      |
| p/v         | Relación peso – volumen                        |
| bp          | Pares de bases                                 |
| N           | Concentración normal                           |
| T °         | Temperatura                                    |
| HR          | Humedad relativa                               |
| °C          | Grados centígrados                             |
| H           | Horas  |
| '           | Minutos  |
| '' , s      | Segundos                                       |
| PSI         | <i>Pounds-force per square inch</i>            |
| rpm         | Revoluciones por minuto                        |
| BOA         | 2-benzoxazolinone                              |
| DON         | deoxinivalenol                                 |
| HPLC        | <i>High Performance Liquid Chromatography</i>  |
| PCR         | <i>Polymerase Chain Reaction</i>               |
| i.a         | <i>Ingrediente activo</i>                      |



## Introducción general

Para el año 2050 se prevé que la demanda de cereales en el mundo aumente 800 millones de toneladas más que las producidas en el año 2014, año de cosecha récord global. Dentro de los cereales, el maíz es un alimento base de la seguridad alimentaria del planeta, siendo el segundo cultivo en importancia después del trigo (FAO, 2016) y provee gran cantidad de energía y proteína para millones de personas especialmente en países en desarrollo (FAO, 2011). Colombia ocupa el octavo lugar de consumo per cápita de maíz a nivel mundial con 92 gramos por persona al día (Ranum *et al.* 2014), para suplir esta demanda el país produce cerca de dos millones de toneladas principalmente de forma tradicional (57,3% del área destinada a su cultivo) e importa cuatro millones y medio de toneladas. Cundinamarca es uno de los principales productores de maíz de clima frío aportando el 4,3% de la producción a nivel nacional (AGRONET, 2017) y en particular el valle de Ubaté y los municipios en su área de influencia tienen al maíz en mayor o menor medida como base de su economía local, cuyo producto es principalmente destinado al consumo en fresco.

El maíz puede crecer en un amplio rango de latitudes y altitudes que reflejan una alta diversidad de rasgos fisiológicos y morfológicos que impactan diversos aspectos de calidad, apariencia y ciclos del cultivo, lo que ha permitido durante el proceso de domesticación una selección de cultivares regionales o variedades adaptadas para los requerimientos y características locales, las cuales los agricultores han mantenido y

mejorado (OGTR, 2008). La variedad regional Simijaca es una variedad de maíz de clima frío, de libre polinización, la cual fue cultivada por las comunidades indígenas chibchas que habitaron la región de Ubaté, quienes la seleccionaron por su calidad de mazorca y grano de tamaño grande, blando y de sabor agradable para el consumo en fresco, choclo y tostado, teniendo gran aceptación comercial, en especial por la población de las ciudades altoandinas (Ligarreto-Moreno, 2017).

Tradicionalmente en esta zona los tizones foliares ocasionados por *Setosphaeria turcica* y la roya causada por *Puccinia sorghi* han sido las enfermedades de mayor importancia (Gómez-Caro *et al.* 2017), sin embargo, en años recientes una pudrición del tallo que causa el volcamiento de las plantas ha venido cobrando importancia sin que se reporten trabajos del diagnóstico preciso de la enfermedad. En Colombia, la pudrición acuosa del tallo causada por *Dickeya zae* es la única enfermedad de importancia económica en tallo que se ha reconocido y es especialmente importante en climas cálidos y húmedos (Varón y Sarria, 2007).

La pudrición del tallo se espera que ocurra naturalmente después de la cosecha, y es importante en el ciclaje de nutrientes y materia orgánica, pero si esto ocurre antes de la madurez fisiológica de la planta entonces conduce a pérdidas en rendimiento debido al volcamiento y pobre desarrollo de la mazorca (Dodd, 1980). La pudrición del tallo es una enfermedad compleja y la causa es difícil de determinar ya que muchos tipos de hongos, bacterias y oomycetes tanto patógenos primarios como invasores secundarios, pueden ser aislados a partir del tejido necrótico (Wicklow *et al.* 2005). Excluyendo las pudriciones del tallo causadas por *D. zae* y *Pythium* spp. probablemente todos los híbridos y variedades de maíz moderno están predispuestas a la pudrición fúngica del tallo y aunque la sintomatología y patrones de la enfermedad son los mismos y todos los hongos asociados

---

son ubicuos, algunos aparentemente son favorecidos por ciertas temperaturas y regímenes de humedad ambiental y de suelo (Dodd, 1980).

Varias especies de *Fusarium* han sido asociadas con enfermedades en maíz en todos los estados de desarrollo, causando pudriciones de semillas, raíces, tallo y mazorca. Estas especies pueden ser aisladas de una sola planta enferma, y muchas son saprofitos comúnmente encontrados en la mayoría de los suelos agrícolas, lo cual hace su diagnóstico particularmente difícil (Broders, 2007). Dos especies de *Fusarium* causan principalmente las pudriciones del tallo de maíz en el mundo. *Fusarium graminearum* (*Fusarium graminearum species complex*) (FGSC) y *Fusarium verticillioides* (*Fusarium fujikuroi species complex*) (FFSC). El primero es más común en regiones frías y es uno de los agentes causales de pudrición del tallo más perjudicial, en tanto que el segundo, es más común en climas cálidos y secos el cual es particularmente dañino si ataca antes de la floración (CIMMYT, 2004).

Desde el punto de vista del patógeno, *Fusarium* spp. produce una amplia variedad de esporas que son transportadas a través de la atmosfera, ejemplos de ello son *F. graminearum* (FGSC), *F. verticillioides* (FFSC) y *F. proliferatum* (FFSC), los cuales pueden ingresar a la planta a través de tricomas, xilema de la hoja y los tejidos del tallo (Lawrence *et al.* 1981; Maldonado-Ramirez *et al.* 2005; Nguyen *et al.* 2016; Nguyen *et al.* 2015). Las plantas de maíz pueden ser infectadas mediante la diseminación del inóculo a través del aire, gotas de lluvia, insectos y semilla, esta última infectada por medio de los pistilos (Duncan y Howard, 2010; Munkvold *et al.* 1997; Ooka y Kommedahl, 1977; Windels *et al.* 1976).

Con respecto al hospedero, la pudrición del tallo no ocurre a menos que este sea adversamente afectado y tanto como las células del tejido colonizado permanezcan vigorosas, la mayoría de los genotipos tienen componentes genéticos para la resistencia (Dodd, 1980) y un ejemplo de ello es el metabolismo de 2-Benzoxazolinone, un compuesto de bajo peso molecular naturalmente producido por maíz el cual tiene propiedades antimicrobiales a las cuales *F. verticillioides*, *F. subglutinans* y *F. graminearum* son tolerantes (Glenn *et al.* 2002). Los genotipos de maíz varían en la susceptibilidad a la pudrición del tallo, pero todos probablemente estén predispuestos a la enfermedad, donde la senescencia celular precede a la pudrición del tallo (Dodd, 1980).

El fitobioma va más allá de la planta para considerar las interacciones bióticas y condiciones ambientales, el cual esencialmente define la totalidad de componentes bióticos y abióticos del nicho vegetal realizado, que se traduce en una plasticidad de respuestas patológicas que puede abarcar desde el endofitismo positivo a enfermedad dependiendo del contexto (Hawkes y Connor, 2017). El concepto que unifica la interacción hospedero, patógeno y ambiente denominado balance fotosintético entre el estrés y la translocación puede ayudar a explicar la distribución de la pudrición del tallo de maíz en campo y los mecanismos de resistencia a parásitos débiles facultativos donde los patrones de la enfermedad son los mismos, aunque ambientes específicos aparentemente favorecen un hongo sobre los otros. Este concepto aplica para *Fusarium spp.*, *Diplodia spp.*, *Colletotrichum graminicola* y *Macrophomina phaseolina* y excluye las pudriciones del tallo causadas por *D. zeae* y *Pythium spp.* (Dodd, 1980).

El balance fotosintético entre el estrés y la translocación considera que condiciones ambientales específicas pueden favorecer un hongo sobre los otros y si un vertedero está establecido, un nivel suficiente de estrés puede predisponer la planta de maíz a la pudrición

del tallo (Dodd, 1980). Cuando el tejido pierde su sistema de defensa debido a la senescencia celular, cuando la planta se compromete en llenar el grano y hay deficiencia de carbohidratos a causa de la insuficiencia en la fotosíntesis y la competencia con la translocación al grano, las raíces y tallo son degradados por varios microorganismos (Whitney y Mortimore, 1957).

En las zonas de producción templadas, la siembra al inicio de la primavera es un ambiente desfavorable para las semillas de maíz ya que se exponen a la hidratación con agua fría causando daño físico directo, las membranas de las células reducen la fluidez a bajas temperaturas y bajo estas condiciones el proceso de hidratación puede resultar en la ruptura de la membrana y la fuga del contenido celular, lo cual genera una fuente de alimento para patógenos. Además, las bajas temperaturas reducen el metabolismo de las semillas y plantas, disminuyen su vigor e incrementan la sensibilidad a herbicidas y enfermedades. Temperaturas iguales o inferiores a 10 °C son las más perjudiciales para el establecimiento del maíz y el grado de daño será mayor en suelos pesados o de drenaje pobre (Saab y Steve, 2006).

Las prácticas culturales diseñadas para reducir epidemias dentro de cultivos tienen su fundamento en la epidemiología de enfermedades vegetales. La estrategia general es alterar las condiciones bajo las cuales los cultivos están creciendo, de tal forma que se evite la infección por el patógeno. Las tácticas empleadas en esta estrategia incluyen prácticas de mecanización, fertilización, rotación de cultivos, densidad de plantas, fecha de siembra e irrigación (Munkvold, 2003). En climas tropicales, la rotación de cultivos y el Inter cultivo han sido formas comunes de producción y en algunos países se ha hecho continuamente por siglos. Desafortunadamente, hay poca información publicada sobre la

influencia de sistemas de cultivos sobre la incidencia de enfermedades de plantas (Sumner *et al.* 2003).

Es conocido que los patógenos que pueden sobrevivir en detritos pueden proveer una fuente de inóculo para causar epidemias severas y es por esto que un esfuerzo especial es hecho en muchos países para no cultivar, por ejemplo, crucíferas frecuentemente en un mismo lote debido a la pudrición negra (Will, 1968), Mildew velloso y virus del mosaico (Williams, 1979). En Nigeria se recomienda que las batatas no se siembren en el mismo sitio más allá de cuatro años en sistemas de cultivo múltiple debido a los nematodos que desfiguran la piel y reducen el rendimiento (Andrews y Kassam, 1976).

El interés en la labranza cero o labranza de conservación y cultivos múltiples se ha incrementado debido a la escasez y costo elevado de combustibles fósiles, falta de alimento a nivel mundial y preocupación por la erosión del suelo (Sumner *et al.* 2003). Aunque en algunos casos, las prácticas de labranza mínima pueden reducir la severidad de enfermedades por la conservación de la humedad del suelo previniendo el estrés por sequía (Dodd, 1980), en otras ocasiones la severidad se puede incrementar (Broders *et al.* 2007). Estas preocupaciones son de tal magnitud en muchos países que los sistemas de producción de cultivos han tenido que ser alterados para asegurar las necesidades de un mundo en constante cambio (Sumner *et al.* 2003). Por lo anterior, se hace necesario desarrollar, evaluar e implementar prácticas de manejo sostenibles para la producción de cultivos de maíz acordes a las condiciones y oferta climática de las zonas productoras de clima frío como es el caso del valle de Ubaté.

En razón a que, en las zonas de producción de clima frío, como el caso de Cundinamarca, existen reportes de la pudrición del tallo asociados con *F. graminearum* (FGSC), *Fusarium*

*verticillioides* (FFSC), *Pythium* spp. y *Stenocarpella maydis* (Buriticá, 1999), esta investigación buscó identificar el agente etiológico asociado a la pudrición del tallo de maíz en el valle de Ubaté, de forma que oriente los lineamientos del manejo de la enfermedad con base en la biología del patógeno. En este sentido, el primer capítulo de esta disertación describe los síntomas y signos de la pudrición del tallo de maíz, hace la identificación de los agentes causales de la pudrición del tallo y confirma su patogenicidad en la variedad de maíz regional Simijaca. En el segundo capítulo se hace una descripción de los aspectos más importantes de la biología de los agentes causales de esta enfermedad en la zona de estudio, su efecto sobre el crecimiento y desarrollo del maíz y la relación de las condiciones de clima y paisaje preponderantes con el desarrollo de la enfermedad durante un evento de niño tropical presentado en los años 2016 y 2017. El tercer capítulo evalúa el efecto de la disminución del potencial de inóculo asociado a residuos de cosecha y semilla sobre la pudrición del tallo, crecimiento y rendimiento del maíz bajo condiciones de campo. Finalmente, el cuarto capítulo retoma y discute de manera integral los resultados más importantes en cuanto a aspectos etiológicos de la pudrición del tallo de maíz en la variedad regional Simijaca, una variedad adaptada a las condiciones del trópico frío colombiano, en el valle de Ubaté.

# Objetivos

## Objetivo general

Identificar el agente causal de la pudrición del tallo del maíz (*Zea mays* L.) en el valle de Ubaté, los aspectos etiológicos más importantes de la enfermedad y el efecto del manejo del potencial de inóculo sobre parámetros de la enfermedad, crecimiento y rendimiento del cultivo.

## Objetivos específicos

- Describir la sintomatología asociada a la pudrición del tallo en diferentes etapas fenológicas del cultivo de maíz.
- Establecer los posibles agentes causales asociados a la pudrición del tallo del maíz en la zona de estudio.
- Describir los aspectos más importantes de la biología de los agentes causales del volcamiento de maíz y su efecto sobre el crecimiento y desarrollo de la planta.
- Relacionar las condiciones de clima y paisaje preponderantes en la zona de estudio con el desarrollo de la pudrición del tallo de maíz.
- Evaluar el efecto de la disminución de potencial de inóculo en semilla y residuos de cosecha sobre la pudrición del tallo, volcamiento, crecimiento y rendimiento de maíz en el valle de Ubaté.



# 1. Capítulo I: Identificación del agente causal de la pudrición del tallo del maíz (*Zea mays* L.) en el valle de Ubaté

## 1.1 Resumen

En este estudio las variedades regionales de maíz Simijaca y Sogamoso fueron susceptibles a la pudrición del tallo y la enfermedad fue detectada en el valle de Ubaté como la combinación de síntomas externos de clorosis del cogollo, antocianocencia de las hojas y enanismo de la planta. En cortes longitudinales del tallo se observó necrosis de cuello y nudos. Finalmente, el volcamiento como la manifestación final de la desintegración y pudrición basal del tallo ocurrió en cualquier etapa fenológica del cultivo. Estas sintomatologías coincidieron con las reportadas en el mundo para las pudriciones del tallo de maíz causadas por *Fusarium graminearum* (*Fusarium graminearum* species complex) (FGSC) y *Fusarium verticillioides* (*Fusarium fujikuroi* species complex) (FFSC). La frecuencia de aislamiento de *Fusarium* spp. fue del 60% para todos los estados de desarrollo del cultivo de maíz y del 46%, 64%, 82% y 92% en estados de desarrollo de tres, seis, nueve hojas verdaderas y espigamiento respectivamente (V3, V6, V9 y VT), sugiriéndose una colonización aérea de las plantas de maíz por parte de *Fusarium* spp. debido al incremento del porcentaje de aislamiento a partir del tejido del tallo en el tiempo. Las especies de *Fusarium* asociadas a la pudrición del tallo correspondieron a *F. graminearum* (FGSC) y *F. subglutinans* (FFSC) según la identificación morfológica y molecular, las cuales tienen como nicho ecológico las zonas de producción de clima frío observándose la presencia de peritecios superficiales de *F. graminearum* sobre los nudos de los residuos de cosecha de maíz y la ausencia de los peritecios de *F. subglutinans* (FFSC). Las pruebas de patogenicidad confirmaron a *F. graminearum* y *F. subglutinans*

como los agentes causales de la pudrición del tallo del maíz variedad regional Simijaca en el valle de Ubaté causando síntomas necróticos y coloraciones purpuras en cuello, nudos y entrenudos de las plantas 90 días después de siembra.

## 1.2 Introducción

Las pudriciones del tallo de maíz causan pérdida del potencial de rendimiento, debido a que los granos de las plantas afectadas son de bajo peso y las mazorcas se pierden durante la cosecha debido al volcamiento de las mismas. La distribución en tiempo y espacio de la pudrición del tallo de maíz es difícil de explicar o predecir ya que una variedad puede tener tallos de calidad aceptable y ser volcada en el mismo campo el próximo año. El rendimiento en campos adyacentes puede diferir con cerca de todas las plantas volcadas en un área, pero con individuos en pie en otras, aun cuando sean plantas genéticamente idénticas (Dodd, 1980). La pudrición del tallo es una enfermedad compleja y la causa es difícil de determinar ya que muchos tipos de hongos, bacterias y oomycetes tanto patógenos primarios como invasores secundarios, pueden ser aislados a partir del tejido necrótico de plantas afectadas (Wicklów *et al.* 2005).

Excluyendo las pudriciones del tallo causadas por *Dickeya zeae* y *Pythium* spp., probablemente todos los híbridos y variedades de maíz moderno están predisuestas a la pudrición fúngica del tallo y aunque la sintomatología y patrones de la enfermedad son los mismos y todos los hongos asociados son ubicuos, algunos aparentemente son favorecidos por ciertas temperaturas y regímenes de humedad ambiental y de suelo (Dodd, 1980). En la tabla 1-1, se agrupan los agentes causales de la pudrición del tallo de maíz de mayor importancia en el mundo de acuerdo con las condiciones de temperatura y humedad con la cual han sido reportados causando epidemias severas.

**Tabla 1-1.** Agentes causales asociados a pudrición del tallo de maíz en el mundo agrupados por las condiciones de temperatura y humedad ambiental donde se reportan como más problemáticos. FGSC: *Fusarium graminearum species complex*. FFSC: *Fusarium fujikuroi species complex*.

| Ambiente | Temperatura                                       |   |
|----------|---|---|
|          | Baja $\leq 20$ °C                                 | Alta $\geq 30$ °C                                     |
| Seco     | <i>Fusarium graminearum</i> (FGSC) <sup>1,5</sup> | <i>Macrophomina phaseolina</i> <sup>1</sup>           |
|          | <i>Fusarium subglutinans</i> (FFSC) <sup>5</sup>  | <i>Fusarium verticillioides</i> (FFSC) <sup>1,5</sup> |
| Húmedo   |   | <i>Dickeya zeae</i> <sup>1</sup>                      |
|          | <i>Pythium</i> spp. <sup>3</sup>                  | <i>Pythium</i> spp. <sup>1</sup>                      |
|          | <i>Rhizoctonia solani</i> <sup>4</sup>            |   |
|          | <i>Stenocarpella maydis</i> <sup>1</sup>          | <i>Stenocarpella macrospora</i> <sup>1</sup>          |
|          | <i>F. graminearum</i> (FGSC) <sup>1,5</sup>       | <i>Glomerella graminicola</i> <sup>1</sup>            |
|          | <i>F. subglutinans</i> (FFSC) <sup>5</sup>        | <i>Botryodiplodia theobromae</i> <sup>1</sup>         |
|          | <i>Acremonium zeae</i> <sup>2</sup>               |   |

<sup>1</sup>CIMMYT, (2004); <sup>2</sup>Wicklowsky *et al.* (1988); <sup>3</sup>Zhang *et al.* (1998) y <sup>4</sup>Sumner y Bell, (1981). <sup>5</sup>Munkvold *et al.* (2018).

Varias especies de *Fusarium* han sido asociadas con enfermedades en maíz en todos los estados de desarrollo, causando pudriciones de semillas, raíces, tallo y mazorca. Estas especies pueden ser aisladas de una sola planta enferma, y muchas son saprofitos comúnmente encontrados en la mayoría de los suelos agrícolas (Broders, 2007). Dos especies de *Fusarium* causan principalmente las pudriciones del tallo en el maíz, *F. graminearum* (FGSC) y *F. verticillioides* (FFSC). El primero es más común en regiones frías y es uno de los agentes causales de pudrición del tallo más perjudicial en tanto que el segundo es más común en climas cálidos, secos y es particularmente dañino si ataca antes de la floración. Los síntomas producidos por estos patógenos semejan aquellos causados por *Stenocarpella* spp. o *Acremonium* spp. es decir, necrosis interna de la médula de los entrenudos inferiores del tallo, los cuales se debilitan y quiebran fácilmente cuando hay vientos o lluvias fuertes. En este caso, algunas plantas permanecen erectas

cuando se secan y en las etapas finales de la infección, la médula es destruida y los tejidos adyacentes pierden su color y no se les puede distinguir hasta que son visibles las estructuras del patógeno que las produce, que en el caso de las pudriciones del tallo causadas por *F. graminearum* corresponden a peritecios superficiales sobre los nudos del tallo (CIMMYT, 2004).

*F. graminearum* es un patógeno de importancia económica de cultivos de cereales que puede causar pérdidas importantes en rendimiento y calidad (Broders, 2007). Este hongo puede también infectar otras especies vegetales sin causar síntomas de la enfermedad (Goswami y Kistler, 2004). *F. graminearum* es conocido por ser productor de micotoxinas, principalmente deoxinivalenol (DON) y zearalenone que son perjudiciales para la salud humana y animal (De Biazio, 2008).

El nombre de *F. graminearum* fue usado para describir lo que se conoce como un grupo polifilético de distintas especies fúngicas. Antes de 1999 el hongo heterotálico se conocía como *F. graminearum* grupo 1 para distinguirlo del hongo homotálico *F. graminearum* grupo 2. Actualmente estos hongos son especies biológicas y filogenéticas separadas, cada una con un estado sexual independiente. El grupo 1 es ahora conocido como *F. pseudograminearum* en tanto que el grupo 2 conservó el nombre de *F. graminearum* (Goswami y Kistler, 2004).

*F. graminearum* (FGSC) se ha tratado de dividir como un complejo de especies monofiléticas separadas filogenéticamente, algunas presentes en continentes o regiones geográficas particulares siendo *F. graminearum sensu stricto* la especie más común alrededor del mundo (Goswami y Kistler, 2004). Varias taxas han sido identificadas dentro de lo que se ha llamado *Fusarium graminearum species complex* (FGSC) y se ha discutido si todas estas taxas deberían ser definidas como especies o si reflejan poblaciones o

---

linajes dentro de un concepto más amplio de *Fusarium graminearum sensu lato* (Summerell, 2019). Los taxones identificadas son: *F. graminearum sensu stricto*, *F. asiaticum*, *F. ussurianum*, *F. vorossi*, *F. gerlachii*, *F. boothii*, *F. meridionale*, *F. mesoamericanum*, *F. austroamericanum*, *F. brasilicum*, *F. cortaderiae*, *F. aethiopicum* y *F. acaciae-mearnsii* (Yli-Mattila *et al.* 2009). No hay duda de que estas poblaciones/linajes son filogenéticamente distintas y algunas de ellas reflejan algunas diferencias biológicas, en la producción de toxinas y biogeografía, pero también hay indicios del potencial que tienen estos taxones de cruzarse y ser productos de hibridación (Summerell, 2019).

Se reconoce que las técnicas de filogenética molecular podrían sobreestimar el número de especies por la interpretación de la estructura genética como delimitación de especie (Sukamaran y Knowles, 2017) y consecuentemente cuando se trabaja con este grupo y otros complejos de especies se debe tener esta perspectiva presente, y podría ser que el uso de una nomenclatura de taxón sub específica sea más apropiada para reflejar el estatus evolutivo de algunas poblaciones o grupos de poblaciones dentro de los complejos de especies (Summerell, 2019). La delimitación de linajes/especies y su asociación con nichos ecológicos específicos, condiciones de temperatura y humedad, esquemas de rotación de cultivos, bioregiones y continentes, junto con el desplazamiento de ciertos linajes por otros más exitosos y agresivos ha sido documentado en diversos países en Asia, Europa, Oceanía, Norte América y Suramérica (Van der Lee *et al.* 2015).

Por su parte, *Fusarium verticillioides* (FFSC) tiene un amplio rango de hospederos incluyendo maíz. Los tejidos vegetativos y reproductivos son colonizados y hasta un 90% de lotes de semilla pueden ser infectados. La respuesta del maíz a la infección depende de la cepa fúngica, ya que algunos aislamientos han sido asociados con síntomas severos, incluyendo el tizón de plántulas y pudrición de granos, raíces y tallo, mientras que otras cepas causan una colonización asintomática. La evidencia ha soportado la hipótesis de

que las cepas que causan infecciones asintomáticas son endófitos. La mayoría de las cepas de *F. verticillioides* sin embargo producen micotoxinas, principalmente fumonisinas B1, B2 y/o B3 con efectos nocivos sobre humanos y animales (Yates *et al.* 1997).

Las infecciones asintomáticas del maíz con *F. verticillioides* hacen difícil la evaluación de esta asociación puesto que, aunque algunos aislamientos se reportan que benefician el crecimiento de maíz otros pueden ser altamente patogénicos y la respuesta puede estar supeditada a un contexto ecológico. Dicha contradicción podría representar estudios separados de una especie o de mezclas de especies actualmente contenidas y reconocidas dentro del antiguo complejo *fujikuroi* (Bacon *et al.* 2008).

Las diez especies biológicas o poblaciones de apareamiento (*Matting type*) actualmente reconocidas dentro del complejo *fujikuroi* (FFSC) son: *F. verticillioides*, *F. sacchari*, *F. fujikuroi*, *F. proliferatum*, *F. subglutinans*, *F. thapsinum*, *F. nygamai*, *F. circinatum* y *F. konzum*. Recientemente, se ha reportado que *F. subglutinans* representa dos especies crípticas distinguibles por AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), *F. subglutinans sensu stricto* y una nueva especie denominada *F. temperatum* (Czembor *et al.* 2015). En maíz, se reportan las especies *F. verticillioides*, *F. subglutinans*, *F. proliferatum*, *F. nygamai*, *F. thapsinum* (Leslie y Summerell, 2006) y *F. temperatum* (Czembor *et al.* 2015).

Los frecuentes cambios en la taxonomía y nomenclatura en el género *Fusarium* han complicado los esfuerzos para documentar la ocurrencia de especies y de acuerdo a los conceptos taxonómicos actuales, al menos 22 especies de *Fusarium* pueden ser encontrados en maíz, siendo las más importantes *F. graminearum*, *F. verticillioides*, *F. subglutinans*, *F. temperatum* y *F. proliferatum* (Munkvold *et al.* 2018).

La taxonomía de *Fusarium fujikuroi species complex* (FFSC) y *Fusarium graminearum species complex* (FGSC) está basada en conceptos morfológicos, biológicos y filogenéticos (Summerell, 2019). Las revisiones de FFSC en los últimos 30 años han reportado 45 especies filogenéticas, diez especies biológicas y 34 morfoespecies. Esto complica la identificación de nuevos aislamientos basados solo en caracteres morfológicos y como consecuencia, esto ha generado la clasificación errónea y desestimación de la diversidad de *Fusarium* (Leyva-Madrigal *et al.* 2015).

Actualmente la taxonomía de especies dentro de FFSC y FGSC está basada principalmente en análisis de secuencia de DNA y O'Donnell *et al.* (2000) establecieron que la calmadulina, el factor de elongación 1- $\alpha$  (EF1) y  $\beta$ - tubulina son capaces de resolver la mayoría de especies en estos complejos, mientras que la región génica ITS, 28S rDNA y mtSSU no (Leyva-Madrigal *et al.* 2015). Actualmente el factor de elongación 1- $\alpha$  (EF1) es el marcador molecular más usado en estudios filogenéticos y taxonómicos dentro del género *Fusarium* (Stakheev *et al.* 2018). El gen *gaoA* ha sido también usado como región objetivo en las reacciones de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) para la detección específica de *F. graminearum* (De Biazio *et al.* 2008). Tres linajes ortólogos de este gen se han identificado en *Fusarium* y el linaje *gaoB* ha sido empleado para la identificación de *F. verticillioides* y *F. subglutinans* (Faria *et al.* 2012). Estos y otros genes involucrados en la síntesis de micotoxinas han sido propuestos como marcadores moleculares, no obstante, debido a la alta variabilidad en los exones de estos genes respecto al factor de elongación 1- $\alpha$  (EF1) hacen a este último más exitoso en la identificación de *Fusarium* sp. El uso de marcadores basados en genes involucrados en la síntesis de micotoxinas debería estar restringido a la identificación específica y caracterización de quimio-tipos dentro de las poblaciones de *Fusarium* productores de micotoxinas (Stakheev *et al.* 2018).

En este sentido, este capítulo describe las sintomatologías externas, internas, y signos asociados a la pudrición del tallo en plantas adultas de maíz de las variedades regionales Simijaca y Sogamoso bajo condiciones de campo en el valle de Ubaté y se identifican morfológica y molecularmente los posibles agentes causales de la pudrición del tallo y finalmente se determina su patogenicidad en plantas de maíz variedad regional Simijaca.

---

## **1.3 Metodología**

### **1.3.1 Síntomas y signos asociados a la pudrición del tallo en dos variedades regionales**

Semillas de las variedades Simijaca y Sogamoso, materiales regionales de maíz de clima frío de libre polinización, se sembraron en un lote con historial de pudrición del tallo ubicado en el municipio de Simijaca, (Finca Antonio Forero 5°N 29' 50'', -73°W 49' 57'') en el valle de Ubaté en Cundinamarca durante el segundo semestre de 2016. Mensualmente se inspeccionaron al azar 32 plantas de cada material, desde la siembra hasta el espigamiento. Las fechas de inspección coincidieron con los estados fenológicos de tres, seis y nueve hojas verdaderas (V3, V6, V9 respectivamente) y espigamiento (VT) según la escala propuesta por Ritchie *et al.* (1996). Durante estas evaluaciones se tomaron plantas con síntomas externos de enanismo, clorosis y antocianocencia para su inspección detallada en laboratorio, donde se conservaron a 4 °C hasta su procesamiento. Las plantas se lavaron bajo agua corriente de la llave por 30 min para retirar el suelo de la raíz y partes bajas del tallo. Los tallos de las plantas fueron cortados longitudinalmente y se hizo un registro fotográfico planta a planta, realizando la descripción detallada de la sintomatología asociada y posible presencia de signos del patógeno.

### **1.3.2 Obtención de aislamientos a partir de plantas adultas de maíz**

A partir de la población de plantas de cada material regional inspeccionada para describir la sintomatología mes a mes, desde la siembra hasta el espigamiento, se tomaron 60 explantes de raíz, cuello y tallo. Estos se desinfectaron en etanol al 70%, hipoclorito de sodio al 2% y se lavaron tres veces en agua destilada estéril (ADE) (Ortiz *et al.* 2011). Los tiempos de desinfección de acuerdo con la edad del material vegetal se ajustaron como se

muestra en el Anexo A. Después del proceso de desinfección, los explantes se secaron sobre toallas de papel absorbente estériles en cámara de flujo laminar y se sembraron en cajas de Petri con medio *Potato Dextrose Agar* (PDA) (Oxoid®) acidulado al 0,1% (v/v) con ácido láctico al 85%. Las cajas se incubaron en oscuridad a 25 °C por diez días, registrando la frecuencia de colonias fúngicas obtenidas por variedad y origen del explante. Las colonias más representativas de cada caja se purificaron en medio PDA acidulado y se les asignó un código con la información correspondiente al origen del explante, variedad y estado fenológico en la que fue aislada.

En el caso de bacterias, por variedad se tomaron 60 explantes de raíz, cuello y tallo. Los explantes siguieron el mismo proceso de desinfección y secado que en el caso de los aislamientos dirigidos a hongos. En tubos eppendorf de 1,5 mL con 1,0 mL de ADE los explantes se maceraron y se tomaron 100 µL del lisado los cuales se re-suspendieron en 900 µL de ADE. A partir de esta dilución se sembraron 10 µL de la suspensión en *Nutrient Agar* (NA) (Oxoid®) por triplicado. Las cajas se incubaron en oscuridad a 28 °C por espacio de una semana, se registraron los diferentes morfotipos de colonias bacterianas aisladas, por variedad y origen del explante. Las colonias más representativas de cada caja se purificaron en medio NA, conservando la información correspondiente al origen del explante, variedad y estado fenológico de la planta en la que fueron aisladas.

A partir de cada uno de los cultivos puros de hongos y bacterias se realizó una suspensión de la colonia en crioviales de 2,0 mL con 1,5 mL de glicerol al 15% previamente esterilizado en autoclave. Los crioviales se pusieron sobre placas de hielo por espacio de 30 minutos y se invirtieron periódicamente para homogenizar la suspensión antes de su conservación a -70 °C (Leslie y Summerell, 2006). Para trabajos posteriores, los cultivos se reactivaron descongelando los crioviales a temperatura ambiente por espacio de 30 minutos luego de

---

lo cual se tomaron 10  $\mu$ L de la suspensión y se sembraron sobre medio PDA o NA e incubadas en oscuridad a 25 o 28 °C según fuera el caso.

### **1.3.3 Identificación morfológica de aislamientos de *Fusarium* spp. obtenidos de plantas adultas de maíz**

Los cultivos puros de hongos en medio PDA se identificaron morfológicamente a nivel de género siguiendo la clave taxonómica de Barnett y Hunter (1999). Las colonias pertenecientes al género *Fusarium* se agruparon según la apariencia de la colonia y la pigmentación. Se obtuvieron 17 colonias diferentes que representaban toda la gama de morfotipos aislados a lo largo del ciclo fenológico del cultivo en las dos variedades regionales evaluadas. A partir de estas colonias se obtuvieron cultivos monospóricos en medio *Water Agar* (WA) (Oxoid®) al 30% (p/v) enmendado con 12 mL/L de cloranfenicol y 20 mL/L de sulfato de estreptomicina (Leslie y Summerell, 2006) los cuales fueron luego transferidos a cajas de Petri con medio PDA acidulado con ácido láctico.

Los cultivos monospóricos más representativos de cada colonia tipo *Fusarium* fueron seleccionados y se siguió el proceso de identificación morfológica según Leslie y Summerell, (2006). Para ello discos de 1,0 cm de diámetro de cada cultivo monospórico se sembraron en medio *Carnation Leaf Agar* (CLA), *Spezieller Nährstoffarmer Agar* (SNA), WA y PDA. Todos los medios fueron enmendados con 12 mL/L de cloranfenicol y 20 mL/L estreptomicina. Los cultivos se mantuvieron en incubación a 25 °C con fotoperiodo de 12:12 horas luz: oscuridad por 15 días.

En el medio CLA se evaluó el color de los esporodoquios, a partir de los cuales se determinó la forma general de las macroconidias y células apicales, el tamaño, número de septos y curvatura de parte ventral y dorsal de las mismas. En el micelio aéreo se

determinó si estaban o no presentes las microconidias y se registró el tipo de conidiogénesis. Adicionalmente se determinó la presencia o ausencia de clamidosporas y la formación de peritecios. En el medio SNA se corroboró la formación o no de microconidias, tipo de conidiogénesis, forma general, tamaño y número de septos. En el medio WA se confirmó la presencia o ausencia de clamidosporas. En el medio PDA se evaluó la pigmentación y la apariencia de la colonia. En todos los medios evaluados se midió el crecimiento radial de las colonias a los 1, 2, 3, 5 y 7 días después de siembra. Adicionalmente se calculó el área bajo la curva del crecimiento micelial (AUMGC) con base a la curva de crecimiento radial, adaptando la fórmula propuesta por Madden *et al.* (2007).

$$\sum_{i=1}^{N_i-1} \left( \frac{Y_i + Y_{i+1}}{2} \right) (t_{i-1} - t_i)$$

Donde  $i$  es el punto de observación,  $Y$  es el diámetro de la colonia y  $t$  el tiempo después de siembra. El diseño experimental correspondió a un diseño completamente al azar (DCA) con 18 repeticiones considerando como unidad experimental cada cultivo monospórico. El crecimiento radial en el tiempo y área bajo la curva del crecimiento micelial calculado a partir de la curva de crecimiento fue sujeta a comparación de medias por medio de Tukey con un nivel de significancia del 0,05 con el programa IBM SPSS *Statistics*. En el caso de bacterias, los bacilos Gram negativos aislados se pusieron a crecer en medio Hugh y Leiffson, *Yeast Dextrose Carbonate Agar* (YDCA) y King-B a 28 °C. Adicionalmente, aquellas colonias con metabolismo fermentativo se pusieron a crecer sobre medio NA a 40 °C con el fin de discriminar colonias pertenecientes al género *Dickeya* de aquellas

pertenecientes al género *Erwinia* o de otros géneros de bacterias entéricas (Duran-Peralta, 2011).

### **1.3.4 Identificación molecular de aislamientos de *Fusarium* spp. obtenidos de plantas adultas de maíz**

Los aislamientos (26B) y (45D) de *Fusarium* spp. fueron enviadas al Centro Nacional de Secuenciación Genómica, de la Universidad de Antioquia (Medellín, Colombia) (Anexo B). Las colonias de siete días de edad fueron crecidas en medio *Potato Dextrose Agar* (PDA) (Oxoid®) enmendado con 12 mL/L de cloranfenicol y 20 mL/L de sulfato de estreptomina. Muestras de 100 mg de micelio fresco por colonia de *Fusarium* fueron lisados mecánicamente con esferas de tungsteno de 3 mm de diámetro en *Tyssue Lyzer* (30 Hz/ 5 min). La extracción de ADN se realizó usando el kit Plant/Fungi DNA Isolation (Norgen Biotek Corporation®) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

La identificación a nivel de genero se hizo por medio de la región intergénica ribosomal *Internal Transcriber Spacer* (ITS), la cual se amplificó mediante PCR (*Polymerase Chain Reaction*) convencional, los oligonucleótidos utilizados fueron los universales ITS propuestos por White *et al.* 1990, ITS1: 5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3' e ITS4: 5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3'. El producto de PCR se sometió a una reacción de secuenciamiento capilar en ambas cadenas y se obtuvo la secuencia consenso. Para el análisis filogenético se usó el algoritmo CLASSIFIER del paquete MEGA versión 7.0 (MacOS) y la base de datos del *Ribosomal Database Project*. El árbol filogenético se construyó por medio de la metodología *Neighbor-joining* con 1000 réplicas de “*bootstrap*” usando el modelo de K2+G (Kimura 2 parameters + distribución gamma) descrito por Kimura (1980).

La identificación de especies se hizo por medio del factor de elongación 1- $\alpha$  (EF1), el cual se amplificó por medio de PCR convencional utilizando los oligonucleótidos EF50Fw: 5' CGACTCTGGCAAGTCGACCAC 3' y EF590R 5' CTCGGCTTTGAGCTTGCAAG 3', las condiciones de la PCR siguieron la metodología de Stakheev *et al.* (2018). El producto de PCR se sometió a una reacción de secuenciamiento capilar por ambas cadenas y se obtuvo la secuencia consenso. El análisis filogenético se realizó con el algoritmo CLASSIFIER del paquete MEGA versión 7.0 (MacOS), para ello se hizo una búsqueda de las secuencias homólogas de la región EF1 en las bases de datos internacionales para el género *Fusarium* y además se consideraron las secuencias reportadas por Stakheev *et al.* (2018). El árbol filogenético se construyó por medio de la metodología *Neighbor-joining* con 1000 réplicas de “*bootstrap*” usando el modelo de T92+G (Tamura 3 parámetros + distribución gamma) descrito por Tamura (1992). Para ambos árboles filogenéticos se calculó una matriz de distancias para confirmar la clasificación taxonómica de las secuencias obtenidas.

### **1.3.5 Prueba de patogenicidad de *F. graminearum* y *F. subglutinans* en plantas de maíz variedad regional Simijaca.**

**Material fúngico y obtención del inóculo.** Para esta evaluación se usaron los aislamientos monospóricos 26B de *F. graminearum* (FGSC) y 45D de *F. subglutinans* (FFSC) obtenidos a partir de plantas de maíz afectadas por pudrición del tallo en la región del Valle de Ubaté. *F. graminearum* fue propagado siguiendo la metodología de *Chaff-Grain* (Leslie y Summerell, 2006). En este caso, semillas de maíz variedad regional Simijaca fueron sumergidas en agua corriente por 12 h a 4 °C para permitir la lixiviación de compuestos fenólicos y se filtraron con ayuda de una gasa estéril. Los granos fueron repartidos en erlenmeyers sellados, que se esterilizaron a 120 °C y 15 PSI por 20 minutos

por dos días consecutivos. Estos se inocularon con 3 mL de una suspensión de  $1,0 \times 10^6$  conidias/mL obtenidas a partir de esporodoquios de *F. graminearum* crecidos en medio CLA. Los erlenmeyer fueron agitados de forma manual durante los primeros tres días y se incubaron a 25 °C en oscuridad por 15 días. Transcurrido este tiempo, 100 mL de ADE fueron agregados a cada erlenmeyer y se agitaron vigorosamente para separar las conidias de los granos de maíz. El producto se filtró con ayuda de una capa de gasa estéril y se centrifugó en tubos Falcon® de 50 mL a 2500 rpm por 15 minutos. El sobrenadante se descartó y el pellet se re-suspendió en 10 mL de ADE y se ajustó una suspensión de 200 mL a una concentración de  $1,0 \times 10^5$  conidias/mL. *F. subglutinans* fue propagado en 200 mL de medio Czapeck líquido inoculado con 3 mL de una suspensión ajustada a  $1,0 \times 10^6$  conidias/mL obtenidas a partir de esporodoquios crecidos en medio CLA. El medio se mantuvo en agitación a 150 rpm por espacio de 15 días a temperatura ambiente ( $\pm 20$  °C) (Leslie y Summerell, 2006). La cosecha de conidias se realizó filtrando el medio con gasa estéril y posterior centrifugación a 2500 rpm por 15 minutos. El sobrenadante se descartó y el pellet se re-suspendió en 10 mL de ADE y finalmente se ajustó una suspensión de 200 mL a una concentración de  $1,0 \times 10^5$  conidias/mL.

**Material vegetal e inoculación.** Un día previo al montaje de la prueba, semillas de la variedad regional Simijaca se sumergieron e hidrataron en agua corriente por espacio de cuatro horas. La semilla fue tratada por calor en agua a 52 °C por cinco minutos y enfriada con ADE siguiendo la metodología de Daniels (1983). Los tratamientos evaluados correspondieron a la inoculación con *F. subglutinans* ( $1,0 \times 10^5$  conidias/mL), inoculación con *F. graminearum* ( $1,0 \times 10^5$  conidias/mL) y la inoculación con la combinación de ambos aislamientos ( $1,0 \times 10^5$  conidias/mL por cada especie de *Fusarium*). Como control absoluto se tomaron semillas hidratadas sin ningún tratamiento. Por tratamiento, 200 semillas de maíz regional Simijaca fueron inoculadas con 100 mL de una suspensión de conidias de

la especie de *Fusarium* según el tratamiento y agitadas vigorosamente (Wilke *et al.* 2007). En el caso de la inoculación combinada de las dos especies, se usaron 50 mL de la suspensión de conidias de cada especie (Reid *et al.* 1999). Las semillas de los controles absoluto y térmico fueron tratados solo con 100 mL de ADE.

**Siembra y mantenimiento del experimento.** Posterior a la inoculación, las semillas fueron llevadas a invernadero ( $T=\pm 25^{\circ}$ , HR=75%) y dispuestas sobre bandejas plásticas con una capa de cinco centímetros de suelo, proveniente de zonas no agrícolas de la sabana de Bogotá, humedecido a capacidad de campo (Warham *et al.* 2008). El suelo fue analizado para descartar la presencia de *Fusarium*, para ello se realizaron diluciones estándar en base 10 partiendo de 100 g de suelo (Leslie y Summerell, 2006) y posterior siembra en placa de las diluciones  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  y  $10^{-6}$  en los medios PDA con cinco repeticiones por factor de dilución. Las bandejas fueron regadas diariamente hasta capacidad de campo y una vez las semillas germinaron se seleccionaron 40 plántulas por tratamiento, que fueron transferidas individualmente a bolsas con 1,5 Kg de suelo del mismo origen. Las plantas se fertilizaron cuando presentaron tres y seis hojas verdaderas con un fertilizante comercial 10-30-10-3 (N-P-K-Mg/S) y fueron regadas cuando el suelo estuviera seco o las plantas mostraran síntomas de deshidratación. Las plantas se dejaron crecer por espacio de tres meses y se hizo una evaluación de punto final de la incidencia de la pudrición del tallo por medio de cortes transversales del tallo. Posteriormente, a partir de plantas de cada uno de los tratamientos se determinó la frecuencia de aislamiento de *Fusarium* spp. en medio PDA enmendado con 2-benzoxaxolinone (BOA) a razón de 0,33 g/L, el cual es selectivo a especies fitopatógenas de *Fusarium* en maíz (Glenn *et al.* 2001).

## 1.4 Resultados

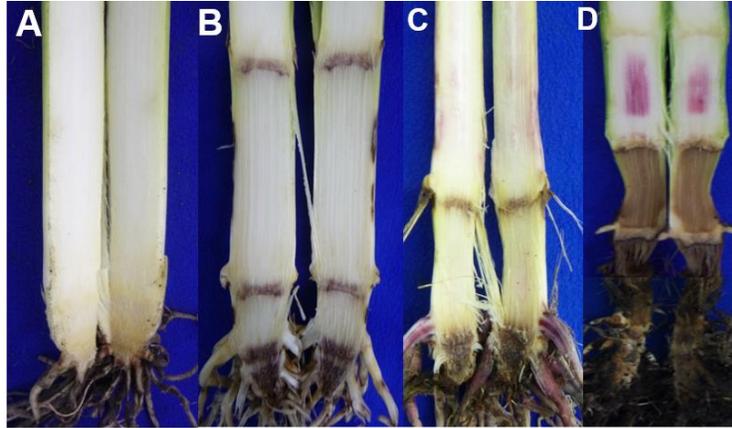
### 1.4.1 Síntomas y signos asociados a la pudrición del tallo en dos variedades regionales

En campo, la sintomatología externa de la alteración para las variedades Simijaca y Sogamoso 90 días después de siembra (DDS) fue el conjunto de clorosis apical y antocianocencia en las hojas, junto al enanismo de la planta (Figura 1-1 a, b y c). Las observaciones realizadas permitieron confirmar que el volcamiento es la manifestación final de la pudrición y desintegración de los nudos y entrenudos basales del tallo de maíz, lo cual puede ocurrir en cualquier etapa fenológica del cultivo.



**Figura 1-1.** Sintomatología externa en plantas de maíz variedad regional Simijaca tres meses después de siembra, en Simijaca (Cundinamarca, Colombia) durante el segundo semestre de 2016. A) clorosis apical de las hojas. B) antocianocencia en hojas. C) enanismo de la planta. (Fotografías: Alefsi David Sánchez Reinoso).

En cortes longitudinales del tallo de plantas sanas, la médula del tallo se observó de color crema o con ligeras coloraciones marrón en el cuello y nudos de la planta (Figura 1-2a). Cuando se presentó la enfermedad, se observó necrosis intensa del cuello y nudos (Figura 1-2b). Desde los nudos, la necrosis avanzó hacia los entrenudos (Figura 1-2c) causando la desintegración y pudrición basal del tallo (Figura 1-2d). En algunas ocasiones la médula presentó coloraciones púrpuras (Figura 1-2c y d).



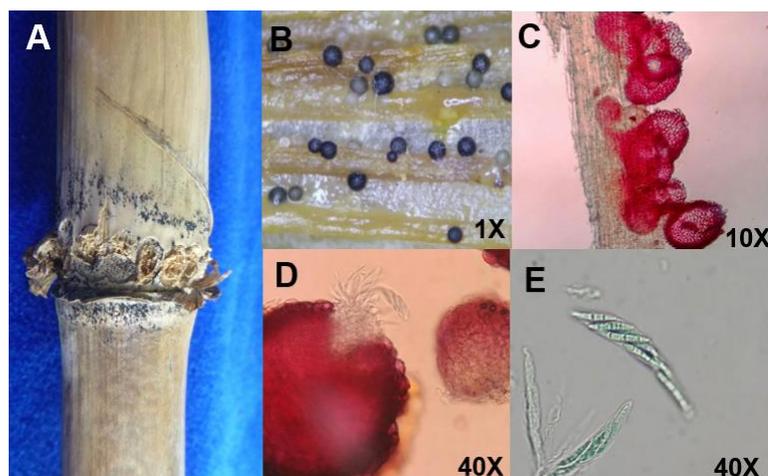
**Figura 1-2.** Sintomatología interna del tallo en corte longitudinal de plantas de maíz variedad regional Simijaca, durante el segundo semestre de 2016 en Simijaca (Cundinamarca, Colombia). A) planta sana tres meses después de siembra (V9). B) necrosis en cuello y nudos tres meses después de siembra (V9). C) avance de la lesión desde los nudos hacia los entrenudos cuatro meses después de siembra (VT). D) pudrición y desintegración de la base del tallo cinco meses después de siembra (R1).

En este estudio, se observó que la infección inicialmente contenida en el cuello de la planta, posteriormente se disemina a todos los estratos de la planta por medio de los nudos colonizados por el patógeno en estados iniciales de desarrollo, provocando así una infección sistémica (Figura 1-3).



**Figura 1-3.** Corte longitudinal de una planta de maíz variedad regional Simijaca dos meses después de siembra (V6) la cual presentaba síntomas de pudrición del tallo en un lote ubicado en Simijaca (Cundinamarca, Colombia) durante el primer semestre de 2017 donde se aprecia: A) diseminación de la enfermedad por medio de los nudos en plantas de maíz y B) acercamiento de la zona meristemática.

Sobre residuos de cosecha de maíz variedad regional Simijaca y Sogamoso se observaron peritecios superficiales de *F. graminearum* (FGSC) principalmente sobre los nudos del tallo de la planta (Figura 1-4a y b); estas estructuras de color pardo oscuro sobre el tejido son de color rojizo cuando se observan al microscopio con tinción de azul de lactofenol (Figura 1-4c). Dentro de estas estructuras, se observaron ascas con ocho ascosporas usualmente triseptadas, de aproximadamente 38  $\mu\text{m}$  de longitud (Figura 1-4d y e).



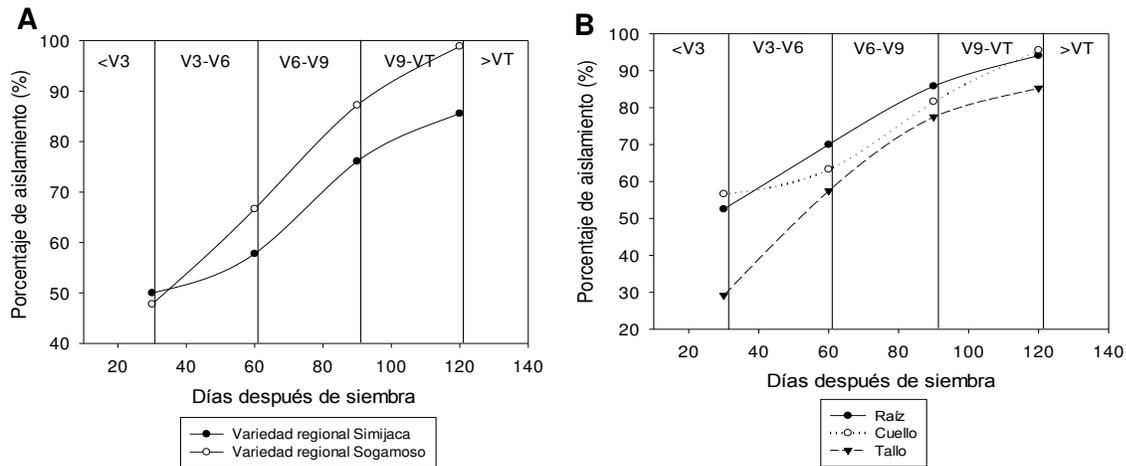
**Figura 1-4.** Peritecios de *Fusarium graminearum* (FGSC) sobre los residuos de cosecha de maíz variedad regional Simijaca durante el segundo semestre de 2016 en lotes en Simijaca (Cundinamarca, Colombia). A y B) peritecios asociados al nudo. C) observación de peritecios en corte a mano alzada. D) peritecio liberando asca con ascosporas en formación. E) detalle de un asca con ascosporas maduras dentro.

#### 1.4.2 Obtención de aislamientos a partir de plantas adultas de maíz

A partir del material vegetal procesado se obtuvieron y conservaron un total de 273 aislamientos fúngicos. Las colonias más frecuentemente aisladas durante todo el ciclo fenológico del cultivo de maíz correspondieron a hongos del género *Fusarium* con una frecuencia de 60%. *Rhizoctonia solani* se aisló en baja frecuencia y se encontró como organismo secundario asociado a chancros exteriores del tallo en la base de la planta. En el caso de oomycetes, a partir del material procesado se registró únicamente la presencia de *Pythium* spp. asociado a raíz también en baja frecuencia. En todo el ciclo fenológico del

cultivo de maíz se aislaron bacterias entéricas, sin embargo, ninguno de los morfotipos aislados correspondió al género *Dickeya*, por lo cual se pudo descartar la presencia de *D. zeae* asociada al material procesado.

La frecuencia de aislamiento de colonias típicas de *Fusarium* spp. en los materiales regionales de maíz Simijaca y Sogamoso evaluados fue alta desde estados de desarrollo de tres hojas verdaderas (V3) aumentando con el desarrollo de las plantas a seis, nueve hojas verdaderas y espigamiento (V6, V9 y VT). Aunque la frecuencia de aislamiento no fue diferente entre variedades ( $P=0,091$ ) ni entre los diferentes órganos de la planta procesados ( $P=0,112$ ) (Anexo C), se puede observar una tendencia a una mayor frecuencia de aislamiento de colonias tipo *Fusarium* spp. a partir de la variedad regional Sogamoso con respecto a la variedad Simijaca (Figura 1-5a).



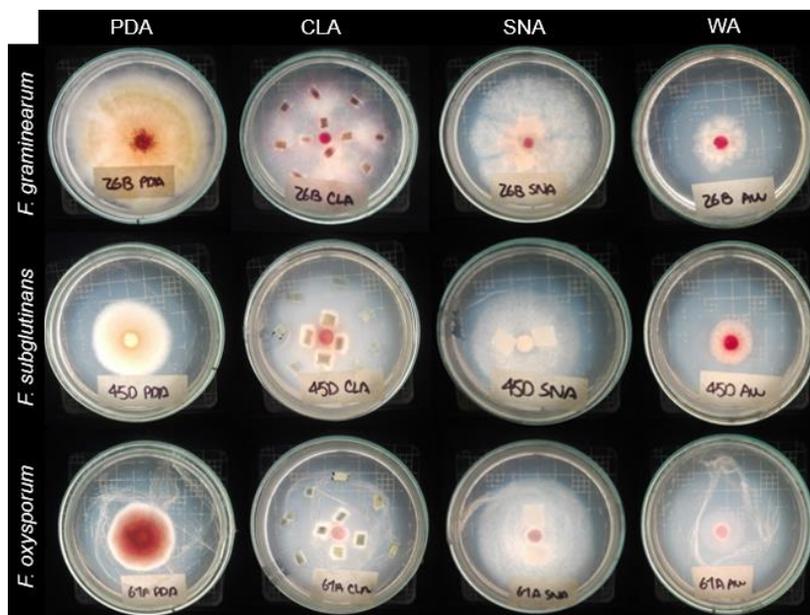
**Figura 1-5.** Porcentaje de aislamiento de colonias tipo *Fusarium* spp. A) por variedad de maíz y B) origen de explante en estados de desarrollo de tres, seis, nueve hojas verdaderas (V3, V6, V9) y espigamiento (VT) a los 30, 60, 90 y 120 días después de siembra respectivamente.

*Fusarium* spp. se aisló con mayor frecuencia a partir de la raíz y cuello de la planta en estados de desarrollo (V3) con respecto a la frecuencia de aislamiento obtenida a partir del tallo. En estados de desarrollo V6, V9 y VT, *Fusarium* spp. pudo ser aislado a partir de

explantes de raíz, cuello y tallo en frecuencias similares (Figura 1-5b). En promedio el porcentaje de aislamiento de colonias tipo *Fusarium* fue del 46%, 64%, 82% y 92% en estados de desarrollo V3, V6, V9 y VT respectivamente.

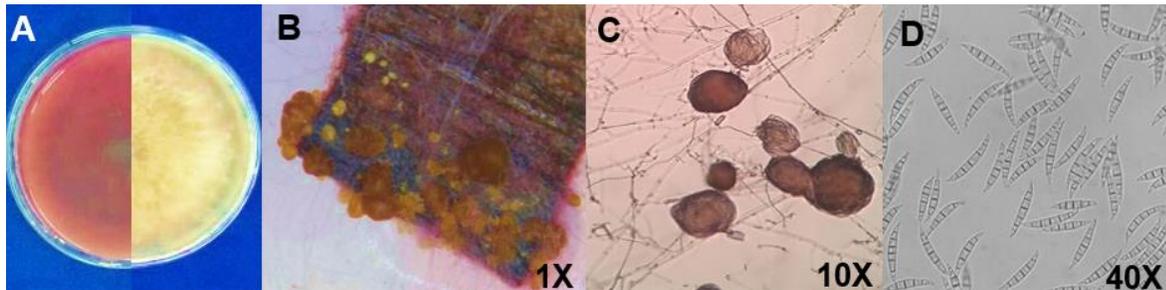
### 1.4.3 Identificación morfológica de aislamientos de *Fusarium* spp. obtenidos de plantas adultas de maíz

Las especies de *Fusarium* spp. aisladas a partir de plantas de maíz variedad regional Simijaca y Sogamoso fueron identificadas morfológicamente como *F. graminearum* (FGSC), *F. subglutinans* (FFSC) y *F. oxysporum*. Se obtuvieron en total 60 cultivos monospóricos, de los cuales 18 correspondieron a *F. oxysporum*, 18 a *F. graminearum* y 23 a *F. subglutinans*. La apariencia de una colonia tipo de cada una de las especies aisladas en medio PDA, CLA, SNA y WA se muestra en la Figura 1-6.



**Figura 1-6.** Apariencia de aislamientos tipo de tres especies de *Fusarium* aislados a partir de maíz en cuatro medios de cultivo siete días después de siembra. De arriba hacia abajo: *F. graminearum* (FGSC) (26B), *F. subglutinans* (FFSC) (45D) y *F. oxysporum* (61A). De izquierda a derecha, PDA: Potato Dextrose Agar, CLA: Carnation Leaf Agar, SNA: Spezieller Nährstoffarmer Agar y WA: Water Agar.

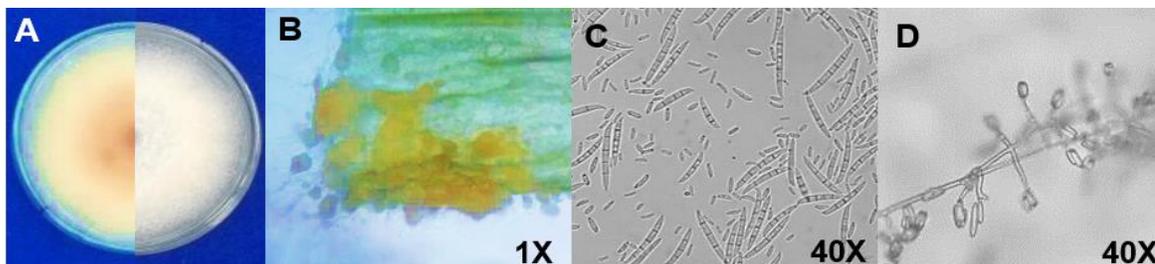
*F. graminearum* en medio PDA presentó colonias inicialmente blancas, las cuales cambian a tonalidades ocre y finalmente rojizas con apariencia plumosa (Figura 1-7a). En medio CLA se observó la presencia de esporodoquios color marrón (Figura 1-7b) y 30 días después de la siembra se formaron peritecios (Figura 1-7c). Las macroconidias fueron ligeramente hinchadas en la parte media, con un tamaño de 40-50  $\mu\text{m}$  x 4,5-5,5  $\mu\text{m}$ , con cinco o seis septos, moderadamente curvadas, con la parte ventral recta y la parte dorsal arqueada. La célula basal en forma de pie y la célula apical recta y con pico estrecho (Figura 1-7d). En medio CLA y AW se formaron clamidosporas principalmente en las macroconidias y estas fueron de lenta formación.



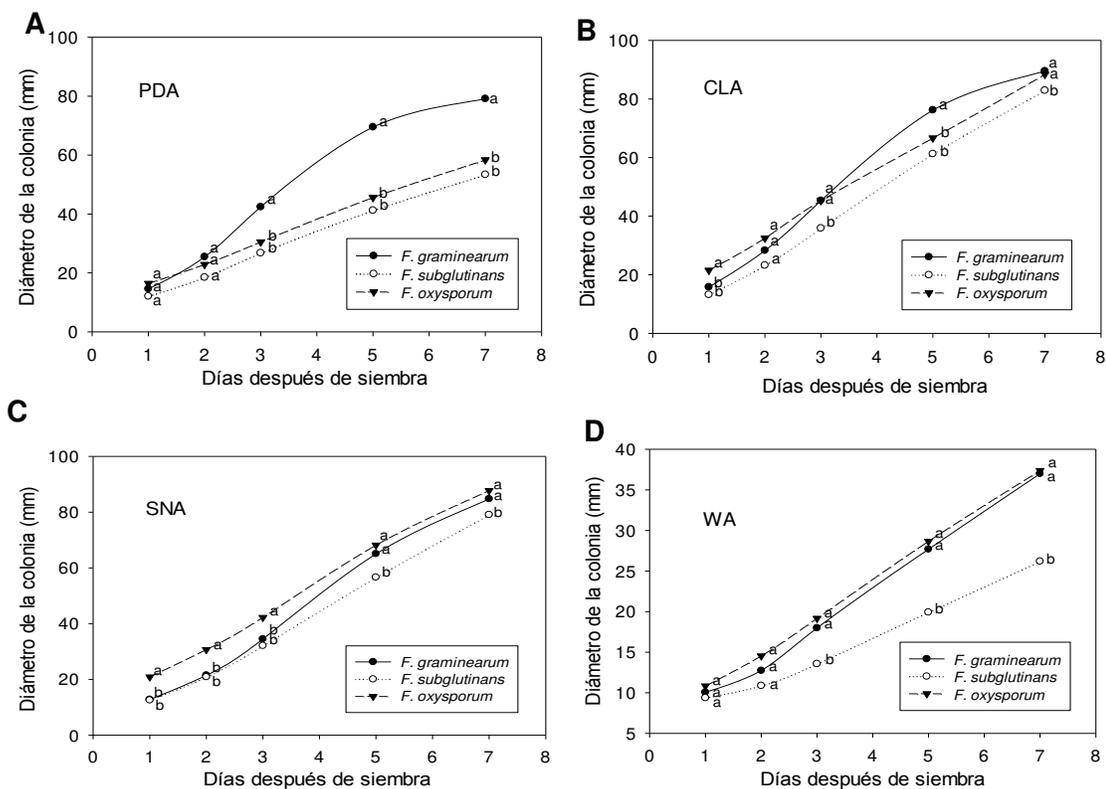
**Figura 1-7.** Características morfológicas de *Fusarium graminearum* (FGSC) aislamiento 26B. A) derecha: apariencia de la colonia e izquierda: pigmentación del reverso de la caja Petri en medio PDA quince días después de siembra. B) esporodoquios de color marrón en medio CLA. C) peritecios in situ en medio CLA. D) macroconidias en medio CLA con cinco a seis septos. PDA: *Potato Dextrose Agar*, CLA: *Carnation Leaf Agar*.

*F. subglutinans* en medio PDA presentó colonias inicialmente blancas, que cambian a coloraciones naranja y púrpura. La apariencia del micelio fue afelpada (Figura 1-8a). En medio CLA se formaron esporodoquios color naranja (Figura 1-8b). Las macroconidias formadas fueron las típicas del complejo *fujikuroi* (FFSC), con un tamaño de 50-60  $\mu\text{m}$  x 3-4  $\mu\text{m}$ , con tres a cuatro septos, rectas con la célula apical curvada y la célula basal pobremente desarrollada. Las microconidias fueron ovales, usualmente sin septos, aunque microconidias con uno o dos septos pudieron estar presentes y fueron formadas a partir de monofiálides cortas (Figura 1-8c), formando falsas cabezas (Figura 1-8). En medio CLA,

WA y SNA no se formaron clamidosporas. Las curvas de crecimiento radial en los cuatro medios de cultivo evaluados se muestran en la Figura 1-9. Estas curvas corresponden al crecimiento promedio de los cultivos monospóricos obtenidos de cada especie.

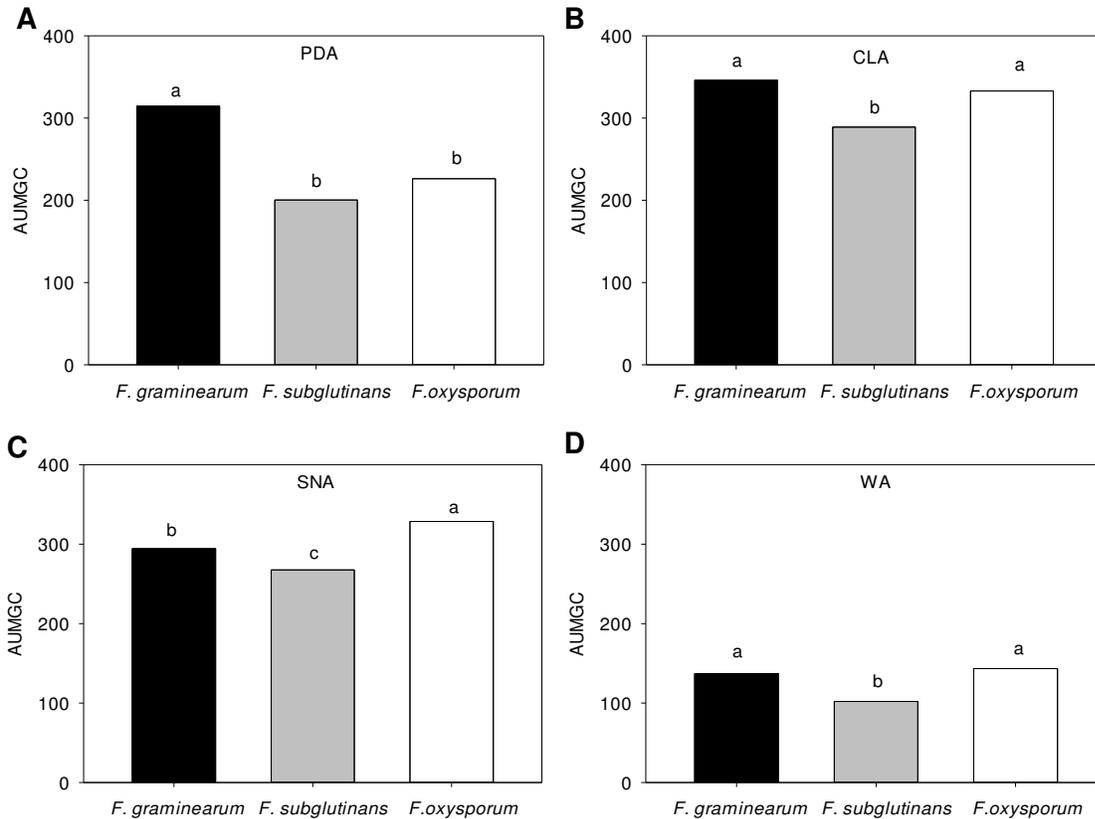


**Figura 1-8.** Características morfológicas de *Fusarium subglutinans* (FFSC) aislamiento 45D. A) derecha: apariencia de la colonia e izquierda: pigmentación del reverso de la caja Petri en medio PDA quince días después de siembra. B) esporodocios de color naranja en medio CLA. C) macroconidias típicas del complejo fujikuroi y microconidias ovales y usualmente sin septos. D) microconidias in situ en medio CLA formando falsas cabezas. PDA: *Potato Dextrose Agar*, CLA: *Carnation Leaf Agar*.



**Figura 1-9.** Curva de crecimiento radial de *F. graminearum* (FGSC), *F. subglutinans* (FFSC) y *F. oxysporum*, obtenido a partir de maíz variedad regional Simijaca en medio: A) *Potato Dextrose Agar* (PDA). B) *Carnation Leaf Agar* (CLA). C) *Spezieller Nährstoffarmer Agar* (SNF) y D) *Water Agar* (WA). Las curvas representan el promedio de al menos 18 monospóricos de cada especie. Las colonias fueron incubadas a 25 °C con fotoperiodo de 12:12 horas luz: oscuridad por 10 días. Letras diferentes indican diferencias estadísticas (Tukey  $p < 0,05$ ).

El área bajo la curva del crecimiento micelial (AUMGC) para cada especie y medio de cultivo se muestra en la Figura 1-10 (Ver Anexo D).



**Figura 1-10.** Área Bajo la Curva de Crecimiento Micelial (AUMGC) de *F. graminearum* (FGSC), *F. subglutinans* (FFSC) y *F. oxysporum*, aislados a partir de plantas de maíz variedad regional Simijaca en medio: A) *Potato Dextrose Agar* (PDA). B) *Carnation Leaf Agar* (CLA). C) *Spezieller Nährstoffarmer Agar* (SNA) y D) *Water Agar* (WA). Letras diferentes indican diferencias estadísticas (Tukey  $p < 0,05$ ).

En medio PDA, para un periodo de siete días *F. subglutinans* y *F. oxysporum* obtuvieron una tasa de crecimiento inferior a un centímetro por día a 25 °C con 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad en tanto que *F. graminearum* obtuvo una tasa de crecimiento superior a un centímetro por día bajo las mismas condiciones ( $P < 0,001$ ) (Figura 1-9 y 1-10). Las áreas bajo la curva del crecimiento micelial (AUMGC) (Figura 1-9) muestran que en medio SNA ( $P < 0,001$ ) las tres especies de *Fusarium* identificadas morfológicamente en este

estudio presentan área de colonia distintas mientras que en los medios CLA ( $P < 0,001$ ) y WA ( $P < 0,001$ ) diferencias en esta variable se encontraron entre *F. graminearum* y *F. subglutinans*, pero no entre *F. graminearum* y *F. oxysporum*.

#### 1.4.4 Identificación molecular de aislamientos de *Fusarium* spp. obtenidos de plantas adultas de maíz

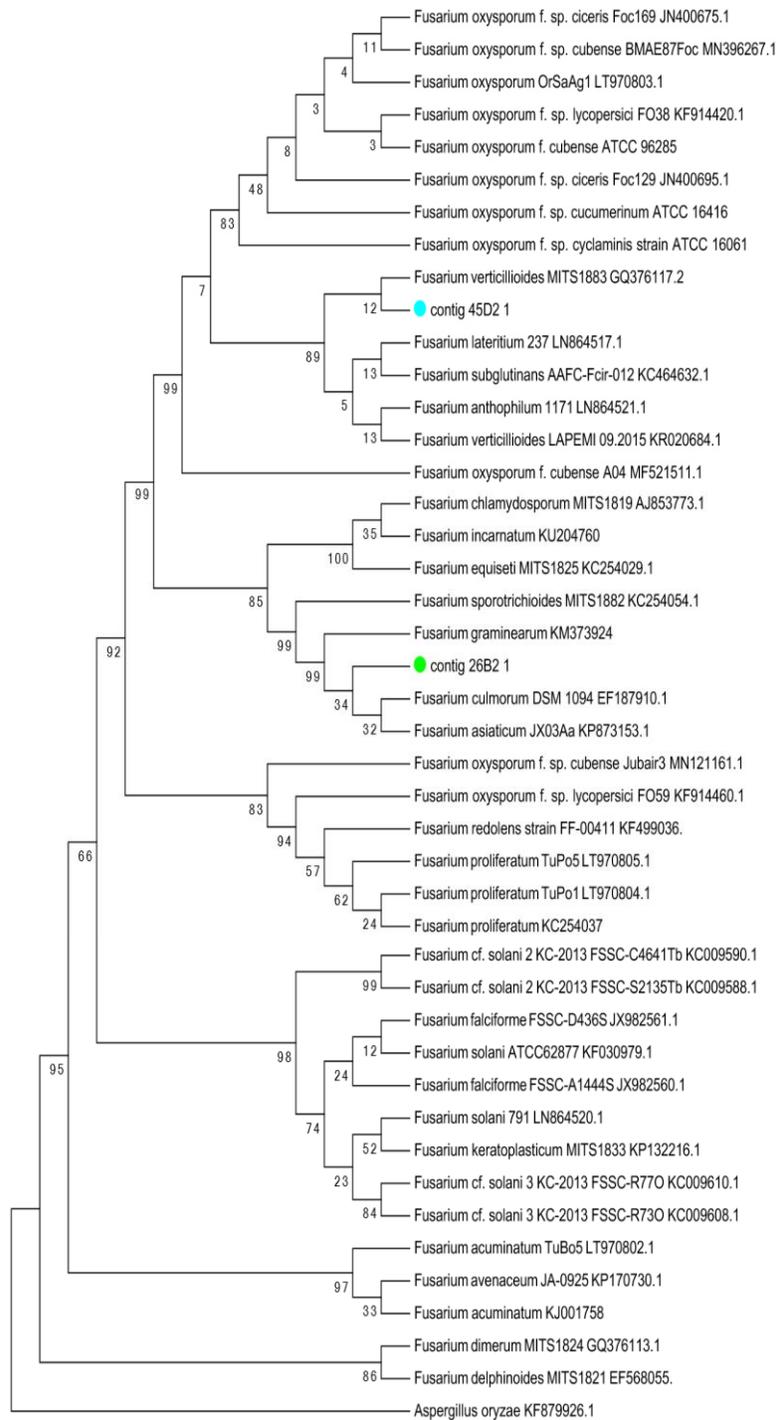
La región intergénica ribosomal (ITS) amplificó un fragmento aproximado de 560 pares de bases (bp). La secuencia consenso de la región intergénica ribosomal ITS obtenida para cada aislamiento se muestra en la tabla 1-2 (Ver Anexo B).

**Tabla 1-2.** Secuencias consenso de la región intergénica ribosomal (ITS) de los aislamientos fúngicos 26B y 45D.

| Aislamiento | Secuencia consenso de la región intergénica ribosomal (ITS)   |
|-------------|---|
| 26B         | TTCGGTAGGGGTGACCTGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCCTGTG<br>AACATACCTTATGTTGCCTCGGCGGATCAGCCCGCGCCCGTAAAAAGGGACGGCCCGCC<br>GCAGGAACCCCTAAACTCTGTTTTAGTGGAATTCTGAGTATAAAAAACAAATAAATCAA<br>AACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCAAAATGCGATA<br>AGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGC<br>CAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCCCAGCTTGGTG<br>TTGGGAGCTGCAGTCCTGCTGCACTCCCAAATACATTGGCGGTCACGTCGAGCTTCCAT<br>AGCGTAGTAATTTACACATCGTTACTGGTAATCGTCGCGGCCACGCCGTTAAACCCCAAC<br>TTCTGAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATC |
| 45D         | TGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCCTGTGAACATACCAATTGTTG<br>CCTCGGCGGATCAGCCCGCTCCCGTAAAACGGGACGGCCCGCCAGAGGACCCCAAACT<br>CTGTTTCTATATGTAACCTCTGAGTAAAACATAAAATAAATCAAACTTTCAACAACGGA<br>TCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCAAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCA<br>GAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGC<br>ATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCCCAGCTTGGTGTTGGGACTCGCGAGTC<br>AAATCGCGTTCCCAAATGATTGGCGGTCACGTCGAGCTTCCATAGCGTAGTAGTAAAA<br>CCCTCGTTACTGTAATCGTCGCGGCCACGCCGTTAAACCCCAACTTCTGAATGTTGACC<br>TCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATTCAA                  |

El árbol filogenético (*Neighbor-joining*) de la región intergénica ribosomal (ITS) se muestra en la Figura 1-11. En este se observa que ambos aislamientos corresponden al género *Fusarium* (100%), el aislamiento 26B se agrupa al con un grupo polifilético cercano a *F. graminearum* (FGSC), *F. asiaticum* (FGSC) y *F. culmorum* (99%), por su parte al

aislamiento 45D es ubicado dentro de un grupo monofilético cercano dentro del complejo fujikuroi (FFSC) (89%).



**Figura 1-11.** Árbol filogenético (*Neighbor-joining*) de la región intergénica ribosomal (ITS) construido con la base de datos Ribosomal *Database Project* de los aislamientos fúngicos 26B y 45D.

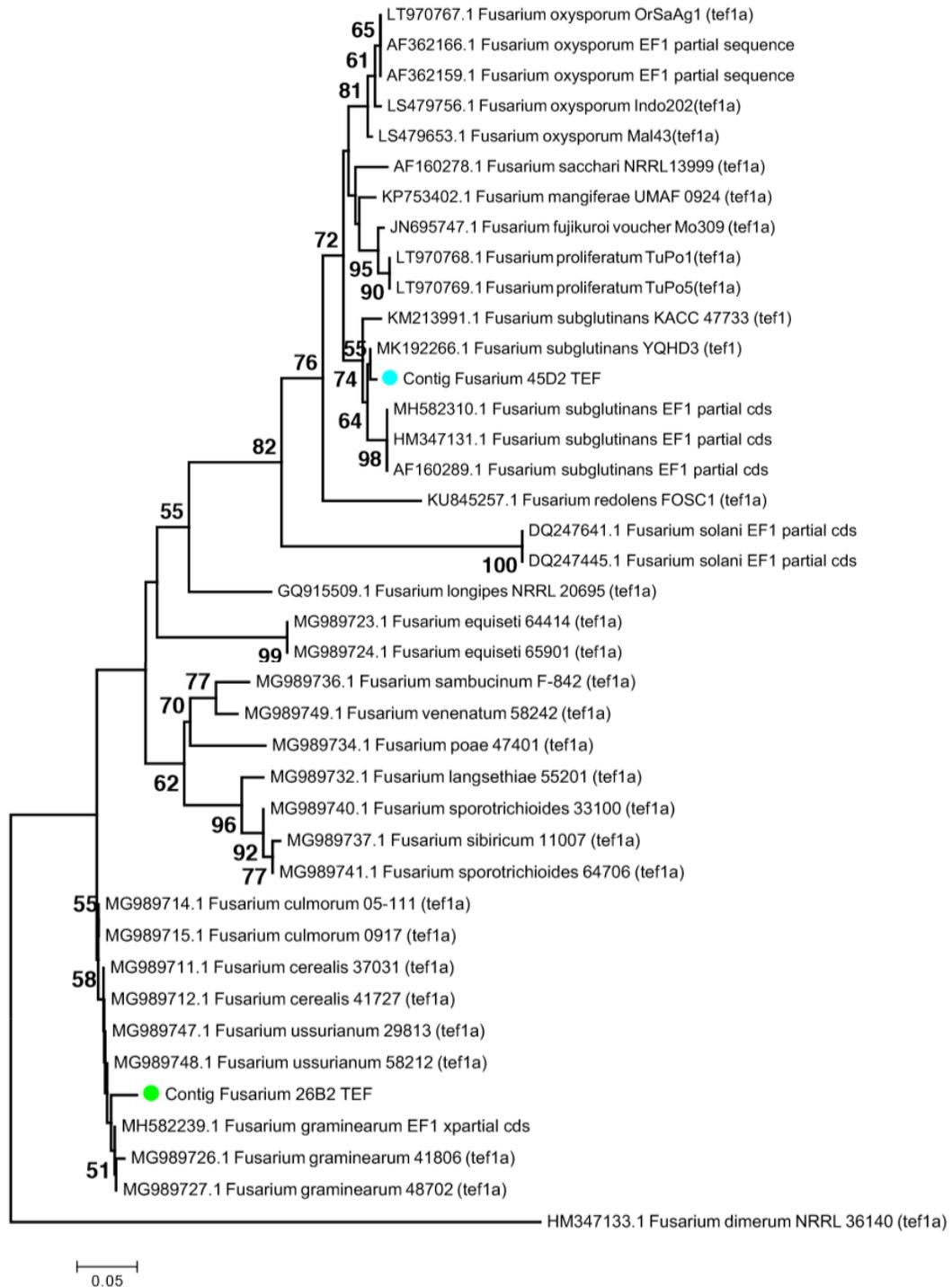
Por su parte el factor de elongación 1- $\alpha$  (EF1) amplificó un fragmento aproximado de 500 pares de bases (bp). La secuencia consenso obtenida para cada aislamiento se muestra en la tabla 1-3.

**Tabla 1-3.** Secuencias consenso del factor de elongación 1- $\alpha$  (EF1) de los aislamientos 26B y 45D de *Fusarium* spp.

| Aislamiento | Secuencia consenso del factor de elongación 1- $\alpha$ (EF1)   |
|-------------|---|
| 26B         | GAGCCCCCACCAGAAAAAATTTACGACAAAAGCCGCAAAAATTTTTGACCTTCGAAGC<br>GGGGTAAACAGGCGCGTATTTCGAGTCGTTTCGTGTGAGGCGATTTGAATGATGTTTTGAAA<br>CGGAAAAGGGCGCGCGATCGAGGAAAATGAGATCCAACCCCTTCTCGAACTTCTCGATGG<br>TTCGCTTGTGATACACCGCACTGGTAGATCCAAGTGACCCGGTCTATCCAAGGTATGT<br>CAGTACATTGGAAATTTGAAAACACCCCGAACCAAAATAATAGGCGGGTTGGATGCAG<br>TGTACTGCGCAGTGGCCCCGGGGACCCAACGAGGGGCACAGAGACAACCCAGGCGCGGAA<br>GAAGAGAAAGGAACCCCCGCGAGAGACGAGGACGGGGCGCAGTAAGAGAAAAGGCGGAAG<br>GGTACAGACAAACACAGATAGAGAGGGCCACCAGATCGAACAGTGCGGGGGAATAGACAAG<br>CGAACCATCGAGAAGTTTCGAGAAGGTTGGGCTCATTTTCCATAGATCGCGCGCCCTTTTCC<br>GTTTTCGAAACATCATTGAAATCGCCCTCACACGACGACTCGATACGCGCCTGTACCCCG<br>CTCGAGGTCAAAAATTTGCGGCTTTGTGTAATTTTTCTGGTGGGGCTCATACCCCGCC<br>ACTCGAGCCACAGGCGCTTGCCTCTTCCACAAAACCTTCCCTGGGCGCGCATCAC<br>GTGTCAATCAGTTACTAACCACCTGTCAATAGGAAGCCGCGAGCTCGGTAAGGGTTCT<br>TCAAGTACGCTGGGTTCTTGACAAGTAAAGAGCCCAAGAAGCCCTGGGCAGCTACCAGG<br>GGTTCGACCCACCAACTAAAGGGGGGGGGGGGAAGTGGCCAAACCTCCGAAGGGACCCG<br>AACACCCGGGAATAGCAACGGGGGACTGGGAATCTACCCAAGGGGAAGGAGCCATCGAA<br>CAAGCCCAACAAGCGATGAGATCCTCAAGTAATACGGGGTGAGGGCCATTTTTTTCTGC<br>AATGCGCTTTTTCTTTTTCAAACATCATTCAAACCTCCCCCGAACCAACCCGATTA<br>CCGCGCCTGGTTTACCCCGCTTCGAAAGGTTCAAAAAATTTTTGGGGGGCTTTTTTTT<br>TTCTTAAAATTTTTTTT |
| 45D         | AAAAAAAATTAAGGGTTAATAATTCGACAAAATTTTTGGTTCTCAAGGGGGGAGGG<br>GCAACGTTTCGAGTTGTAGGAGAATTGAGGCCAAGGGGGCCATCGAAAGGAAAAGTAAGC<br>TAAAGCCTTTGCTTGAATTTCCCGGATGTTAGCTTTCGAGAGCCAGCCGATTTGAAGA<br>TCAAGTACCCGTTTTGAAGGAGGTCCAGCCTTGTGATTAGTTATGAGATGCCCGCCAT<br>GTTTTGGTGGGATAAGGCGGAAGATAGAGCTGAATGGTGGGGTGTAATCCCCAGGGCC<br>CCGACTTCGGGCCAGTCGACCACTGTGAGTACTACCCTCGACGATGAGCTTATCTGCCAT<br>CGTTATCCCGACCAAGACCTGGCGGGCATCTCAGAAGATAACATGCTGACATCGCTTAC<br>AGACCGGTCACTTGATCTACCAGTGCGGTGGTATCGACAAGCGAACCATCGAGAAGTTCCG<br>AGAAGGTTAGTTACTTTCCCTTCGATCGCGCGTCTTTGCCATCGATTCTCCATACGAC<br>TCGAAACGTGCCCGCTACCCCGCTCGAGACCAAAAATTTTTCGATATGACCGTAATTTTT<br>TTGGTGGGGCATTACCCCGCCACTCGAGCAATGCGCGTTTCTGCCCTCCCATGCCACA<br>ACCTTCTGAGCGCATCGTACAGTGAAGCAGTCACTAACCATTGACAATAGGAAGCCG<br>CTGAGCTCGGTAAGGGTTCTTCAAGTACGCTGGGTTCTTGACAAGCTC   |

El árbol filogenético (*Neighbor-joining*) del factor de elongación 1- $\alpha$  (EF1) se muestra en la Figura 1-12. En este, el aislamiento 26B se agrupa con un clado que contiene dos especies pertenecientes a *Fusarium graminearum* species complex (FGSC) (*F. graminearum sensu stricto* y *F. ussurianum*) y *F. cerealis* siendo más cercano a la especie *F. ussurianum* (FGSC) (“*bootstrap*” de 58%) y *F. cerealis* con una distancia de 0,0019 calculada en la matriz y más distante a *F. graminearum sensu stricto* (FGSC) (distancias entre 0.0024 y 0.0029). El aislamiento 45D por otro lado, se agrupa con especies del complejo *fujikuroi*

(FFSC) (“*bootstrap*” de 72%) y con la especie *F. subglutinans* (“*bootstrap*” de 74%) con una distancia calculada en la matriz de 0.005.



**Figura 1-12.** Árbol filogenético (*Neighbor-joining*) del factor de elongación 1- $\alpha$  (EF1) construido de los aislamientos fúngicos de *Fusarium* spp. 26B y 45D

### 1.4.5 Prueba de patogenicidad de *F. graminearum* y *F. subglutinans* en plantas de maíz variedad regional Simijaca

Los aislamientos 45D de *F. subglutinans* (FFSC) y 26B de *F. graminearum* (FGSC) fueron patogénicos en plantas de maíz variedad regional Simijaca. A los 90 días después de la siembra y de la inoculación del patógeno a la semilla, las plantas mostraron necrosis y coloraciones rojizas o púrpura en la parte basal del tallo, sintomatologías similares a las observadas en campo (Figura 1-13).

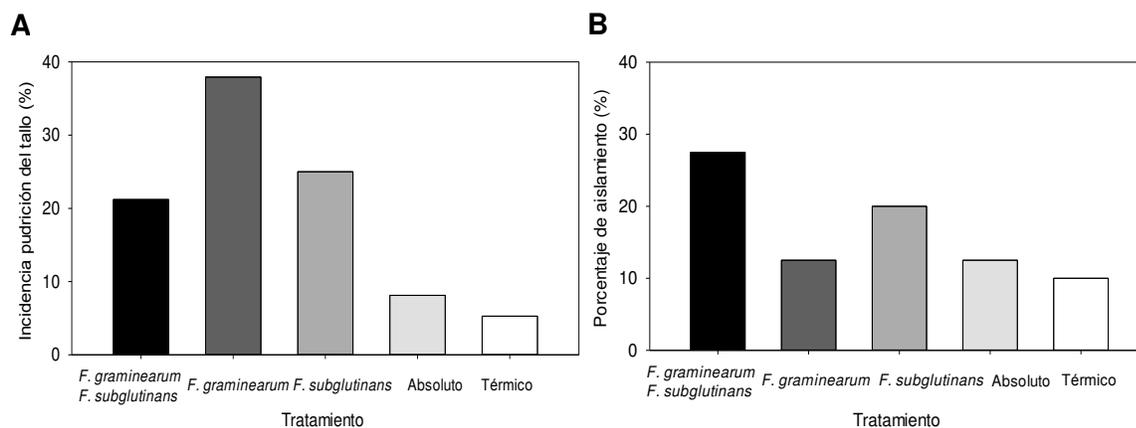


**Figura 1-13.** Sintomatología en cortes longitudinales de plantas de maíz variedad regional Simijaca inoculadas con dos especies de *Fusarium* y su combinación tres meses después de siembra (V9) bajo condiciones de invernadero. A) plantas inoculadas con la mezcla *F. subglutinans* (FFSC) y *F. graminearum* (FGSC). B) *F. graminearum*. C) *F. subglutinans*. D) control absoluto (semillas sin tratamiento) y E) control térmico (semillas tratadas con agua caliente a 52 °C).

*F. graminearum* mostró una tendencia a concentrarse sobre todo en los nudos de la planta de maíz, en tanto que *F. subglutinans* se ubicó preferentemente en los entrenudos, y con la combinación de ambas especies se presentó necrosis de nudos y entrenudos. Los controles usados indican que el tratamiento de la semilla de maíz con agua caliente a 52 °C por cinco minutos fue efectivo para reducir el potencial de inóculo endógeno de *Fusarium* spp. ya que las plantas no mostraron síntomas de necrosis en cuello, nudos y entrenudos. El control absoluto, es decir, la semilla sin ningún tratamiento mostró un grado de afectación bajo. El suelo proveniente de zonas no agrícolas en la sabana de Bogotá,

empleado en este ensayo fue probado como libre de *Fusarium*, y a partir del cual pocas colonias de *Aspergillus* y *Penicillium* fueron detectadas.

En la Figura 1-14a, se presenta la incidencia de pudrición del tallo. Los resultados muestran que plantas inoculadas con *F. graminearum* mostraron 40% de incidencia respecto al 25% observado en plantas inoculadas con *F. subglutinans* resultados que contrastan con la inoculación de las dos especies (20%). Plantas del control térmico y absoluto no superaron el 10% de afectación. Por su parte, el porcentaje de aislamiento de *Fusarium* spp. en medio PDA+BOA a partir de plantas de los diferentes tratamientos (Figura 1-14b) muestra un comportamiento contrario a la incidencia de la pudrición del tallo. En este caso, a partir de plantas inoculadas con *F. graminearum* se obtuvo la frecuencia de aislamiento más baja mientras que a partir de plantas inoculadas con *F. subglutinans* y la combinación de ambas especies, los porcentajes de aislamiento fueron mayores.



**Figura 1-14.** Incidencia de sintomatología en el tallo y porcentaje de aislamiento de *F. graminearum* (FGSC) y *F. subglutinans* (FFSC) en medio PDA-BOA, de plantas de maíz variedad regional Simijaca inoculadas con *F. graminearum* (FGSC), *F. subglutinans* (FFSC) y la combinación, tres meses después de siembra respecto al control absoluto y térmico.

## 1.5 Discusión

Bajo condiciones de campo en el valle de Ubaté, la pudrición del tallo de maíz de las variedades regionales Simijaca y Sogamoso fue detectada externamente como la combinación de la clorosis del cogollo, antocianocencia de las hojas y enanismo de la planta desde los 90 días después de siembra en el estado de desarrollo de nueve hojas verdaderas (V9). Una planta sana además de no presentar reducciones en el crecimiento, ni síntomas de clorosis o antocianocencia en hojas, en cortes longitudinales del tallo debe presentar principalmente color crema o con ligeras coloraciones marrones en el cuello y nudos de la planta. En plantas enfermas se observó una necrosis intensa de cuello y nudos, la cual avanza hacia los entrenudos y ocasionalmente se pueden presentar coloraciones púrpuras de la médula. Finalmente, el volcamiento como la manifestación final de la desintegración y pudrición basal del tallo puede ocurrir en cualquier etapa fenológica del cultivo.

La falta de continuidad del área necrótica de los nudos y entrenudos observada se puede explicar por la morfología, y habito de desarrollo del maíz, la cual es aprovechada para la diseminación del inóculo de *Fusarium* spp. Los nudos preformados por el meristemo apical están inicialmente contenidos en el cuello de la planta (Nielsen, 2008) y una vez inicia la etapa de elongación del tallo causan una infección sistémica de la planta. Lo anterior concuerda con las observaciones hechas en este estudio y las observaciones histológicas hechas por Lawrence *et al.* (1981) donde el hongo inicialmente confinado en las partes basales del tallo tuvo una rápida diseminación de micelio a través de la planta en el momento de la floración.

Sobre los residuos del cultivo de maíz, principalmente sobre los nudos del tallo se encontraron peritecios superficiales de *F. graminearum* y la sintomatología y signos

encontrados en este estudio se ajustaron a las reportadas para las pudriciones del tallo causadas por *F. graminearum* en maíz (CIMMYT, 2004). Debido a la similitud entre las sintomatologías causadas por *F. graminearum* y *F. verticillioides* (FFSC) y la alta frecuencia de aislamiento de *F. subglutinans* la pudrición del tallo en el valle de Ubaté es también causada por *F. subglutinans* la cual es una especie contenida en el antiguo complejo *fujikuroi* (FFSC).

Distinto a *F. graminearum* (FGSC) que es un hongo homotálico (Leslie y Summerell, 2006), *F. subglutinans* y *F. verticillioides* son heterotálicos. Esta condición, junto con la fertilidad femenina y otros factores de desarrollo, explican probablemente por qué los peritecios de *F. verticillioides* son raramente observados en la naturaleza pese a que son fácilmente inducibles en el laboratorio y es posible que lo mismo ocurriera en este estudio con *F. subglutinans*. Los análisis de compatibilidad en el laboratorio muestran que la reproducción sexual de *F. verticillioides* es común, lo que sugiere que diferente a *F. graminearum* donde las ascosporas funcionan como inóculo primario, la reproducción sexual en *F. verticillioides* y otras especies dentro del complejo *fujikuroi* (FFSC) contribuyen a la diversidad genética pero no es parte esencial de su ciclo de vida (Blacutt *et al.* 2018).

En este estudio, mayor frecuencia de aislamiento de colonias de *F. graminearum* y *F. subglutinans* se obtuvo a partir de la variedad Sogamoso. En conjunto para las variedades Simijaca y Sogamoso la frecuencia de aislamiento fue del 60% para todos los estados de desarrollo y del 46%, 64%, 82% y 92% en estados de desarrollo de tres, seis, nueve hojas verdaderas y espigamiento (V3, V6, V9 y VT, respectivamente).

En estados de desarrollo V3, la frecuencia de aislamiento de *Fusarium* spp. en el tallo fue baja respecto al cuello y raíz, mientras en los demás estados de desarrollo las frecuencias de aislamiento se incrementaron y fueron similares entre sí. Esto se ajusta a lo reportado

---

por Kedera *et al.* (1994), quienes sugieren que el incremento de la frecuencia de aislamiento a partir del tallo en el tiempo se debe a una fuente de inoculación aérea debido a que el cuello y partes aéreas de las plantas son infectadas múltiples veces en el tiempo por *F. verticillioides* (FFSC).

Las especies de *Fusarium* asociadas a las plantas de maíz de las variedades regionales Simijaca y Sogamoso identificadas morfológicamente y filogenéticamente reportados en el mundo como agentes causales de la pudrición del tallo de maíz correspondieron a *F. graminearum* (FGSC) y *F. subglutinans* (FFSC) (Leslie y Summerell, 2006).

Morfológicamente los linajes dentro *F. graminearum species complex* (FGSC) son indistinguibles, aunque filogenéticamente son distintos (Yli-Mattila *et al.* 2009) dentro de lo que se ha denominado *Fusarium graminearum species complex* (FGSC) (Summerell, 2019). En este estudio el aislamiento 26B identificado morfológicamente como *F. graminearum* (FGSC) filogenéticamente se agrupó dentro de *F. graminearum species complex* (FGSC) sin agruparse con un linaje en particular y siendo las especies más cercanas *F. cerealis* y *F. ussurianum* (FGSC). Dado que en este estudio se encontraron peritecios superficiales sobre los nudos del tallo de las plantas de maíz y estos fueron producidos *in vitro* sobre medio *Carnation Leaf Agar* (CLA) a partir de cultivos monospóricos y que el estado sexual de *F. cerealis* es desconocido (Leslie y Summerell, 2006) es probable que la especie de *Fusarium* aquí descrita pertenezca al homotálico *F. graminearum* (FGSC) y no a *F. cerealis*.

En Suramérica *F. boothii* (FGSC) 15ADON y *F. meridionale* (FGSC) que produce Nivalenol (NIV) (Sampietro *et al.* 2010) se supone son las especies endémicas dentro del complejo *Fusarium graminearum species complex* (Aoki *et al.* 2012). En Argentina, Uruguay y el sur de Brasil *F. graminearum sensu stricto* (FGSC) con el químico tipo 15 ADON ha sido la

especie más comúnmente descrita (Astolfi *et al.* 2011; Reynoso *et al.* 2011) aunque cierto grado de desplazamiento por quimio tipos 3-ADON ha sido documentado (Álvarez *et al.* 2009). En el oeste de Uruguay, *F. asiaticum* (FGSC) 3-ADON ha sido reportado en campos nuevos para la siembra de trigo, donde la siembra de arroz es común (Umpierrez, *et al.* 2013). Es posible que el linaje/población aquí descrita dentro de *F. graminearum species complex* (FGSC) pertenezca a alguno de los linajes/poblaciones o representen uno nuevo. Determinar las especies/linajes y quemo tipo a la cual pertenece el aislamiento 26B identificado filogenéticamente como *F. graminearum s.s.* y cercano a *F. ussurianum* dentro de FGSC es importante para determinar distribución de especies/linajes en el trópico frío de Colombia en Suramérica, así como para predecir el riesgo toxicológico y su agresividad. *F. ussurianum* es un linaje descrito en la parte norte de Rusia (Yli-Mattila, 2009; Stakheev *et al.* 2018) de la cual no se tiene registro en Suramérica y tiene la forma toxicológica 3 ADON que es más agresiva y futuros estudios deben abordar con profundidad estos aspectos.

Por su parte el aislamiento 45D identificado en este estudio como *F. subglutinans* puede representar dos especies crípticas distinguibles por AFLP: *F. subglutinans s.s.* y *F. temperatum* (Czembor *et al.* 2015; Fumero *et al.* 2016). Determinar la especie a la cual pertenece este aislamiento es importante para predecir su perfil toxicológico, ya que por ejemplo *F. temperatum* aparentemente produce fumonisinas (Wang *et al.* 2014), beauvericinas (BEA) y fusaproliferina en tanto que *F. subglutinans* no produce fumonisinas, aunque si produce otros tipos de micotoxinas como moniliforminas y fusaproliferina (Fumero *et al.* 2016).

Las pruebas de patogenicidad realizadas a partir de semillas de la variedad regional Simijaca indicaron que el aislamiento 26B de *F. graminearum* (FGSC) y 45D de *F. subglutinans* (FFSC) desarrollaron sintomatologías compatibles con las observadas

---

inicialmente en campo. *F. graminearum* parece causar necrosis principalmente en los nudos y cuello de la planta, en tanto que *F. subglutinans* en la médula y cuello. La combinación de ambas especies causó síntomas en cuello, nudos y entrenudos.

La baja frecuencia de aislamiento de *Pythium* sp. y *R. solani* junto con la ausencia de *D. zae* en todo el ciclo de desarrollo del cultivo de maíz se pueden explicar por las condiciones climáticas frías y secas preponderantes en el valle de Ubaté durante el ciclo de producción del año 2016 el cual presentó temperaturas promedio de 13,18 °C (inferiores al promedio histórico de 14 °C) y precipitación acumulada de 429 mm (inferior en 125 mm respecto al histórico) y las condiciones climáticas frías preponderantes durante el año 2017 con temperaturas promedio de 13,44 °C y una precipitación acumulada de 670 mm superior en 74 mm a los reportes históricos.

Las condiciones óptimas reportadas para el desarrollo de epidemias de pudrición del tallo a causa de *D. zae* corresponden a climas cálidos y húmedos (CIMMYT, 2004; Durán-Peralta, 2011; Varón y Sarria, 2007) en el caso de *R. solani* a condiciones frías y húmedas (Sumner y Bell, 1981) y en el caso de *Pythium* spp., condiciones frías y húmedas o cálidas y húmedas son las más adecuadas (CIMMYT, 2004; Zhang *et al.* 1998). Estos filtros impuestos por el ambiente y sus repercusiones sobre el fitobioma de maíz (Hawkes y Connor, 2017) hacen poco probable que la epidemia de pudrición del tallo en la zona de estudio haya sido causada por *D. zae*, *R. solani* y *Pythium* sp. y por el contrario, podrían haber sido propicias y conductivas de la pudrición del tallo causada por *F. graminearum* y *F. subglutinans*.

Las pudriciones causadas por *Fusarium* son favorecidas por diferentes óptimos de temperatura y regímenes de humedad, la causada por *F. graminearum* (FGSC) es predominante en áreas frías o con altos niveles de precipitación, en tanto que, la causada

por *F. verticillioides* (FFSC) es predominante en áreas cálidas y secas (Munkvold *et al.* 2018). En general hay un efecto latitudinal y altitudinal sobre la distribución de especies de *Fusarium* ya que en zonas cálidas tropicales y subtropicales prevalece *F. verticillioides* en tanto que en regiones templadas conforme incrementa la altitud *F. graminearum* y *F. subglutinans* son las especies dominantes, estos resultados se han encontrado en Norteamérica, Europa y Suramérica (Munkvold *et al.* 2018). Por otra parte, los óptimos de temperatura dentro de las especies antes contenidas dentro del complejo *fujikuroi* varían donde *F. subglutinans* (FFSC) es frecuente en zonas frías como se ha reportado en Perú y México (Figueroa *et al.* 2010; Logrieco *et al.* 1993; Reyes-Velázquez *et al.* 2011), en tanto que *F. verticillioides* es común en zonas cálidas siendo la especie más común en granos de maíz en Suramérica (Chulze *et al.* 1996) y la más común a nivel mundial (Munkvold *et al.* 2018), *F. temperatum* parece ser también común en zonas frías de Norteamérica, Argentina y Europa (Munkvold, 2017).

En este estudio la frecuente asociación entre *F. graminearum* y *F. subglutinans* con plantas de maíz con pudrición del tallo en el valle de Ubaté permiten inferir que las zonas de producción de clima frío y seco son óptimas para el desarrollo de la enfermedad a causa de *F. graminearum* y *F. subglutinans*, aunque la restricción en los niveles de humedad y precipitación podrían haber evitado epidemias aún más severas a causa de *F. graminearum*.

---

## 1.6 Conclusiones

- i. Las variedades regionales Sogamoso y Simijaca fueron susceptibles a la pudrición del tallo de maíz y la enfermedad fue detectada en campo como la combinación de los síntomas externos de clorosis del cogollo, antocianocencia de las hojas y enanismo de la planta desde los 90 días después de siembra cuando las plantas tenían nueve hojas verdaderas (V9).
- ii. En cortes longitudinales del tallo se observó una necrosis intensa de cuello y nudos, la necrosis avanza hacia los entrenudos y ocasionalmente se pueden presentar coloraciones púrpuras de la médula. Finalmente, el volcamiento como la manifestación final de la desintegración y pudrición basal del tallo puede ocurrir en cualquier etapa fenológica del cultivo.
- iii. Las especies de *Fusarium* asociadas a la pudrición del tallo de maíz en el mundo y encontradas asociadas a las variedades regionales Simijaca y Sogamoso fueron identificadas morfológicamente y molecularmente en este estudio como *F. graminearum* (FGSC) y *F. subglutinans* (FFSC).
- iv. Las pruebas de patogenicidad confirmaron a *F. graminearum* (FGSC) y *F. subglutinans* (FFSC) como los agentes causales de la pudrición del tallo de maíz variedad regional Simijaca en forma individual o conjunta causando síntomas necróticos y coloraciones purpuras en cuello, nudos y entrenudos de las plantas 90 días después de siembra
- v. En este estudio la frecuente asociación entre *F. graminearum* (FGSC) y *F. subglutinans* (FFSC) con plantas de maíz con pudrición del tallo en el valle de Ubaté permiten inferir que las zonas de producción de clima frío y seco son óptimas y conductivas para el desarrollo de la enfermedad a causa de *F. graminearum* y *F. subglutinans*.

## 1.7 Bibliografía

Álvarez, C.L., Azcarate, M.P., y Pinto, V.F. (2009). Toxigenic potential of *Fusarium graminearum sensu stricto* isolates from wheat in Argentina. *International Journal of Food Microbiology*. 135:131–135.

Aoki, T., Ward, T.J., Kistler, H.C., y O'Donnell, K. (2012). Systematics, phylogeny and trichothecene mycotoxin potential of *Fusarium* head blight cereal pathogens. *Mycotoxins*. 62:91–102

Astolfi, P., Dos Santos, J., Schneider, L., Gomes, L.B., Silva, C.N., Tessmann, D.J., y Del Ponte, E.M. 2011. Molecular survey of trichothecene genotypes of *Fusarium graminearum species complex* from barley in southern Brazil. *International Journal of Food Microbiology*. 148:197–201

Bacon, C. W., Glenn, A. E., y Yates, I. E. (2008). *Fusarium verticillioides*: managing the endophytic association with maize for reduced fumonisins accumulation. *Toxin Reviews*, 27(3-4), 411–446. doi:10.1080/15569540802497889

Barnett, H., y Hunter, B. (1999). Illustrated genera of imperfect Fungi. St. Paul, Minnesota, USA: APS PRESS. 218 pp.

Blacutt, A. A., Gold, S. E., Voss, K. A., Gao, M., y Glenn, A. E. (2018). *Fusarium verticillioides*: Advancements in Understanding the Toxicity , Virulence , and Niche Adaptations of a Model Mycotoxigenic Pathogen of Maize. *Phytopathology*, 108(3), 312–326

Broders, K. D., Lipps, P. E., Paul, P. a., y Dorrance, A. E. (2007). Evaluation of *Fusarium graminearum* Associated with Corn and Soybean Seed and Seedling Disease in Ohio. *Plant Disease*, 91(21), 1155–1160. doi:10.1094/PDIS-91-9-1155

Centro Internacional de Mejoramiento del Maíz y Trigo (CIMMYT). (2004). Maize Disease: A Guide for Field Identification. 4th edition. México, DF. 119 pp.

Chulze, S.N., Ramirez, M.L., Farnochi, M.C., Pascale, M., Visconti, A., y March, G. (1996). *Fusarium* and fumonisin occurrence in Argentinian corn at different ear maturity stages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44 (9), 2797–2801

Czembor, E., Stepien, L., y Waskiewics, A. (2015). Effect of Environmental Factors on

*Fusarium* Species and Associated Mycotoxins in Maize Grain Grown in Poland. *PLoS ONE*, 1–18. doi:10.1371/journal.pone.0133644.

Daniels, B. A. (1983). Elimination of *Fusarium moniliforme* from corn seed. *Plant Disease*, 67: 609-611

De Biazio, G. R., Leite, G. G. S., Tessmann, D. J., y Barbosa-Tessmann, I. P. (2008). A new PCR approach for the identification of *Fusarium graminearum*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39(3), 554–560. doi:10.1590/S1517-83822008000300028.

Dodd, J. L. (1980). The Role of Plant Stresses in Development of Corn Stalk Rots. *Plant Disease*, 64(6), 533–537

Durán-Peralta, E. (2011). *Detección de Erwinia chrysanthemi pv. zae en maíz en Morelos, México*. Institución de enseñanza e investigación en Ciencias Agrícolas. Montecillo, Texcoco, México. 54 pp.

Faria, C. B., Abe, C. A. L., Da Silva, C. N., Tessmann, D. J., y Barbosa-Tessmann, I. P. (2012). New PCR assays for the identification of *Fusarium verticillioides*, *Fusarium subglutinans*, and other species of the *Gibberella fujikuroi* complex. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(1), 115–132. <https://doi.org/10.3390/ijms13010115>

Figuroa-Rivera, M.G., Rodríguez-Guerra, R., Guerrero-Aguilar, B.Z, González-Chavira M.M., Pons-Hernández, J.L., Jiménez-Bremont, J.F., Ramírez-Pimentel, J.G., Andrio-Enríquez, E., y Mendoza-Elos, M. (2010) Caracterización de especies de *Fusarium* asociadas a la pudrición de raíz de maíz en Guanajuato, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 28:124–134

Fumero, M. V., Sulyok, M., & Chulze, S. (2016). Food additives & contaminants : Part A Ecophysiology of *Fusarium temperatum* isolated from maize in Argentina. 33 (1), 147–156. <https://doi.org/10.1080/19440049.2015.1107917>

Glenn, A. E., Hinton, D. M., Yates, I. E., y Bacon, C. W. (2001). Detoxification of Corn Antimicrobial Compounds as the Basis for Isolating *Fusarium verticillioides* and Some Other *Fusarium* Species from Corn. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(7), 2973–2981. doi:10.1128/AEM.67.7.2973-2981.2001

Goswami, R., y Kistler, C. (2004). Pathogen profile Heading for disaster : *Fusarium graminearum* on cereal crops. *Molecular Plant Pathology*, 5(6), 515–525.

doi:10.1111/J.1364-3703.2004.00252.X

Hawkes, C. V, y Connor, E. W. (2017). Translating Phytobiomes from Theory to Practice : Ecological and Evolutionary Considerations. *Phytobiomes*, 1(2), 57–69. <https://doi.org/10.1094/PBIOMES-05-17-0019-RVW>

Kedera, C., Leslie , J., y Clafflin, L. (1994). Genetic diversity of *Fusarium* Section Liseola (*Gibberella fujikuroi*) in individual Maize stalks. *Phytopathology*, 84, 603-607

Kimura M. (1980). “A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences”. *Journal of Molecular Evolution* 16: 111–120. DOI:10.1007/BF01731581. PMID 7463489.

Lawrence , E., Nelson, P., y Ayers, J. (1981). Histopathology of sweet corn seed and plants infected with *Fusarium moniliforme* and *F. oxysporum*. *Phytopathology*, 71, 379-386

Lee, T. Van Der, Zhang, H., Diepeningen, A. Van, y Waalwijk, C. (2015). Biogeography of *Fusarium graminearum* species complex and chemotypes : a review. *Food Additives y Contaminants: Part A*, 32(4), 453–460. <https://doi.org/10.1080/19440049.2014.984244>

Leslie , J.F y Summerell, B. (2006). *The Fusarium laboratory manual*. USA: *Blackwell publishing*. Iowa, USA. 387 pp.

Leyva-Madriral, K. Y., Larralde-Corona, C. P., Apodaca-Sánchez, M. A., Quiroz-Figueroa, F. R., Mexia-Bolaños, P. A., Portillo-Valenzuela, S., y Maldonado-Mendoza, 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 (6), 486–497. <https://doi.org/10.1111/jph.12346>

Logrieco, A., Moretti, A., Altomare, C., Bottalico, A., y Torres, E.C. (1993). Ocurrence and toxicity of *Fusarium sublutinans* from Peruvian maize. *Mycopathologia*. 122 (3), 183-190

Madden, L.V., Hughes, G., y Van Den Bosch, F. (2007). The Study of Plant disease Epidemics. *The American Phytopathological Society, APS Press* St. Paul, Minnesota, USA. 421 pp.

Munkvold, G. P., Arias, S., Taschl, I., y Gruber-Dorninger, C. (2018). Mycotoxins in Corn: Occurrence, Impacts, and Management. In *Corn* (3rd ed.). 235-287p. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-811971-6.00009-7>

- Munkvold, G.P. (2017). *Fusarium* species and their associated mycotoxins. In: Moretti, A., Susca, A. (Eds.), *Mycotoxigenic Fungi. Methods in Molecular Biology*. In: vol. 1542. Humana Press, New York, pp. 51–106
- Nielsen, R. (2008). Growing point location in corn at different growth stages, *Purdue University*. Retrieved from Corny News Network: <http://www.kingcorn.org>
- O'Donnell K, Nirenberg HI, Aoki T, y Cigelnik E. (2000) A multigene phylogeny of the *Gibberella fujikuroi* species complex: detection of additional phylogenetically distinct species. *Mycoscience*, 41:61–78
- Ortiz , H., León , J., Rivero, M., y Hoyos-Carvajal, L. (2011). *Manual de prácticas de fitopatología general* . Bogotá: Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá. 80 pp.
- Reid, L. M., Nicol, R. W., Ouellet, T., Savard, M., Miller, J. D., Young, J. C., Stewart, D. W., y Schaafsma. A. W. (1999). Interaction of *Fusarium graminearum* and *F. moniliforme* in maize ears: Disease progress, fungal biomass, and mycotoxin accumulation. *Phytopathology*, 89(11):1028-1037
- Reyes-Velázquez, W. P., Figueroa-Gómez, R.M., Barberis, M., Reynoso, M.M., Rojo, F.G.A., Chulze, S.F., y Torres A.M. (2011) *Fusarium* species (section Liseola) occurrence and natural incidence of bauvericin, fusaproliferin and fumonisins in maize hybrids harvested in Mexico. *Mycotoxin Research*, 27:187–194
- Reynoso, M. M., Ramirez M.L., Torres A.M., Chulze S.N. (2011). Trichothecene genotypes and chemotypes in *Fusarium graminearum* strains isolated from wheat in Argentina. *International Journal of Food Microbiology*. 145:444–448
- Ritchie, S. W., J. J. Hanway, y G. O Benson. 1996. How a Corn Plant Develops. Iowa State University Cooperative Extension Special Report No. 48. Ames, Iowa, USA.
- Sampietro, D.A, Marín, P., Iglesias, J., Presello, D.A., Vattuone, M.A., Catalan, C.A.N., y Gonzalez-Jaen MT. (2010). A molecular based strategy for rapid diagnosis of toxigenic *Fusarium* species associated to cereal grains from Argentina. *Fungal Biology*. 114:74–81
- Stakheev, A. A., Samokhvalova, L. V, Mikityuk, O. D., y Zavriev, S. K. (2018). Phylogenetic Analysis and Molecular Typing of Trichothecene-Producing *Fusarium* Fungi from Russian Collections. *Acta Naturae*, 10(37), 79–92.
- Sukamaran, J. y Knowles L.L. (2017). Multispecies coalescent delimits structure, not species. *Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)*, 114:1607– 12

Summerell, B. A. (2019). Resolving *Fusarium*: Current Status of the Genus. *Annual Review of Phytopathology*, 57, 323–339.

Sumner, D. R., y Bell, D. K. (1981). Root disease induced in corn by *Rhizoctonia solani* and *Rhizoctonia zea*. *Phytopathology*, 72: 86-91

Tamura K. (1992). “Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G+C content biases”. *Molecular Biology and Evolution*. 9 (4): 678–687.

Umpiérrez-Failache, M., Garmendia, G., Pereyra, S., Rodríguez- Haralambides, A., Ward, T.J., y Vero S. (2013). Regional differences in species composition and toxigenic potential among *Fusarium* head blight isolates from Uruguay indicate a risk of nivalenol contamination in new wheat production areas. *International Journal of Food Microbiology*. 166:135–140.

Varón, F., y Sarria, G. (2007). Enfermedades del maíz y su manejo. In *Instituto Colombiano Agropecuario*. Palmira, Colombia. 56 pp.

Wang, J.H., Zhang, J.B., Li, H.P., Gong, A.D., Xue, S., Agboola, R.S., Liao, Y.C. (2014). Molecular identification, mycotoxin production and comparative pathogenicity of *Fusarium temperatum* isolated from maize in China. *Phytopathology*. 162(3):147–157

Warham, E. J., Butler, L. D., y Sutton, R. C. (2008). Ensayos para la semilla de maíz y de trigo. *CIMMYT*, 84 pp.

White, T. J.; Bruns, T.; Lee, S.; y Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal rRNA genes for phylogenetics. In: Innis, A.M.; Gelfand, D.H.; Sninsky, J.J.; y White, T.J. (Eds.). *PCR protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press, San Diego, 315-322

Wicklow, D. T. (1988) Patterns of fungal association with maize kernels harvested in North Carolina. *Plant Disease*, 72: 113–115

Wicklow, D. T., Roth, S., Deyrup, S. T., y Gloer, J. B. (2005). A protective endophyte of maize: *Acremonium zea* antibiotics inhibitory to *Aspergillus flavus* and *Fusarium verticillioides*. *Mycological Research*, 109 (Pt5), 610–618. doi:10.1017/S0953756205002820

Wilke, A. L., Bronson, C. R., Pathology, P., y Tomas, A. (2007). Seed Transmission of *Fusarium verticillioides* in Maize Plants Grown Under Three Different Temperature

Regimes. *Plant Disease*, 91 (9), 1109–1115

Yates, I. E., Bacon, C. W., y Hinton, D. M. (1997). Effects of Endophytic Infection by *Fusarium moniliforme* on Corn Growth and Cellular Morphology. *Plant Disease*, 81(7), 723–728

Yli-Mattila, T., Gagkaeva, T., Ward, T., Aoki, T., Kistler, H.C. and O'Donnell, K. (2009). A novel Asian clade within the *Fusarium graminearum species complex* includes a newly discovered cereal head blight pathogen from the Russian Far East *Mycologia*, 101(6), 841–852. <https://doi.org/10.3852/08-217>

Zhang, B. Q., Chen, W. D., y Yang, X. B. (1998). Occurrence of *Pythium* species in long-term maize and soybean monoculture and maize / soybean rotation. *Mycological Research*, 102(12), 1450–1452. doi:10.1017/S0953756298006510



## **2. Capítulo II: Asociación *Fusarium graminearum* y *Fusarium subglutinans* - maíz (*Zea mays* L.) bajo condiciones del valle de Ubaté**

### **2.1 Resumen**

En lotes comerciales de maíz bajo condiciones del valle de Ubaté en Cundinamarca, inóculo de *Fusarium graminearum* (*Fusarium graminearum* species complex) (FGSC) fue detectado en residuos de cosecha de maíz en pie, el aire y la semilla en tanto que, el inóculo de *Fusarium subglutinans* (*Fusarium fujikuroi* species complex) (FFSC) fue encontrado en la semilla y en los detritos del cultivo presentes en el suelo. Se encontró que la planta de maíz es colonizada por *F. subglutinans* y *F. graminearum* desde la semilla y conforme avanza el ciclo del cultivo, la frecuencia de ambas especies se incrementa y síntomas como clorosis, enanismo y antocianocencia asociados a futuro volcamiento, son visibles externamente en el estado de desarrollo de nueve hojas verdaderas (V9) cuando la frecuencia de aislamiento de *F. graminearum* iguala y supera la de *F. subglutinans*. La inoculación individual de *F. subglutinans* y *F. graminearum* generó 90 días después de siembra, plantas de mayor longitud y menor diámetro del tallo comparadas con plantas bajo la inoculación conjunta de ambas especies. La mediana del estado de desarrollo de las plantas sugiere una hoja de ventaja de las plantas de maíz inoculadas con *F. subglutinans*. A nivel histológico se detectaron acumulaciones de lignina en forma de anillo exterior en el tallo de plantas de maíz crecidas en suelo naturalmente infestado por *Fusarium* spp. Bajo condiciones de campo se encontró mayor incidencia de pudrición del tallo y posterior volcamiento de plantas ante episodios de limitada disponibilidad de agua y episodios de frío con temperaturas inferiores a 10 °C de hasta seis horas. La ocurrencia

del volcamiento se manifestó uno o dos meses después del episodio de estrés dependiendo de la intensidad y estado de desarrollo del cultivo de maíz. Bajo condiciones óptimas para el cultivo, la pudrición del tallo no se debería desarrollar a pesar de que la variedad de maíz regional Simijaca está frecuentemente asociada a *F. subglutinans* y *F. graminearum* durante todas sus etapas de desarrollo, sin contribuir con ello a la contaminación de los granos por micotoxinas.

## 2.2 Introducción

Desde el punto de vista del patógeno *Fusarium* spp. produce una amplia variedad de esporas que son transportadas a través de la atmosfera, ejemplos de ello son *Fusarium graminearum* (*Fusarium graminearum* species complex) (FGSC), *Fusarium verticillioides* (*Fusarium fujikuroi* species complex) (FFSC) y *Fusarium proliferatum* (FFSC), los cuales puede ingresar a la planta a través de tricomas, xilema de la hoja y los tejidos del tallo (Lawrence *et al.* 1981; Maldonado-Ramirez *et al.* 2005; Nguyen *et al.* 2016; Nguyen *et al.* 2015). Las plantas de maíz pueden ser infectadas a través del aire, gotas de lluvia, insectos y semilla, esta última infectada por medio de los pistilos (Duncan y Howard, 2010; Munkvold *et al.* 1997; Ooka y Kommedahl, 1977; Windels *et al.* 1976). Dado que las esporas son pasivamente transportadas por el viento cualquier característica del paisaje influencia su movimiento e impacta su diseminación y deposición (Plantegenest *et al.* 2007, Schmale *et al.* 2006). En primavera el aumento de la temperatura y humedad favorecen la formación de los peritecios de *F. graminearum* sobre los residuos del cultivo y en la noche debido al incremento en la humedad, las esporas son liberadas y descargadas con fuerza en la capa turbulenta de la atmosfera (Default *et al.* 2006, Prussin, 2013, Trail *et al.* 2005).

*Fusarium verticillioides* (FFSC) está asociado con el maíz en la mayoría de los estados del ciclo de desarrollo comportándose como parasito y saprofito. El estado endófito sin causar daño aparente es transitorio y el hongo varía entre biótrofo asintomático y patógeno hemibiótrofo (Schulz *et al.* 1999a). La infección asintomática por *F. verticillioides* es similar a la de la mayoría de los hongos mutualistas de pastos (Baayen y Rykenbuerg, 1999), una extensiva revisión de la evidencia de endófitos de *Fusarium* en plantas silvestres y cultivadas la hacen Kuldau y Yates, (2000). Esta asociación endófito se cree se mantiene por factores inherentes tanto al hongo y el hospedero que conducen a una asociación balanceada entre los dos organismos (Schulz *et al.* 1999b).

Cuando las condiciones ambientales son favorables para la enfermedad un rango de virulencia es observado entre cepas de *F. verticillioides* y maíz. Sin embargo, cepas que pueden ser muy virulentas se comportan de forma asintomática bajo condiciones óptimas de crecimiento del cultivo (Bacon *et al.* 1994). La asociación asintomática de *F. verticillioides* en maíz podría representar ventajas para el hongo como un ambiente protegido y húmedo, transmisión vertical y horizontal mediada por la planta y una fuente segura de nutrición (Kuldau y Yates, 2000).

Desde el punto de vista del hospedero, la asociación podría ser también benéfica para la planta ya que un ligero pero significativo incremento en el peso, altura y diámetro del tallo en plantas inoculadas con *F. verticillioides* a los 28 días después de siembra y diferencias en la síntesis de lignina entre los brotes no infectados e infectados a los 14 días después de siembra fueron observados en plantas de maíz, sin afectar con ello el porcentaje de germinación de las semillas (Yates *et al.* 1997). La infección de granos de maíz con *F. verticillioides* (FFSC) los protege contra la infección por *F. graminearum* (FGSC) y otros 10 hongos que también infectan granos (Van Wyck *et al.* 1988, Wicklow, 1988). La fase

biótrofa de *F. verticillioides* se caracteriza por tener hifas con membranas interfaciales que están activas metabólicamente al menos por 60 días, las cuales separan al hongo de la membrana plasmática de la planta asegurando con ello menos daño al hospedero y resultan ser un vertedero eficiente para la absorción de nutrientes, tal como un haustorio especializado ya que el apoplasto y el simplasto son continuos (Bacon y Hinton, 1996; Canny, 1995; Kulda y Bacon, 2008; Yates *et al.* 1999).

Las plantas poseen una variedad de mecanismos de defensa en respuesta a hongos fitopatógenos, que incluyen la liberación de compuestos de bajo peso molecular que matan o inhiben el crecimiento de hongos invasores (Osbourn, 1999). El maíz, trigo y centeno producen ácidos hidroxámicos DIMBOA (2,4-dihidroxi-7-metoxi-2H-1,4-benzoxazin-3-one) y DIBOA (2,4-dihidroxi-2H-1,4-benzoxazin-3-one) como parte de su rutina de desarrollo (Niemeyer, 1988), las cuales se degradan a las correspondientes benzoxazolinonas, 6-metoxi-2-benzoxazolinona (MBOA) y 2-benzoxazolinona (BOA) (Hashimoto y Shudo, 1996).

Un limitado número de especies de *Fusarium* tienen la capacidad de detoxificar MBOA y BOA, siendo *F. verticillioides* (FFSC), *F. subglutinans* (FFSC) y *F. graminearum* (FGSC) las más tolerantes (Glenn *et al.* 2001). La detoxificación de BOA no incrementa la virulencia de *F. verticillioides* hacia las plántulas de maíz (Glenn *et al.* 2002). Datos *in vitro* sugieren que la colonización inicial de sustratos que contienen BOA por hongos tolerantes podría aumentar la tasa de colonización de hongos menos tolerantes (Saunders y Kohn, 2008). La asociación endofítica con maíz aparentemente es antigua y con implicaciones evolutivas dado que todos los aislamientos de maíz de *F. verticillioides* pueden detoxificar los benzoxazinoideos (Glenn *et al.* 2001). La capacidad de detoxificar estos compuestos y

su alta concentración en raíces ha sido interpretada como la razón fundamental por la cual la colonización endofítica no se previene (Xie *et al.* 1991).

Un concepto que puede ayudar a explicar la pudrición del tallo de maíz y los mecanismos de resistencia a parásitos débiles facultativos, y que unifica la interacción hospedero, patógeno y ambiente se denomina “*balance fotosintético entre el estrés y la translocación*” y este considera que sí un vertedero es establecido, una fuente de estrés aplicada a la planta bajo condiciones ambientales específicas puede predisponer la planta de maíz a la pudrición del tallo y favorece uno de los hongos ubicuos causantes de la pudrición del tallo sobre los otros (Dodd, 1980). Cuando el tejido pierde su sistema de defensa debido a la senescencia celular, cuando la planta se compromete en llenar el grano y hay deficiencia de carbohidratos a causa de una insuficiencia en la fotosíntesis y la competencia con la translocación al grano se presenta, las raíces y tallos de la planta son degradados por varios microorganismos (Whitney y Mortimore, 1957).

*Fusarium spp.*, *Diplodia spp.*, *Colletotrichum graminicola* y *Macrophomina phaseolina* son hongos ubicuos asociados a la pudrición del tallo, por lo que su identificación en poco contribuye al control de la enfermedad y el estudio de la variable hospedero-ambiente es lo pertinente (Dodd, 1980). Varios estreses ambientales han sido asociados con la ocurrencia de la pudrición del tallo entre los que se incluyen la reducción en la fotosíntesis a causa de poca luminosidad, alta densidad de siembra, ataque de plagas, déficit hídrico y el uso de fertilizantes con alto contenido de nitrógeno y bajo contenido de potasio (Blandino *et al.* 2009; Dodd, 1980). En cuanto a la producción de micotoxinas se sabe que principalmente la temperatura y la actividad del agua modulan la producción de fumonisinas en el complejo *fujikuroi* (FFSC) (Bacon *et al.* 2008) y de deoxinivalenol (DON) en el complejo *graminearum* (FGSC) (Matilla, 2010).

Se ha reportado que bajas temperaturas reducen el metabolismo de las semillas y plantas, disminuyen su vigor e incrementan el riesgo de enfermedades. Temperaturas iguales o inferiores a 10 °C son las más perjudiciales para el establecimiento del maíz y el grado de daño será mayor en suelos pesados o de pobre drenaje (Saab y Steve, 2006). Reddy y Holbert (1926) reportaron que semillas infectadas por *Diplodia* spp. y *Fusarium* spp. reducen su porcentaje de establecimiento cuando se siembran en suelos fríos y húmedos.

Tomando en cuenta lo anterior, este capítulo describe los aspectos más importantes de la biología de *F. graminearum* (FGSC) y *F. subglutinans* (FFSC), agentes causales de la pudrición del tallo en la zona de estudio, su efecto sobre el crecimiento y desarrollo del maíz y la relación de las condiciones de clima y paisaje preponderantes con el desarrollo de la enfermedad durante un evento de niño tropical presentado en los años 2016 y 2017 en el sistema de producción de maíz de clima frío en la variedad regional Simijaca en el valle de Ubaté.

## **2.3 Metodología**

### **2.3.1 Sintomatología y aislamientos de *Fusarium* spp. a partir de semilla de maíz**

Semillas de maíz variedad regional Simijaca se lavaron con agua corriente, se desinfectaron en una solución de hipoclorito de sodio al 5% por tres minutos, luego se sometieron a tres lavados con agua destilada estéril (ADE) y fueron puestas a germinar en cámaras de Blotter (Warham *et al.* 2008). Las cámaras de Blotter consistieron en recipientes de plástico transparente previamente desinfectados con etanol al 70%, con dos capas de papel absorbente en la base, humedecidas con ADE, sobre las cuales se pusieron a germinar 40 semilla por cámara a temperatura ambiente ( $\pm 20$  °C). Ocho cámaras de Blotter fueron inspeccionadas durante veinte días y se registró la sintomatología observada tanto en las semillas como en las plántulas desarrolladas. Posteriormente, se determinó la frecuencia de colonias fúngicas en el material vegetal diez días después del montaje. Las colonias de *Fusarium* spp. fueron aisladas de forma directa en medio *Potato Dextrose Agar* (PDA) (Oxoid®) acidulado al 0,1% (v/v) con ácido láctico al 85% e incubadas en oscuridad a 25 °C. De forma adicional, se realizaron aislamientos a partir de las plántulas en medio PDA enmendado con 2-benzoxaxolinone (BOA) (0,33 g/L) (Glenn *et al.* 2001). Los aislamientos obtenidos se identificaron morfológicamente y se conservaron a -70 °C en glicerol al 15% esterilizado en autoclave según Leslie y Summerell, (2006).

### **2.3.2 Aislamientos de *Fusarium* spp. asociados a la pudrición del tallo de maíz a partir de suelo**

Muestras de suelo proveniente de lotes con historial de pudrición del tallo en Simijaca, Cundinamarca y suelo sin uso agrícola de la sabana de Bogotá fueron llevadas al laboratorio Clínica de Plantas, de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá para análisis microbiológico (Anexo E). Este análisis se realizó por medio de diluciones estándar en base 10 partiendo de 100 g de suelo (Leslie y Summerell, 2006) y posterior siembra en placa de las diluciones  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  y  $10^{-6}$  en los medios PDA y *Nutrient Agar* (NA) (Oxoid®) con cinco repeticiones por factor de dilución. Adicionalmente, hojas de plántulas de maíz variedad regional Simijaca y hojas de clavel usadas como cebos se evaluaron como alternativa para confirmar la presencia de *Fusarium* spp. en estas mismas muestras de suelo. Para esto, las hojas de las dos especies se desinfectaron superficialmente con hipoclorito de sodio al 1% por 30 segundos y se sometieron a tres lavados con ADE. El suelo a evaluar se dispuso en cajas de Petri y se humedeció con ADE hasta saturarlo y sobre la superficie se colocaron cuatro hojas de maíz o clavel por caja. Las muestras se incubaron a 25 °C bajo un fotoperiodo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad por treinta días y se realizaron aislamientos del micelio presente sobre el tejido de los cebos usados en medio de cultivo PDA-BOA (0,33 g/L) (Glenn *et al.* 2001). Los aislamientos se identificaron morfológicamente y se conservaron a -70 °C en glicerol al 15% esterilizado en autoclave (Leslie y Summerell, 2006).

### **2.3.3 Aislamientos de *Fusarium* spp. asociados a la pudrición del tallo de maíz a partir de detritos**

Muestras de suelo de lotes con historial de pudrición del tallo en Simijaca fueron recolectadas y llevadas al laboratorio, donde se secaron a temperatura ambiente ( $\pm 20$  °C) por una semana. Los detritos presentes en el suelo fueron recuperados con un tamiz de 1,0 mm de apertura, lavados con tres enjuagues con ADE (Leslie y Summerell, 2006) y

sembrados en medio PDA y medio PDA-BOA (0,33 g/L) (Glenn *et al.* 2001), enmendados con sulfato de estreptomicina y cloranfenicol. Después de 10 días, los aislamientos obtenidos se identificaron morfológicamente y se conservaron a -70 °C en glicerol al 15% esterilizado en autoclave (Leslie y Summerell, 2006).

### **2.3.4 Aislamientos de *Fusarium* spp. asociados a la pudrición del tallo de maíz a partir de aire**

Un lote en Simijaca sembrado con maíz durante el primer semestre de 2017 ubicado al lado de un lote con residuos de cosecha de maíz en pie con presencia de peritecios de *F. graminearum* (FGSC) visibles sobre los tallos, fue seleccionado para la evaluación de captura de esporas de *Fusarium* spp. en trampas correspondientes a láminas porta objetos cubiertas con cuatro medios de cultivo evaluados para este fin. Los medios de cultivo correspondieron a PDA, *Water Agar* (WA) (Oxoid®), medio BOA (15 g de peptona, 1,0 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,5 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 20 g de agar, 1,0 litro de agua destilada y 1,0 g de 2-benzoxazolinone (Aldrich ®) y medio PDA-BOA (1,0 g de 2-benzoxazolinone/L) (Glenn *et al.* 2001). BOA fue preparado en etanol absoluto y se adicionó al medio después de auto clavado y enfriado a 50 °C. Todos los medios usados, fueron enmendados con cloranfenicol y sulfato de estreptomicina. Las trampas se instalaron sobre soportes de madera de 1,0 m de longitud a 30, 60 y 90 cm del suelo orientadas en diferentes direcciones por un período de 12 horas durante la noche (Prussin, 2013). Una vez concluido el periodo de exposición en campo, las trampas se recogieron e incubaron en laboratorio a temperatura ambiente ( $\pm 20$  °C) por 10 días para su posterior observación al microscopio. Las colonias de *Fusarium* sp. crecidas sobre las trampas de captura con medio PDA y WA fueron puestas en contacto con el medio BOA, selectivo para especies fitopatógenas de *Fusarium* de maíz, e incubadas a 25 °C en condiciones de oscuridad. Los

aislamientos se identificaron morfológicamente y se conservaron a -70 °C en glicerol al 15% esterilizado en autoclave (Leslie y Summerell, 2006).

### **2.3.5 Frecuencia de aislamiento de *Fusarium graminearum* y *F. subglutinans* durante el ciclo del cultivo**

A partir de la población de plantas inspeccionada para describir la sintomatología (Capítulo I) mes a mes, desde la siembra (VE) hasta el espigamiento (VT), se tomaron 60 explantes de raíz, cuello y tallo. Estos se desinfectaron en etanol al 70%, hipoclorito de sodio al 2% y se lavaron tres veces en agua destilada estéril (ADE) (Ortiz *et al.* 2011). Los tiempos de desinfección de acuerdo con la edad del material vegetal se ajustaron como se muestra en el Anexo A. Después del proceso de desinfección, los explantes se secaron sobre toallas de papel absorbente estériles en cámara de flujo laminar y se sembraron en caja de Petri con medio PDA acidulado al 0,1% (v/v) con ácido láctico al 85%. Las cajas se incubaron en oscuridad a 25 °C por diez días, registrando la frecuencia de colonias fúngicas por estadio de desarrollo de las plantas según la escala propuesta por Ritchie *et al.* (1996).

### **2.3.6 Efecto de la inoculación de *Fusarium* spp. en el crecimiento y desarrollo de maíz**

**Material fúngico y obtención del inóculo.** Para esta evaluación se usaron los aislamientos monospóricos 26B de *F. graminearum* (FGSC) y 45D de *F. subglutinans* (FFSC) obtenidos a partir de plantas de maíz afectadas por pudrición del tallo en la región del Valle de Ubaté. El aislamiento 26B de *F. graminearum* fue propagado siguiendo la metodología de *Chaff-Grain* (Leslie y Summerell, 2006). El aislamiento 45D de *F. subglutinans* fue propagado en medio Czapeck líquido (Oxoid®). El medio líquido se

mantuvo en agitación a 150 rpm por espacio de 15 días a temperatura ambiente, al igual que el *Chaff-Grain* ( $\pm 20$  °C) (Leslie y Summerell, 2006). Posteriormente, se realizó la cosecha de conidias filtrando el medio o suspensión de esporas con gasa estéril y posterior centrifugación a 2500 rpm por 15 minutos. El sobrenadante se descartó y el pellet se re-suspendió en 10 mL de ADE. Finalmente, se ajustó una suspensión de 200 mL a una concentración de  $1,0 \times 10^5$  conidias/mL.

**Material vegetal e inoculación.** Un día previo al montaje de la prueba, semillas de la variedad regional Simijaca se sumergieron e hidrataron en agua corriente por espacio de cuatro horas. La semilla fue tratada por calor en agua a 52 °C por cinco minutos y enfriada con ADE siguiendo la metodología de Daniels (1983). Como control absoluto, se tomaron semillas hidratadas sin ningún tratamiento. Los tratamientos evaluados correspondieron a la inoculación con *F. subglutinans* (45D) ( $1,0 \times 10^5$  conidias/mL), inoculación con *F. graminearum* (26B) ( $1,0 \times 10^5$  conidias/mL) y la inoculación con la combinación de ambos aislamientos ( $1,0 \times 10^5$  conidias/mL por cada especie de *Fusarium*). Por tratamiento, 200 semillas de maíz regional Simijaca fueron inoculadas con 100 mL de una suspensión de conidias de la especie de *Fusarium* correspondiente y agitadas vigorosamente (Wilke *et al.* 2007). En el caso de la inoculación combinada de las dos especies, se usaron 50 mL de la suspensión de conidias de cada especie (Reid *et al.* 1999). Las semillas de los controles absoluto y térmico fueron tratados con 100 mL de ADE.

**Siembra y mantenimiento del experimento.** Posterior a la inoculación, las semillas fueron llevadas a invernadero ( $T=\pm 25^\circ$ , HR=75%) y dispuestas sobre bandejas plásticas con una capa de cinco centímetros de suelo, proveniente de zonas no agrícolas de la sabana de Bogotá y humedecido a capacidad de campo (Warham *et al.* 2008). El suelo fue analizado para descartar la presencia de *Fusarium*, para ello se realizaron diluciones

estándar en base 10 partiendo de 100 g de suelo (Leslie y Summerell, 2006). Las bandejas fueron regadas diariamente hasta capacidad de campo y una vez las semillas germinaron, se seleccionaron 40 plántulas por tratamiento que fueron transferidas individualmente a bolsas con 1,5 Kg de suelo del mismo origen. El diseño experimental fue completamente al azar (DCA) con 40 repeticiones considerando como unidad experimental la planta. Las plantas se fertilizaron cuando presentaron tres y seis hojas verdaderas con un fertilizante comercial 10-30-10-3 (N-P-K-Mg/S) y fueron regadas cuando el suelo estuviera seco o las plantas mostraran síntomas de deshidratación. Tres meses después de la siembra al final de la evaluación, se determinó la longitud de la planta desde la punta de la raíz hasta la punta de la hoja bandera, el diámetro del tallo y el estado fenológico de cada individuo de los diferentes tratamientos. La longitud de la planta, el diámetro del tallo y estado fenológico fue sujeta a análisis de normalidad, análisis de varianza y comparadas bajo la prueba de Tukey con un nivel de significancia de 0,05 usando el programa estadístico SAS V9.4 (SAS Institute, Cary, NC, USA).

### **2.3.7 Efecto de la infección de *Fusarium* spp. sobre la lignificación del tallo de maíz**

Siguiendo la metodología de Daniels, (1983), semilla de maíz variedad regional Simijaca fue embebida en agua corriente por cuatro horas, luego sumergida en agua caliente a 52 °C por cinco minutos, y posteriormente enfriada con ADE. Quince semillas se sembraron en bandejas con suelo de dos orígenes (Warham *et al.* 2008), suelo considerado naturalmente infestado proveniente de Simijaca de lotes con historial de pudrición del tallo y suelo libre de patógeno correspondiente a suelo sin uso agrícola de la sabana de Bogotá. El suelo libre de patógeno fue analizado para descartar la presencia de *Fusarium*, para ello se realizaron diluciones estándar en base 10 partiendo de 100 g de suelo (Leslie y

Summerell, 2006). Las bandejas se mantuvieron a ( $\pm 25$  °C) en invernadero por 30 días y se regaron periódicamente según los requerimientos de humedad. Transcurrido este tiempo, se realizaron cortes transversal de las plantas a mano alzada generando secciones delgadas del tallo las cuales fueron teñidas con la tinción de Weisner (Yates *et al.* 1997). La tinción de Wiesner (floroglucinol-HCl) se preparó inmediatamente antes de la evaluación (Pradhan y Loqué, 2014), disolviendo 0,3 g de floroglucinol (Merck®) en 10 mL de etanol absoluto (solución floroglucinol 3%) y se mezcló un volumen de HCl (ácido clorhídrico) concentrado (37N) en dos volúmenes de floroglucinol al 3%. Los cortes obtenidos de plántulas desarrolladas en el suelo de los dos orígenes fueron puestos sobre laminas portaobjetos y examinados bajo el microscopio sobre una gota de la tinción de Weisner (Yates *et al.* 1997).

### **2.3.8 Detección de fumonisinas y deoxinivalenol en semillas de maíz**

Un Kg de semilla variedad regional Simijaca proveniente de la zona de producción del valle de Ubaté en plena epidemia de pudrición del tallo y un Kg de semilla de la misma variedad, de plantas sembradas bajo condiciones de invernadero en la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá fueron llevadas al Laboratorio de Toxicología de la Facultad de Medicina veterinaria y de zootecnia de la misma Universidad. Allí se realizó la cuantificación de fumonisinas B1, B2, B3 y totales por medio de *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) acoplada a espectrofluorometría (AOAC 995.15) (ver Anexo F) y deoxinivalenol por medio de HPLC acoplada a UV (NTC 5961) (ver Anexo G).

### **2.3.9 Condiciones climáticas y de paisaje en el valle de Ubaté y su relación con eventos de pudrición del tallo de maíz**

Datos históricos de clima de los últimos treinta años para el municipio de Simijaca se recopilaron a partir de la información disponible en la Corporación Autónoma Regional de Cundinamarca (CAR) para establecer una línea base por mes para las variables precipitación, humedad relativa, velocidad promedio del viento, temperatura máxima, mínima y promedio. Adicionalmente, en dos lotes experimentales en el municipio de Simijaca en Cundinamarca, (finca de Oscar Reina: 5°N 29' 50'', -73°W 49' 47'' y finca de Francisco Cristancho: 5°N 29'41'', -73°.49'17'') se instalaron estaciones climatológicas iMETOS ® 300 (Pessl instruments, Weiz, Austria), con mediciones cada 10 minutos; los datos se visualizaron en tiempo real en [www.fieldclimate.com](http://www.fieldclimate.com). Para el análisis, los promedios mensuales de las variables seleccionadas desde mayo de 2016 hasta julio de 2017 se contrastaron con los promedios históricos de la zona y se asociaron con los reportes de volcamiento en cultivos comerciales en Simijaca para las variedades regionales Simijaca y Sogamoso, en la sabana de Bogotá, variedad regional Simijaca e ICA 508 y en el municipio de Gama, Cundinamarca en las variedades regionales Simijaca y Gama.

## 2.4 Resultados

### 2.4.1 Sintomatología y aislamientos de *Fusarium* spp. a partir de semilla de maíz

Bajo condiciones de la prueba de Blotter a temperatura ambiente de  $\pm 20$  °C, diez días después del montaje, en la semilla de maíz variedad regional Simijaca se observó pérdida de brillo y el crecimiento de colonias fúngicas principalmente de *Fusarium* spp. (9%) desde el germen hasta cubrir la totalidad de la semilla (Figura 2-1a).



**Figura 2-1.** Sintomatología en semillas y plántulas de la variedad regional Simijaca bajo condiciones de test de Blotter diez días después de siembra. A) colonias del género *Fusarium* spp. sobre la semilla. B) raíces púrpuras. C) avance de la lesión en corte longitudinal del mesocotilo. D) aislamiento de colonias de *Fusarium* spp. a partir de explantes de raíces de maíz variedad regional Simijaca sobre medio PDA-BOA cinco días después de siembra (Fotografía: Natalia Piñeros Guerrero).

Las especies más frecuentes correspondieron a *F. subglutinans* (FFSC) (5%) y *F. graminearum* (FGSC) (4%). Las raíces de las plántulas provenientes de estas semillas presentaron coloración blanca alternada con zonas de coloración púrpura (Figura 2-1b) y en cortes longitudinales del mesocotilo se observó el avance de la lesión hacia lo que será el cuello de la plántula (Figura 2-1c). Las coloraciones púrpura o blancas en las raíces de plántulas de maíz no se asociaron a presencia o ausencia de *Fusarium* spp. ya que a partir de tejido con las dos coloraciones se aisló el patógeno en medio PDA-BOA (Figura 2-1d).

Finalmente, 19 días después del montaje se presentó necrosis de hojas, raíces y tallo, debido a la desintegración causada por la presencia de *Fusarium* spp.

#### 2.4.2 Aislamientos de *Fusarium* spp. asociados a la pudrición del tallo de maíz a partir de suelo

El análisis microbiológico de suelo de lotes con historial de pudrición del tallo en Simijaca (Anexo E), mostró que los hongos fueron los organismos más frecuentes y correspondieron en orden de importancia a levaduras, *Penicillium* sp. *Beauveria* sp. *Cladosporium* sp. y *Aspergillus* sp. destacándose la ausencia de *Fusarium* spp. En el caso de bacterias, los organismos aislados con mayor frecuencia fueron identificados como pertenecientes a los géneros *Erwinia*, *Bacillus*, *Pantoea*, *Azotobacter* y Actinobacterias. El aislamiento de suelo a partir de cebos de hojas de maíz y clavel después de 30 días favoreció la formación de esporodoquios color salmón de *F. subglutinans* sobre el suelo (Figura 2-2a).



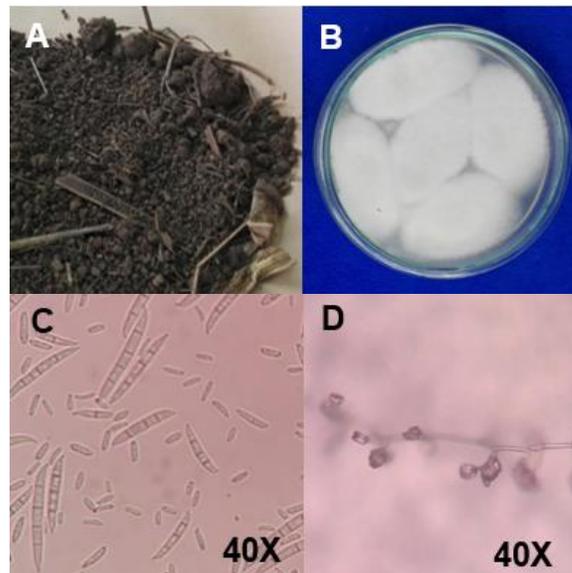
**Figura 2-2.** Captura de *Fusarium subglutinans* (FFSC) a partir de suelo con historial de pudrición del tallo mediante cebos de hojas de clavel. A) colonización micelial y formación de esporodoquios de color salmón sobre suelo de Simijaca con historial de pudrición del tallo 30 días después del montaje. B) suelo de uso no agrícola +hojas de clavel. C) suelo con historial de pudrición del tallo + hojas de clavel, y D) aislamiento directo de *F. subglutinans* en medio PDA-BOA a partir del micelio crecido sobre las hojas de clavel cinco días después de siembra.

Aunque el micelio se observó colonizando las hojas de maíz y clavel (Figura 2-2 b y c), las hojas de maíz no fueron un cebo exitoso por su rápida degradación. Colonias de *F. subglutinans* se obtuvieron mediante aislamientos directos a partir de hojas de clavel

incubadas sobre suelo del lote de Simijaca con historial de pudrición del tallo (Figura 2-2d). A partir del suelo sin uso agrícola de la sabana de Bogotá no se aislaron colonias de *Fusarium* spp. por medio de la dilución de suelo ni por el método de cebos y pocas colonias de *Aspergillus* sp. y *Penicillium* sp. fueron detectadas.

### 2.4.3 Aislamientos de *Fusarium* spp. asociados a la pudrición del tallo de maíz a partir de detritos

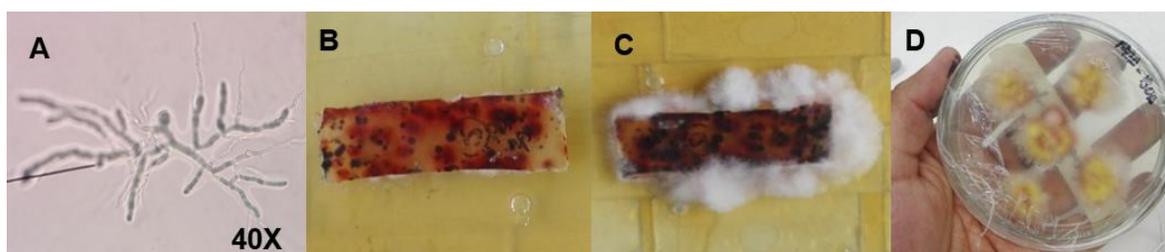
A partir de la siembra directa en medio PDA-BOA de detritos tamizados de suelo de lotes con historial de pudrición del tallo en Simijaca se aislaron colonias de *F. subglutinans* con una frecuencia de 100% (Figura 2-3).



**Figura 2-3.** Aislamiento de *F. subglutinans* (FFSC) a partir de detritos de residuos de cosecha. A) suelo de lotes comerciales de maíz con historial de pudrición del tallo, B) apariencia de las colonias a partir de detritos sobre medio PDA-BOA diez días después de siembra. C) macroconidias típicas del complejo *fujikuroi* y microconidias ovales y usualmente sin septos en medio CLA. D) microconidias *in situ* formando falsas cabezas en medio CLA.

#### 2.4.4 Aislamientos de *Fusarium* spp. asociados a la pudrición del tallo de maíz a partir de aire

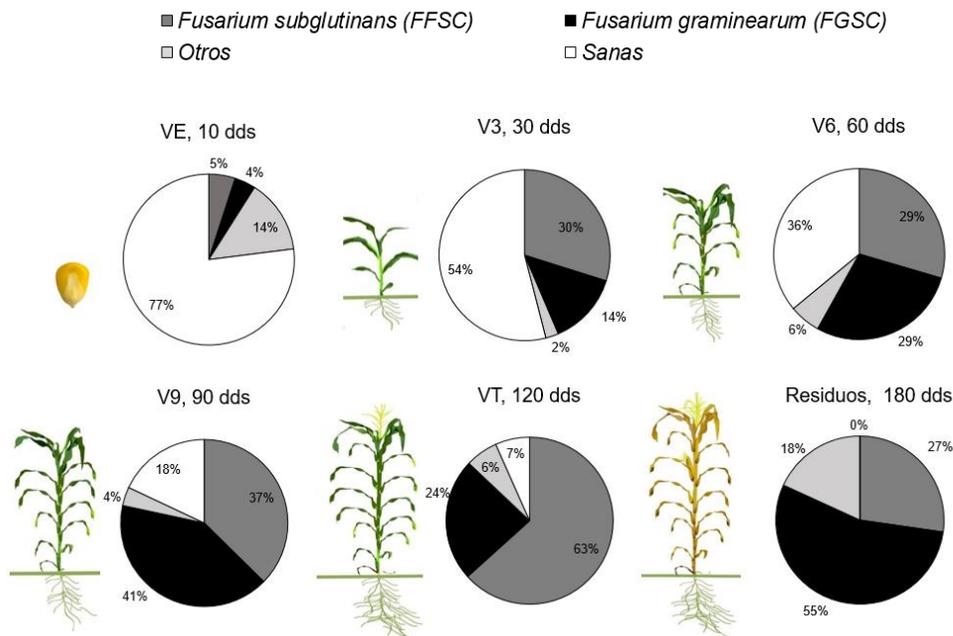
La captura nocturna de esporas en un lote con residuos de cosecha en pie con presencia de peritecios de *F. graminearum* visibles en el tallo indicó que hay flujo de esporas de este en el aire (Figura 2-4a). Los medios BOA y PDA-BOA no mostraron crecimiento de colonias 10 días después de la exposición. El medio PDA y Agar Agua (WA) fueron los medios más efectivos para la captura de esporas de *Fusarium* spp. Al incubar las láminas de captura con PDA o WA donde hubo crecimiento de colonias tipo *Fusarium* sobre el medio BOA se observó crecimiento de *F. graminearum* (Figura 2-4b y c), confirmando así que este patógeno con capacidad de degradar 2-benzoxazolinone es transportado por aire siendo esta una vía efectiva de diseminación de inóculo primario y secundario para la infección y colonización área de plantas de maíz. Las colonias aisladas a partir del aire circundante en cultivos de maíz correspondieron al morfotipo de colonia de *F. graminearum* aislada en medio PDA-BOA a partir de secciones externas del tallo con presencia de peritecios superficiales (Figura 2-4d).



**Figura 2-4.** Aislamiento de *F. graminearum* (FGSC) a partir de aire sobre medio BOA. A) espora germinando de *Fusarium* sp. sobre medio agar-agua 24 horas después de la captura. B) trampa de captura de medio agar-agua con colonias crecidas de *Fusarium* spp. diez días después de la captura y sembrada sobre medio BOA. C) crecimiento de colonias fúngica de *Fusarium* sp. sobre medio BOA quince días después de siembra a  $\pm 25$  °C y D) aislamientos de *F. graminearum* a partir de siembra directa de la colonia crecida sobre medio BOA en medio PDA-BOA diez días después de siembra a  $\pm 25$  °C.

### 2.4.5 Frecuencia de aislamiento de *Fusarium graminearum* y *F. subglutinans* durante el ciclo del cultivo

La frecuencia de aislamiento de *Fusarium* spp. se incrementó conforme la planta de maíz alcanzó estados de desarrollo superiores. En estado de emergencia VE, el porcentaje de aislamiento fue del 9%, en tanto que, para los estados de tres, seis, nueve hojas verdaderas (V3, V6, V9) y espigamiento (VT) fue de 44%, 58%, 78% y 87% respectivamente (Figura 2-5). A partir de residuos de cosecha el porcentaje de aislamiento fue del 82%. La frecuencia de aislamiento de *F. subglutinans* y *F. graminearum* muestra que en el estado de desarrollo VE la mayoría de las semillas están sanas (77%), el 5% están infectadas por *F. subglutinans* y el 4% por *F. graminearum*, en tanto que el 14% presentan otros organismos como *F. oxysporum*, *Rhizoctonia* sp., *Trichoderma* spp., *Rhizopus* sp., *Mucor* sp., *Aspergillus* sp. y *Penicillium* sp.



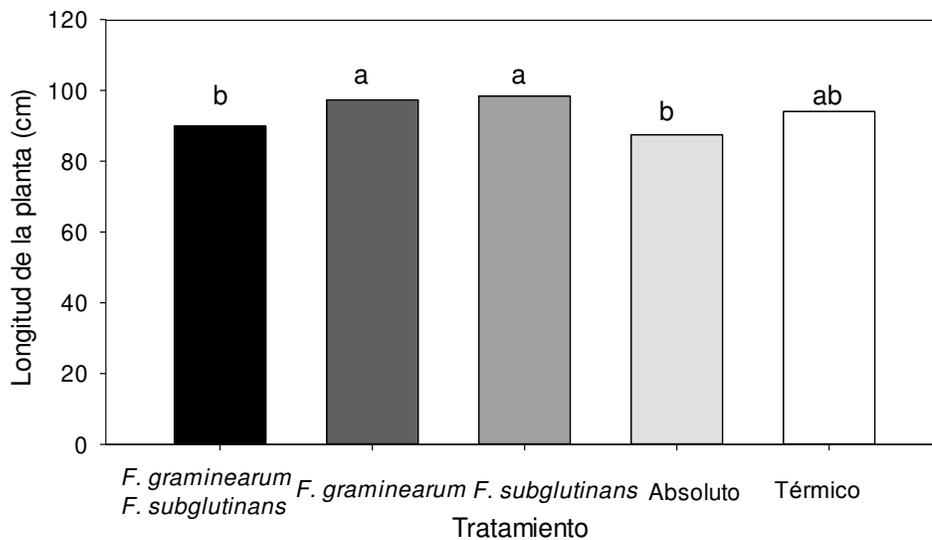
**Figura 2-5.** Dinámica de la frecuencia de *F. subglutinans* (FFSC) y *F. graminearum* (FGSC) en distintos estados fenológicos del cultivo de maíz variedad regional Simijaca. VE: Emergencia; V3, V6 y V9, tres, seis y nueve hojas verdaderas respectivamente; VT: espigamiento.

En estados de desarrollo V3 a V9, *F. subglutinans* y *F. graminearum* incrementaron su frecuencia. En el caso de *F. subglutinans* la frecuencia de aislamiento fue del 30%, 29%, 37% y 63% en los estadios V3, V6, V9 y VT respectivamente en tanto que para *F. graminearum* fue del 14%, 29%, 41% y 24% para estos estados de desarrollo en su orden. Es de notar que en el estado de desarrollo V6 y V9 la frecuencia de aislamiento de *F. graminearum* iguala y supera la de *F. subglutinans*, lo que coincidió con el inicio de síntomas visibles internos y externos en la planta en el estado de desarrollo de nueve hojas verdaderas (V9). En residuos de cosecha por su parte, la frecuencia más alta de aislamiento correspondió a *F. graminearum* con 55% seguida de *F. subglutinans* con 27%. La frecuencia de otros organismos como *F. oxysporum*, *Rhizoctonia* sp., *Trichoderma* sp., *Rhizopus* sp., *Mucor* sp., *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. y *Pythium* sp. fue igual o inferior al 10% en los estados de desarrollo V3, V6, V9 y VT. En residuos de cosecha, estos organismos representaron el 18%. Finalmente, la frecuencia de plantas o semillas sanas pasa del 77% en el estado VE al 54%, 36%, 18% y 7% en los estados de desarrollo V3, V6, V9 y VT (Figura 2-5).

#### **2.4.6 Efecto de la inoculación de *Fusarium* spp. en el crecimiento y desarrollo de maíz**

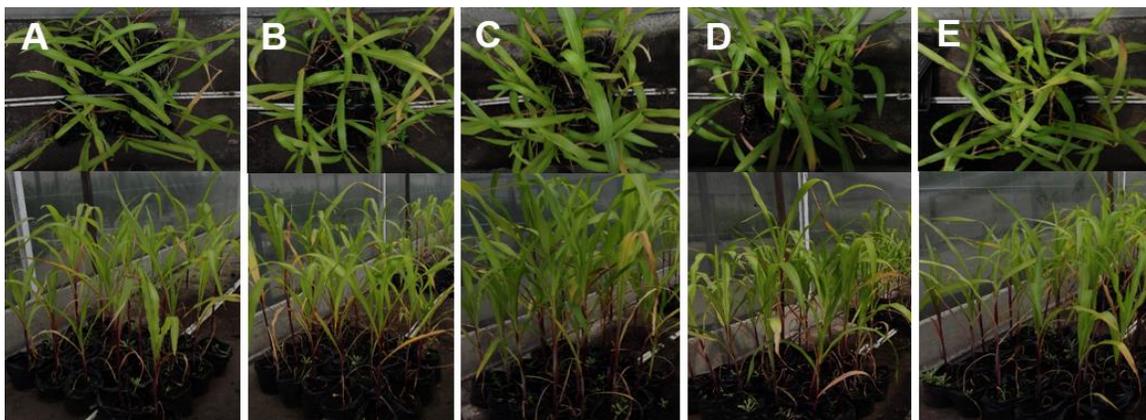
El suelo proveniente de zonas no agrícolas de la sabana de Bogotá, empleado en este ensayo fue probado como libre de *Fusarium* y pocas colonias de *Aspergillus* y *Penicillium* fueron detectadas. El efecto de la inoculación individual de *F. subglutinans*, *F. graminearum* y su mezcla sobre la longitud de la planta y diámetro del tallo y crecimiento de plantas de maíz variedad regional Simijaca, respecto a semilla sin inóculo de *Fusarium* spp. (control térmico) y semilla naturalmente infestada (control absoluto) se presenta en la figura 2-6. Los resultados obtenidos muestran que la inoculación individual de *F.*

*subglutinans* y *F. graminearum* aumentó la longitud de la planta con relación a los demás tratamientos ( $P < 0,001$ ) (Figura 2-6a y Anexo H). La semilla libre de inóculo (control térmico) mostró una longitud de plantas intermedia entre las inoculadas individualmente con *F. subglutinans* o *F. graminearum* y la semilla naturalmente infestada (control absoluto). Plantas del control absoluto presentaron la misma longitud que plantas desarrolladas a partir de semillas inoculadas con ambas especies de *Fusarium*. En cuanto al diámetro del tallo y el estado fenológico, los datos no se ajustaron a supuestos de normalidad en la distribución de los datos (datos no mostrados), sin embargo, se observó que la inoculación conjunta de *F. subglutinans* y *F. graminearum* aumenta el diámetro del tallo. La mediana de los resultados obtenidos para el estado fenológico de las plantas sugiere que las plantas de maíz inoculadas con *F. subglutinans* tienen una hoja más respecto a los demás tratamientos.



**Figura 2-6.** Efecto de la inoculación de *F. graminearum* (FGSC), *F. subglutinans* (FFSC) y su combinación sobre la longitud de la planta ( $n = 40$ ) de maíz variedad regional Simijaca, tres meses después de siembra (V9) respecto al control absoluto y térmico. Letras diferentes denotan diferencia estadística ( $p < 0,05$ ) según Tukey.

En resumen, la inoculación individual de *F. subglutinans* y *F. graminearum* generó plantas de mayor longitud, aunque con reducción del diámetro del tallo, en contraste con la inoculación conjunta de ambas especies con la cual la longitud de la planta fue menor, pero con un mayor diámetro del tallo. En la figura 2-7 se presentan plantas de maíz bajo los distintos tratamientos de inoculación evaluados y su efecto en el vigor de las plantas y el canopi de las plantas de los diferentes tratamientos a un metro de altura.

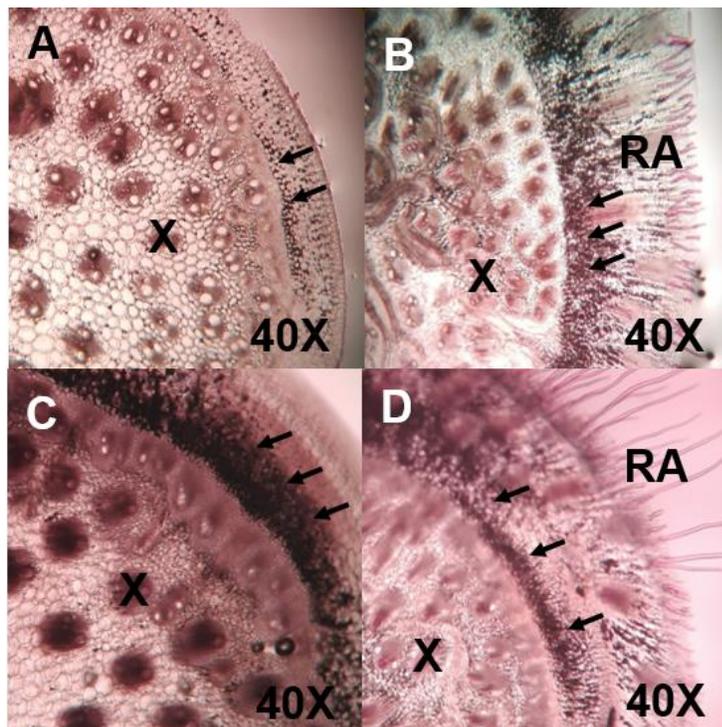


**Figura 2-7.** Efecto de la inoculación de *Fusarium* spp. sobre el canopi (imágenes superiores) y vigor (imágenes inferiores) de plantas de maíz variedad regional Simijaca tres meses después de siembra. A) control absoluto: plantas provenientes de semillas usadas por agricultores naturalmente infestada con *Fusarium* spp. B) control térmico: plantas provenientes de semillas desinfectadas por medio de calor. C) plantas inoculadas con *F. subglutinans* (FFSC). D) plantas inoculadas con *F. graminearum* (FGSC). E) plantas inoculadas con ambas especies de *Fusarium*.

#### 2.4.7 Efecto de la infección de *Fusarium* spp. sobre la lignificación del tallo de maíz

El suelo proveniente de zonas no agrícolas de la sabana de Bogotá, empleado en este ensayo fue probado como libre de *Fusarium* y pocas colonias de *Aspergillus* y *Penicillium* fueron detectadas. A nivel histológico, las plantas de maíz variedad regional Simijaca que crecieron en ausencia de *Fusarium* spp. mostraron menor contenido cualitativo de lignina respecto a plantas sometidas a alguna fuente de inóculo en semilla o en suelo (Figura 2-

8). Las plantas desarrolladas en ausencia de inóculo manifestaron una distribución de la estela del xilema normal y la tinción de lignina en los vasos conductores de la misma. Las plantas sometidas a presencia de inóculo, además de teñir los vasos conductores en la estela, mostraron un mayor contenido de lignina en forma de un anillo ubicado en la parte exterior en el tallo. Adicionalmente, plantas provenientes de semillas sin tratar (inóculo endógeno de *Fusarium* spp.) presentaron mayor número de raíces adventicias respecto a semillas tratadas. En estas plantas, las raíces adventicias se tiñeron también de rosado al ser tratadas con floroglucinol.



**Figura 2-8.** Efecto de la asociación entre *Fusarium* spp. y maíz variedad regional Simijaca sobre la acumulación de lignina en el tallo 35 días después de siembra evaluada mediante la tinción de Weisner. A) plantas libres de patógeno en suelo y semillas. B) plantas provenientes de semillas usada por agricultores naturalmente infestada con *Fusarium* spp. y sembradas en suelo sin uso agrícola. C) plantas sin inóculo en la semilla y puestas a crecer en suelo con historial de pudrición del tallo y D) plantas provenientes de semillas usadas por los agricultores y sembradas en suelo con historial de pudrición del tallo. X: vasos conductores, RA: raíces adventicias. Las flechas indican la acumulación de lignina en la parte exterior del tallo en forma de anillo.

### 2.4.8 Detección de fumonisinas y deoxinivalenol en semillas de maíz

El análisis de micotoxinas reveló que la muestra evaluada de semilla de maíz variedad regional Simijaca producida en el valle de Ubaté durante una epidemia de pudrición del tallo no presentó contenidos detectables de fumonisinas B1, B2 y B3, ni de deoxinivalenol. En contraste, en la semilla obtenida bajo condiciones de invernadero, se detectó 70 µg/Kg de fumonisina B1 y trazas (<50 µg/Kg) de fumonisina B3 y no se detectó fumonisina B2 ni deoxinivalenol (Tabla 2-1) (ver Anexo I).

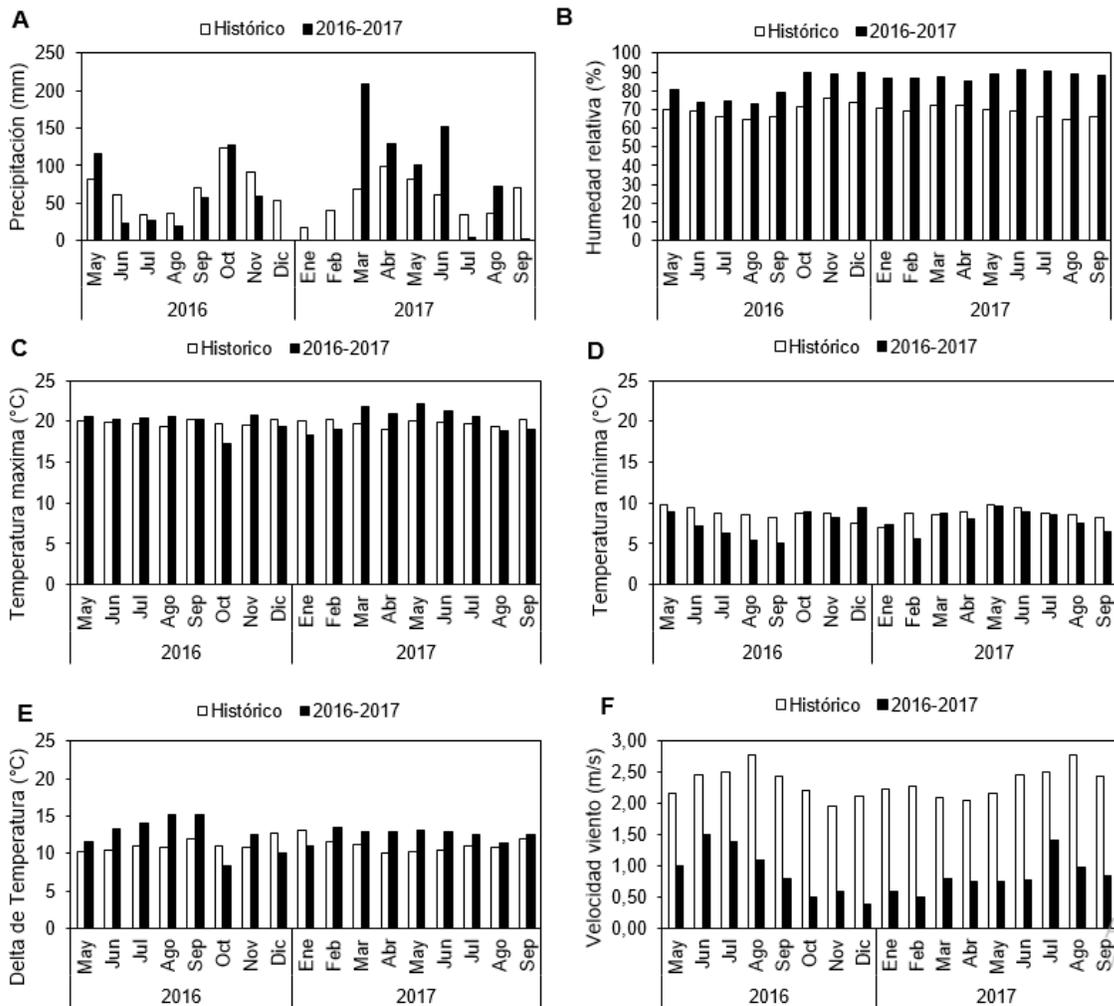
**Tabla 2-1.** Contenido fumonisinas B1, B2, B3 y totales por HPLC acoplada a espectrofluorometría y de deoxinivalenol por HPLC acoplada a UV en semilla variedad regional Simijaca procedente del valle de Ubaté durante epidemias de pudrición del tallo en 2017 y semilla variedad regional Simijaca obtenida bajo condiciones de invernadero en la Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá durante 2017. <LOQ: la concentración encontrada es detectable, pero es menor al límite de cuantificación (<50 µg/Kg), N.D: No Detectable.

| MUESTRA       | PESO (Kg) | FB1 (µg/Kg) | FB2 (µg/Kg) | FB3 (µg/Kg) | F total (µg/Kg) | deoxinivalenol (µg/Kg) |
|---------------|-----------|-------------|-------------|-------------|-----------------|------------------------|
| Maíz UNAL     | 1         | 70          | N. D        | trazas <LOQ | 70              | N. D                   |
| Maíz Simijaca | 1         | N. D        | N. D        | N. D        | N. D            | N. D                   |

### 2.4.9 Condiciones climáticas y de paisaje en el valle de Ubaté y su relación con eventos de pudrición del tallo de maíz

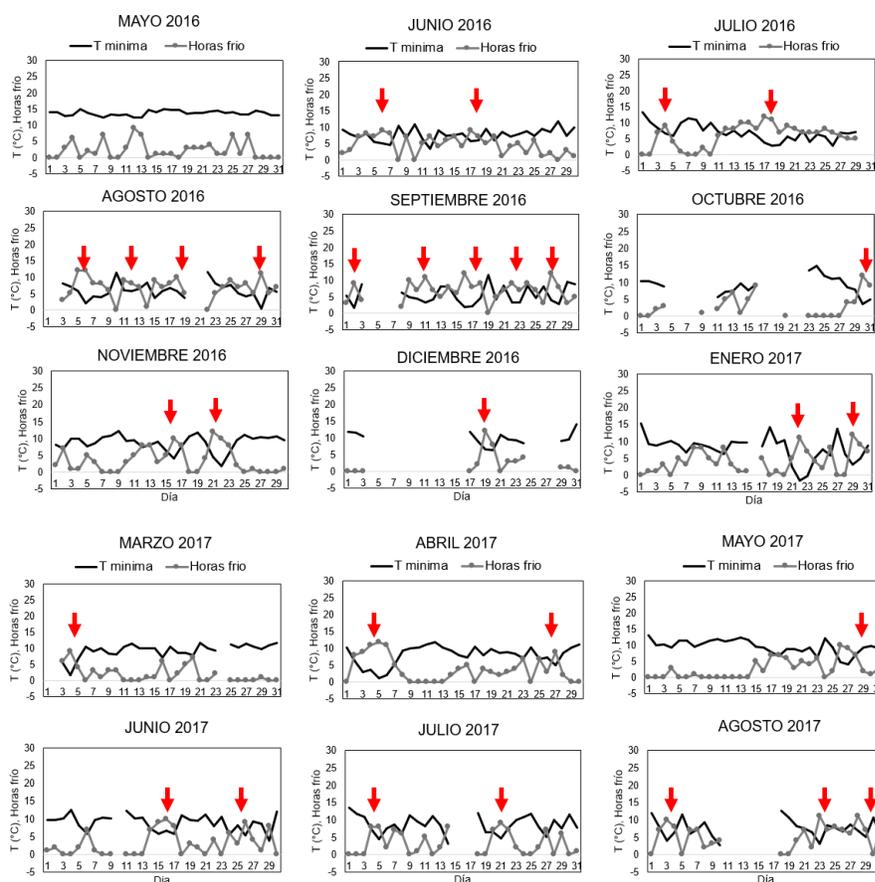
El clima en el municipio de Simijaca durante el año 2016 estuvo marcado por un evento de niño tropical caracterizado por temperaturas promedio mensual de 13,18 °C, 81% de HR y precipitación de 429 mm (Figura 2-9). De esta forma hubo una disminución de 125 mm en los niveles de precipitación respecto al registro histórico (554 mm) de 30 años en dicha localidad desde mayo a diciembre de 2016 (Figura 2-9a). El año 2017 por su parte presentó

temperatura promedio mensual de 13,44 °C, 88% de HR y precipitación de 670 mm para el periodo de enero a septiembre, siendo superior en 74 mm al histórico de 596 mm. La humedad relativa en ambos años (Figura 2-9b) fue superior a los datos históricos debido a una disminución marcada en la velocidad del viento (Figura 2-9f), no obstante, desde junio hasta septiembre de 2016 el ambiente fue seco (HR < 80%).



**Figura 2-9.** Comportamiento de variables climáticas desde mayo de 2016 a septiembre de 2017 en el municipio de Simijaca, Cundinamarca con respecto a datos históricos de 30 años para esta localidad. A) precipitación acumulada por mes. B) humedad relativa promedio por mes. C) temperatura máxima promedio por mes. D) temperatura mínima promedio por mes. E) delta de temperatura calculado como la diferencia entre la temperatura máxima y mínima y F) velocidad del viento promedio por mes.

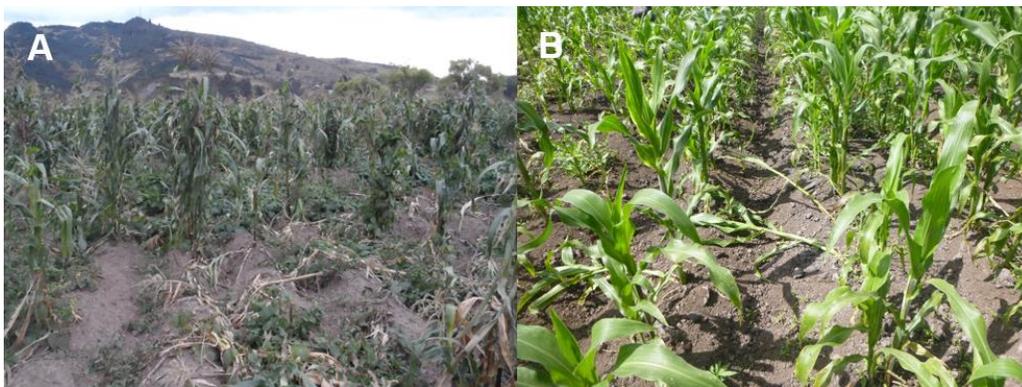
La temperatura máxima promedio fue ligeramente superior a los históricos (Figura 2-9c), sin embargo, la temperatura mínima promedio muestra una disminución gradual de 9 °C a 5 °C desde mayo a septiembre de 2016 y una disminución de 9 a 5 °C en el mes de febrero de 2017 y de 9 a 8 °C en abril de 2017 (Figura 2-9d). Temperaturas máximas ligeramente superiores y temperaturas mínimas inferiores al promedio histórico indican una mayor amplitud térmica que se refleja en términos del delta de temperatura (Figura 2-9e). En la zona de estudio, los deltas de temperatura promedio históricos correspondieron a 10 °C, los cuales fueron inferiores respecto a los 13,82 °C registrados desde mayo a septiembre de 2016 y los 12,76 °C registrados desde febrero a agosto de 2017



**Figura 2-10.** Comportamiento de la temperatura mínima y horas frío por día desde mayo de 2016 a agosto de 2017 en el municipio de Simijaca, Cundinamarca. Las flechas rojas indican eventos de frío de alta intensidad (temperatura mínima inferior a 10 °C por más de diez horas). Datos de clima obtenidos con estaciones meteorológicas iMETOS® en lotes comerciales de maíz.

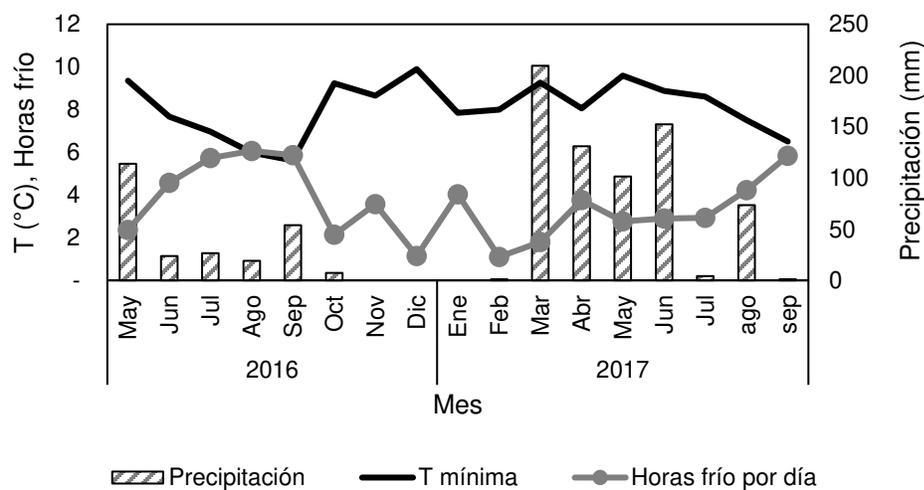
Los eventos acumulados de estrés por frío para el periodo de junio a septiembre de 2016 se asociaron al volcamiento tardío del maíz en la zona (Figura 2-10). En mayo de 2016, el inicio del estrés se dio cuando los cultivos estaban en etapa de desarrollo de espigamiento (VT) por ende el cultivo se volcó de forma “tardía” en estados de desarrollo de aparición de estigmas (R1) (Figura 2-11a). Para el período de septiembre de 2016, el estrés por frío se presentó en estado de emergencia (VE) y el volcamiento fue “temprano” en el ciclo del cultivo en etapa de desarrollo de seis (V6) y nueve hojas verdaderas (V9) (Figura 2-11b).

Finalmente, las siembras de marzo de 2017 al estar bajo niveles de precipitación por encima a los reportes históricos (200 mm) (Figura 2-9) presentaron un menor porcentaje de volcamiento respecto al semestre anterior, sin embargo, los eventos individuales de estrés por frío en abril, mayo, junio, julio y agosto de 2017 (Figura 2-10) se asociaron con la manifestación del volcamiento del maíz ocurrido uno o dos meses después de estos episodios, dependiendo de la intensidad del frío.



**Figura 2-11.** Volcamiento en campos de maíz variedad regional Simijaca sembrados en el municipio de Simijaca (Cundinamarca) durante 2016. A) lote de cinco meses sembrado en marzo el cual estuvo expuesto a varios episodios intensos de frío entre junio y agosto de 2016 el cual se volcó tarde en el ciclo del cultivo (VT), (Fotografía: Alefsi David Sánchez Reinoso). B) lote de tres meses sembrado en septiembre de 2016, el cual estuvo expuesto a varios episodios intensos de frío desde la siembra hasta diciembre y se volcó de forma temprana en el ciclo del cultivo (V9).

Temperatura mínima promedio inferior a 10 °C hasta por 6 horas (Figura 2-12) se asociaron con mayores reportes de volcamiento de maíz para los meses de julio a septiembre de 2016 respecto a eventos de frío menos intensos como los presentados en abril y agosto de 2017. Plantas desarrolladas a partir de semilla de la variedad regional Simijaca proveniente de lotes con historiales de volcamiento y usada por los agricultores, sembradas durante el primer semestre de 2017 en el Centro Agropecuario Marengo (CAM) e invernaderos de la Universidad Nacional de Colombia en la Sabana de Bogotá no manifestaron síntomas de la enfermedad al igual que plantas provenientes de semilla de maíz variedad ICA 508 sembradas en el CAM las cuales fueron asintomáticas aun cuando *Fusarium* spp. fue aislado a partir de estos dos materiales vegetales (Figura 2-13 a y b). El maíz variedad regional Simijaca y variedad regional Gama sembrado en zonas de ladera en Simijaca y Gama (Cundinamarca) no desarrollaron síntomas de la enfermedad para este período de tiempo (Figura 2-13 c y d) a pesar de que *Fusarium* spp. fue aislado en estas variedades.

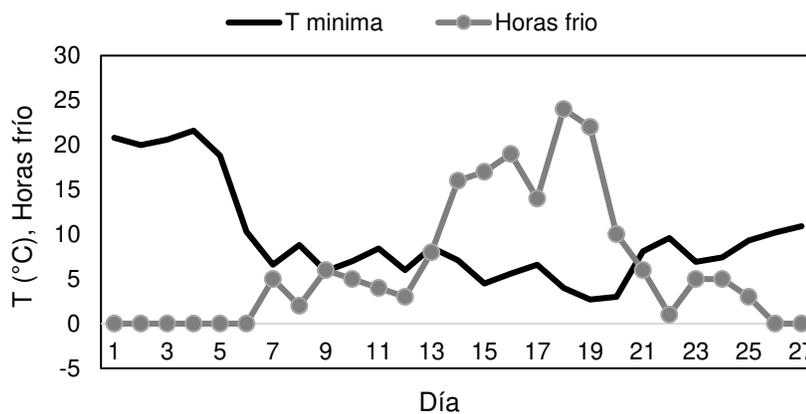


**Figura 2-12.** Comportamiento de la temperatura mínima promedio por mes, horas frío promedio por día y la precipitación acumulada desde mayo de 2016 a septiembre de 2017 en el municipio de Simijaca, Cundinamarca.

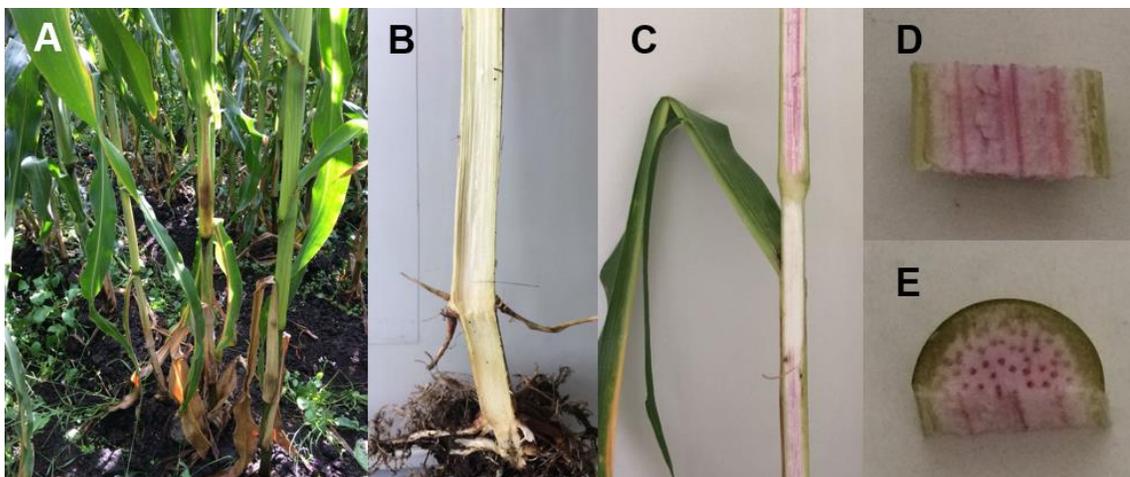


**Figura 2-13.** Plantas asintomáticas de maíz sembrado en el Centro Agropecuario Marengo (CAM) y el municipio de Gama (Cundinamarca) durante mayo de 2017. A y B) plantas sembradas en CAM. A) variedad ICA 508. B) variedad regional Simijaca. C y D) plantas sembradas en Gama. C) variedad regional Gama y D) variedad regional Simijaca.

No obstante, un evento de frío intenso presentado en la sabana de Bogotá durante septiembre de 2017 (Figura 2-14), propició el desarrollo de síntomas asociados a pudrición del tallo causada por *Fusarium* spp. en maíz variedad ICA 508 y en la parte aérea de plantas de la variedad regional Simijaca sembradas en el CAM (Figura 2-15).



**Figura 2-14.** Comportamiento de la temperatura mínima y las horas frío por día durante septiembre de 2017 en el Centro Agropecuario Marengo (CAM) ubicado en el municipio de Mosquera, Cundinamarca asociadas a pudrición del tallo y afectación de la parte aérea de la planta de maíz ICA 508 y variedad regional Simijaca.



**Figura 2-15.** Sintomatología en plantas de maíz variedad regional Simijaca sembrada en el Centro Agropecuario Marengo (CAM) en el municipio de Mosquera, Cundinamarca, un mes después del episodio estrés por frío. A) plantas sintomáticas en campo con necrosis exterior evidente del tercer entrenudo. B) corte longitudinal de la base del tallo donde no se aprecia daño en el cuello. C) corte longitudinal de estratos superiores de la planta donde se evidencia la sintomatología asociada con *Fusarium* spp. D) corte longitudinal y E) corte transversal de una sección del tallo sintomático. (Fotografías: Sandra Gómez Caro).

## 2.5 Discusión

En semillas de maíz variedad regional Simijaca, aunque en valores bajos las especies aisladas más frecuentes correspondieron a *F. subglutinans* (FFSC) (5%) y *F. graminearum* (FGSC) (4%). La presencia de estas dos especies en plantas de maíz se incrementó desde el estado de desarrollo V3 a V9. En este estudio, se encontró que cuando la frecuencia de aislamiento de las dos especies es similar o la frecuencia de *F. graminearum* iguala y supera la frecuencia de aislamiento de *F. subglutinans* a partir de tejido de la planta, los síntomas externos asociados a la pudrición del tallo como enanismo, clorosis y antocianocencia, fueron visibles bajo condiciones campo en plantas con nueve hojas verdaderas (V9). Estos resultados indican que estas dos especies están asociadas con el maíz variedad regional Simijaca en la mayoría de los estados del ciclo de crecimiento vegetal al igual que se ha reportado para *Fusarium verticillioides* (FFSC) en maíz (Schulz

*et al.* 1999a) variando entre biótrofo asintomático a patógeno hemibiótrofo dependiendo del ambiente biótico y abiótico de la planta (Bacon *et al.* 2008).

El análisis microbiológico del suelo de lotes con historial de pudrición del tallo en Simijaca, mostró la ausencia de *F. subglutinans* y *F. graminearum*, en tanto se confirmó la presencia de estas dos especies en detritos y residuos de cosecha mediante el análisis en medio PDA enmendado con BOA. Por lo anterior, se puede considerar que la fuente principal de inóculo en el suelo se encuentra en los residuos de cosecha, lo cual coincide con lo reportado por Cotten y Munkvold (2007), Manzo y Clafin (1984) y Nyvall y Kommedahl (1970). Dado que *F. subglutinans* no forma estructuras de resistencia tipo clamidosporas y en *F. graminearum* son de lenta formación (Leslie y Summerell, 2006) y que el micelio y esporas residen principalmente sobre los detritos de cosecha de maíz no fue posible detectar inóculo de *Fusarium* spp. a partir del suelo aún en lotes con historial de volcamiento.

Solo un limitado número de especies de *Fusarium* han mostrado tener la capacidad de detoxificar BOA y la mayoría de las especies de *Fusarium* tolerantes a BOA tienen asociación hospedero (Bacon *et al.* 2008). Por lo anterior, es probable que *F. subglutinans* y *F. graminearum* tengan asociación hospedero con el maíz variedad regional Simijaca. La detección nocturna de *F. graminearum* (FGSC) en el aire de fincas productoras de maíz en el valle de Ubaté confirma que este patógeno de maíz con capacidad de degradar 2-benzoxazolinone (BOA) es transportado por aire, siendo esta una vía de diseminación del inóculo primario y secundario efectiva para la colonización área del maíz. *F. graminearum* (FGSC) sobrevive sobre detritos de maíz hasta que las condiciones se hacen favorables para la esporulación (Default *et al.* 2006). Las esporas se liberan predominantemente en

la noche debido al aumento en la humedad relativa y a una inversión de la capa de aire de rápido enfriamiento formada en la superficie de la tierra (Schmale y Bergstrom, 2004).

*F. verticillioides* (FFSC) está presente en la semilla, infecta las raíces, coloniza el tallo de manera ascendente y finalmente es aislado internamente de las semillas producidas por estas plantas (Bacon *et al.* 2001). En este trabajo, se observó el mismo comportamiento de *F. subglutinans* (FFSC) y *F. graminearum* (FGSC) reportado por estos autores. Duncan y Howard (2010) reportan que *F. verticillioides* (FFSC) se disemina verticalmente a través de la semilla en tanto que la diseminación horizontal es mediada por la planta a través del aire y/o gotas de lluvia tal como lo ha reportado Ooka y Kommedahl (1977). Los insectos, en especial barrenadores del tallo y cogollo es probable que actúen tanto como agentes de daño físico para la planta y la mazorca, así como un vehículo del inóculo y con ello constituyan otra vía de diseminación de *Fusarium* spp. (Windels *et al.* 1976).

Distinto a *F. graminearum* (FGSC) reportado como homotálico por Leslie y Summerell, (2006), *F. subglutinans* y *F. verticillioides* son heterotálicos, en los cuales esta condición, junto con la fertilidad femenina y otros factores de desarrollo podrían explicar por qué los peritecios de *F. verticillioides* sean raramente observados en la naturaleza pese a que son fácilmente inducibles en laboratorio y es posible que lo mismo ocurra con *F. subglutinans*. Análisis de compatibilidad sugieren, sin embargo, que la reproducción sexual de *F. verticillioides* es común (Munkvold, 2003). Es claro que diferente a *F. graminearum* (FGSC) donde las ascosporas funcionan como inóculo primario, la reproducción sexual en *F. verticillioides* y otras especies dentro del complejo *fujikuroi* (FFSC) contribuye a la diversidad genética pero no es parte esencial de su ciclo de vida (Blacutt *et al.* 2018).

En este estudio, la inoculación individual de *F. subglutinans* y *F. graminearum* en maíz variedad regional Simijaca, permitió tener plantas de mayor longitud. El diámetro del tallo por otro lado es disminuido. En contraste, la inoculación conjunta de ambas especies permitió plantas de menor longitud con aumento en el diámetro del tallo. Estos resultados indican modificaciones en el crecimiento y desarrollo de las plantas de maíz sujetos a la presencia de determinada especie de *Fusarium*. Estos resultados concuerdan con otros estudios donde se ha observado promoción del crecimiento y desarrollo en términos de la altura, diámetro del tallo y peso de plántulas de cuatro semanas de edad e inoculadas con *F. verticillioides* (FFSC) (Yates *et al.* 1997). Otros estudios en campo muestran que plantas inoculadas con *F. verticillioides* (FFSC) presentan igual altura que plantas provenientes de semillas no inoculadas aunque con algunos incrementos en el rendimiento (Yates *et al.* 2005). Aumentos en el crecimiento de plantas a causa de la inoculación de *Fusarium equiseti*, endófito de arveja (*Pisum sativum* L.) fue también detectado cuatro semanas después de la inoculación (Sisic *et al.* 2016).

En este estudio, el diámetro del tallo fue la variable que mostró comportamiento contrario al mostrados por Yates *et al.* (1997) ya que la inoculación individual de *Fusarium* sp. disminuyó el diámetro y solamente la inoculación conjunta de *F. graminearum* y *F. subglutinans* la incrementó. La mediana del estado fenológico observada, sugirió que las plantas inoculadas con *F. subglutinans* tienen fenológicamente una hoja más con respecto a la inoculación de *F. graminearum*, o la inoculación conjunta de ambas especies, resultados que se ajustan a la promoción del desarrollo observada por Yates *et al.* (2005) y Yates *et al.* (1997).

El aumento de deposición de lignina observada en los tallos de maíz variedad regional Simijaca infectados con *Fusarium* spp. concuerda con los estudios desarrollados por Yates

---

*et al.* (1997) donde se detectaron diferencias anatómicas en la síntesis de lignina entre brotes de maíz no infectados e infectados con *F. verticillioides* (FFSC) 14 días después de la siembra. El aumento cualitativo en la deposición de lignina en los brotes de plántulas de maíz infectadas por *Fusarium* spp., encontrados en este estudio, podría incrementar la rigidez del tallo y podría ser un mecanismo estructural generado por esta asociación para impedir el crecimiento fúngico dentro del tallo (Borja *et al.* 1995; Irizarry y White, 2018; Vance *et al.* 1980).

En las semillas de maíz evaluadas provenientes de cultivos en Simijaca, no se detectaron fumonisinas y deoxinivalenol, en tanto que, se encontraron fumonisinas B1 y trazas de fumonisinas B3 en la semilla obtenida bajo condiciones de invernadero en la sabana de Bogotá. Este resultado se puede explicar por el efecto de la temperatura, ya que en campo las temperaturas promedio fueron de 13,3 °C (máximos hasta de 22 °C y mínima hasta de 5 °C) que no favorecen la formación de micotoxinas como lo reportan Bacon *et al.* (2008) ya que, las condiciones cálidas y secas después de la floración en verano pueden resultar en incremento del contenido de fumonisinas y pudrición de mazorcas (Bacon *et al.* 1994). Mayores temperaturas promedio y favorables para la producción de micotoxinas se obtuvieron bajo invernadero las cuales estuvieron en promedio en 25 °C. Las condiciones frías presentadas en Simijaca, son similares a las condiciones en Iowa 1992 donde una reducción en el contenido de fumonisinas en el maíz fue atribuida a un ciclo de producción húmedo y frío de forma que las plantas no estuvieron sometidas a estrés por calor o falta de humedad (Shepherd *et al.* 1996). En este estudio no se detectó presencia de micotoxinas en semillas de maíz obtenidas en campo en lotes en plena epidemia de pudrición del tallo.

Dado que la mayoría de los genotipos de maíz tienen componentes genéticos para la resistencia a hongos asociados a la pudrición del tallo, la identificación de la (s) especies de hongo (s) asociados a la pudrición del tallo con raras excepciones contribuye al control de la pudrición del tallo y la interacción hospedero-ambiente es la condición pertinente a analizar (Dodd, 1980). Dos variables climáticas de las evaluadas en esta investigación se consideraron que tienen mayor impacto sobre la pudrición del tallo del maíz variedad regional Simijaca: el déficit hídrico y la temperatura mínima. Distinto a *F. verticillioides* (FFSC), la frecuencia *F. subglutinans* (FFSC) y *F. temperatum* (FFSC) es mayor con temperaturas medias de 18 °C o menores (Czembor *et al.* 2015). En el valle de Ubaté durante el año 2016/2017 el clima fue predominantemente frío y seco. Reportes de literatura mencionan tanto a *F. graminearum* (FGSC) como a *F. subglutinans* (FFSC) como especies frecuentemente aisladas en las zonas de producción de maíz de clima frío (CIMMYT, 2004; Czembor *et al.* 2015).

En la zona de estudio, a mayores niveles de precipitación (2017) un menor volcamiento de maíz se reportó respecto un año seco (2016). El frío desglosado en dos variables como la temperatura mínima promedio y el promedio de horas frío por día en término de número de horas con temperaturas inferiores a 10 °C, brindaron información complementaria. Cuando se presentó alta intensidad de frío (temperatura mínima promedio por debajo de los 10 °C hasta por 6 horas) un mayor volcamiento de maíz fue reportado en campo respecto a eventos de frío menos intensos. No obstante, como afectan estas dos variables el porcentaje de volcamiento, depende también del estado fenológico del maíz en el cual es afectado. Por ende, cultivos más desarrollados que son afectados por sequía y/o frío tienden a volcarse de forma tardía en tanto que los cultivos jóvenes tienden a volcarse de forma temprana uno a dos meses después, dependiendo de la intensidad de estas condiciones de estrés.

---

Temperaturas por debajo de  $-2\text{ }^{\circ}\text{C}$  por unas pocas horas pueden ser letales para las plántulas de maíz y podrían matar el punto de crecimiento aún si este está por debajo del suelo (Nielsen, 2001). La investigación ha mostrado que temperaturas iguales o inferiores a  $10\text{ }^{\circ}\text{C}$  y la prolongada exposición son las más dañinas para el proceso de germinación y emergencia, especialmente si estas persisten por mucho tiempo después de la siembra y el daño será mayor en suelos pesados o de pobre drenaje (Saab y Steve, 2006).

Simijaca es un municipio ubicado en medio del valle de Ubaté con zonas planas rodeadas de cadenas montañosas que regulan el flujo de masas de aire. El aire frío se concentra en las zonas bajas, en tanto que fluye en las laderas de las montañas. Lo anterior se acentuó en la zona de estudio por la marcada disminución en la velocidad del viento para la época (Figura 2-9f). Esta condición de paisaje tiene consecuencias epidemiológicas sobre la pudrición del tallo de maíz por el movimiento de masas de aire frío y dispersión de inóculo de (los) patógeno (s) asociados, dándole una naturaleza localizada en el valle y zonas de escape en las laderas u otras zonas de producción. Plantegenest *et al.* (2007) mencionan que cualquier característica del paisaje que inflencie el movimiento del aire podría impactar la diseminación del patógeno en razón a que sus propágulos o artrópodos vectores son generalmente organismos pequeños que son transportados pasivamente por el viento. De la misma forma, el efecto de las estructuras del paisaje sobre el movimiento del aire es probable que impacten la deposición de esporas (Schmale *et al.* 2006).

En este estudio, el estrés de alta intensidad por frío y la sequía presentada durante un evento de niño tropical durante 2016/2017 pudo haber hecho migrar una relación normalmente en balance y sin efecto detrimental entre el maíz variedad regional Simijaca y *F. graminearum* y *F. subglutinans* a una interacción patogénica de forma que la repentina epidemia de pudrición del tallo ocasionada por *Fusarium* spp. en la zona, se le considere

como una enfermedad emergente de la cual no se tenía un diagnóstico preciso aun cuando sea una enfermedad de reconocida importancia en otras partes del mundo.

En el trópico, las condiciones de temperaturas frías o cálidas son principalmente homogéneas durante todo el ciclo del cultivo de forma que la pudrición del tallo se manifiesta únicamente cuando hay un desbalance entre la planta y su ambiente biótico y abiótico (el fitobioma) (Hawkes y Connor, 2017). Enmarcados en el concepto del balance fotosintético entre el estrés y la translocación planteado por Dodd (1980), el estrés por frío y sequía presentados en la zona fueron los detonantes que favorecieron la pudrición del tallo a causa de *F. graminearum* y *F. subglutinans* en el valle de Ubaté. Este concepto aplica para la variedad regional Simijaca por lo que a futuro una más acertada forma para predecir la vulnerabilidad de esta y otras variedades de maíz de clima frío a la pudrición del tallo por *Fusarium* spp. debe incluir su exposición al frío y la condición de sequía, de forma que los esfuerzos futuros en los programas de mejoramiento de variedades sean consistentes con el alto rendimiento y el bajo porcentaje de plantas con pudrición del tallo en campo.

## 2.6 Conclusiones

- i. *Fusarium graminearum* (FGSC) y *F. subglutinans* (FFSC) se encontraron principalmente sobre los detritos y residuos de cosecha del cultivo y en la semilla de la variedad regional Simijaca. De igual forma, se confirmó el movimiento del inóculo de *F. graminearum* por medio del aire.
- ii. El maíz variedad regional Simijaca se encontró asociado con *F. graminearum* y *F. subglutinans* en todos los estados de desarrollo del cultivo, y el aumento de la proporción de aislamientos de *F. graminearum* respecto a *F. subglutinans* en

---

estados de desarrollo V6 a V9 coincidió con el desarrollo de síntomas visibles de la enfermedad en campo cuando la planta tenía nueve hojas verdaderas (V9).

- iii. El efecto de la asociación entre *F. subglutinans* y *F. graminearum* y maíz se reflejó en el aumento de la longitud de la planta, la reducción del diámetro del tallo y el aumento cualitativo del contenido de lignina en el tallo. La inoculación individual de *F. subglutinans* y *F. graminearum* generó 90 días después de siembra, plantas de mayor longitud, aunque con diámetro del tallo reducido, comparadas con la inoculación conjunta de ambas especies.
- iv. La incidencia de la pudrición del tallo y su impacto sobre el cultivo de maíz dependerá de la intensidad y duración de la condición de estrés por frío o sequía y también del estado de desarrollo de las plantas.
- v. La frecuencia de eventos de frío y sequía debidos al aumento de la amplitud térmica en la zona se asociaron con escenarios de cambio climático, por lo que es de esperarse que la pudrición del tallo y posterior volcamiento se presente con más frecuencia en la zona, sin que esto implique la contaminación del grano con micotoxinas.
- vi. La naturaleza de esta asociación planta-patógeno, las fuentes de inóculo y las condiciones climáticas conductivas para el desarrollo de la enfermedad son un instrumento fundamental para el diseño de estrategias de manejo de la pudrición del tallo en el valle de Ubaté y zonas de producción de maíz de clima frío en el trópico andino.

## 2.7 Bibliografía

- Baayen, R., y Rykenbuerg, F. (1999). Fine structure of the early interaction of lily roots with *Fusarium oxysporum* f. sp. lilli. *European Journal of Plant Pathology*, 105, 431-443
- Bacon, C.W, Hinton, D.M., y Richardson, M. (1994). A corn seedling assay for resistance to *F. moniliforme*. *Plant Disease*, 78, 302-305
- Bacon, C.W, y Hinton, D.M. (1996). Symptomless endophytic colonization of maize by *Fusarium moniliforme*. *Canadian Journal of Botany*, 74, 1195-1202
- Bacon, C.W, Yates, I.E, Hinton, D.M., y Meredith, F. (2001). Biological control of *Fusarium moniliforme* in maize. *Environmental Health Perspect*, 109, 325-332
- Bacon, C. W., Glenn, A. E., y Yates, I. E. (2008). *Fusarium verticillioides*: Managing the endophytic association with maize for reduced Fumonisin accumulation. *Toxin Reviews*, 27 (3-4), 411–446. doi:10.1080/15569540802497889
- Blandino, M., Reyneri, A., Colombari, G., y Pietri, A. (2009). Comparison of integrated field programmes for the reduction of fumonisin contamination in maize kernels. *Fields Crops Research*, 111, 284–289. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2009.01.004>
- Blacutt, A. A., Gold, S. E., Voss, K. A., Gao, M., y Glenn, A. E. (2018). *Fusarium verticillioides*: Advancements in Understanding the Toxicity , Virulence , and Niche Adaptations of a Model Mycotoxigenic Pathogen of Maize. *Phytopathology*, 108(3), 312–326
- Borja, I., Sharma, P., Krekling, T., y Lonneborg, A. (1995). Cytopathological response in roots of *Picea abies* seedlings infected with *Pythium dimorphum*. *Phytopathology*, 85:495-501
- Canny, M. (1995). Apoplastic water and solute movement: new rules for an old space. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 46, 215-236
- Centro Internacional de Mejoramiento del Maíz y Trigo (CIMMYT). (2004). Maize Disease: A Guide for Field Identification. 4th edition. México, DF. 119 pp.
- Cotten, T. K., y Munkvold, G. P. (2007). Survival of *Fusarium moniliforme*, *F. proliferatum*, and *F. subglutinans* in Maize Stalk Residue. *Phytopathology*, 88(6), 550–555. <https://doi.org/10.1094/phyto.1998.88.6.550>

- Czembor, E., Stepien, L., y Waskiewics, A. (2015). Effect of Environmental Factors on *Fusarium* Species and Associated Mycotoxins in Maize Grain Grown in Poland. *PLoS ONE*, 1–18. doi:10.1371/journal.pone.0133644
- Daniels, B. A. (1983). Elimination of *Fusarium moniliforme* from corn seed. *Plant Disease*, 67: 609-611
- Default, N., De Wolf, E., Lipps, P., y Madden, L. (2006). Role of temperature and moisture in the production and maturation of *Gibberella zeae* perithecia. *Plant Disease*, 90, 637-644
- Dodd, J. L. (1980). The Role of Plant Stresses in Development of Corn Stalk Rots. *Plant Disease*, 64(6), 533–537
- Duncan, K. E., y Howard, R. J. (2010). Biology of maize kernel infection by *Fusarium verticillioides*. *Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI*, 23(1), 6–16. doi:10.1094/MPMI-23-1-0006
- Glenn, A. E., Hinton, D. M., Yates, I. E., y Bacon, C. W. (2001). Detoxification of Corn Antimicrobial Compounds as the Basis for Isolating *Fusarium verticillioides* and Some Other *Fusarium* Species from Corn. *Applied and Environmental Microbiology*, 67 (7), 2973–2981. doi:10.1128/AEM.67.7.2973-2981.2001
- Glenn, A., Gold, S., y Bacon, C. (2002). Fdb1 and Fdb2, *Fusarium verticillioides* loci necessary for detoxification of preformed antimicrobials from corn. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 15, 91-101
- Hashimoto, Y., y Shudo, K. (1996). Chemistry of biologically active benzoxazinoids. *Phytochemistry*, 43, 551-559
- Hawkes, C. V, y Connor, E. W. (2017). Translating Phytobiomes from Theory to Practice : Ecological and Evolutionary Considerations. *Phytobiomes*, 1(2), 57–69. doi:10.1094/PBIOMES-05-17-0019-RVW
- Irizarry, I., y White, J. F. (2018). *Bacillus amyloliquefaciens* alters gene expression , ROS production and lignin synthesis in cotton seedling roots. *Journal of Applied Microbiology*, (July), 1–15. <https://doi.org/10.1111/jam.13744>
- Kuldau, G.A, y Yates, I.E. (2000). Evidence for *Fusarium* endophytes in cultivated and wild plants. In C.W Bacon, y J. White, *Microbial Endophytes* (pp. 85-117). New York: Marcel Dekker

Kuldau, G.A. y Bacon, C.W. (2008). *Clavicipitaceous* endophytes: their ability to enhance grass resistance to multiple stresses. *Biological Control*, 46, 51-71

Lawrence, E., Nelson, P., y Ayers, J. (1981). Histopathology of sweet corn seed and plants infected with *Fusarium moniliforme* and *F. oxysporum*. *Phytopathology*, 71, 379-386

Leslie, J. y Summerell, B. (2006). *The Fusarium laboratory manual*. USA: Blackwell publishing. Iowa, USA. 387 pp.

Maldonado-Ramirez, S., Schmale III, D., Shields, E., y Berfstrom, G. (2005). The relative abundance of viable spores of *Gibberella zeae* in the planetary boundary layer suggest the role of long-distance transport in regional epidemics of *Fusarium* head blight. *Agricultural and Forest Meteorology*, 132(1-2), 20-27

Manzo, S. K., y Clafflin, L. E. (1984). Survival of *Fusarium moniliforme* hyphae and conidia in grain sorghum stalks. *Plant Disease*, 68: 866-867

Matilla, Y. (2010). Ecology and evolution of toxigenic fusarium species in cereals in northern Europe and Asia. *Journal of Plant Pathology*, 92(1), 7–18.

Munkvold, G.P. (2003). Epidemiology of *Fusarium* disease and their mycotoxins in maize ears. *European Journal of Plant Pathology*, 109: 705-713

Munkvold, G., Hellmich, R., y Showers, W. (1997). Reduced *Fusarium* ear rot and symptomless infection in kernels of maize genetically engineered for European corn borer resistance. *Phytopathology*, 87, 1071-1077

Nielsen, R. (2001). Frost and low temperature injury to corn and soybean. Purdue University: Corny News Network. Retrieved from: [https://www.agry.purdue.edu/ext/corn/news/articles.02/Frost\\_Freeze-0520.html](https://www.agry.purdue.edu/ext/corn/news/articles.02/Frost_Freeze-0520.html)

Niemeyer, H. (1988). Hydroxamic acids (4-hydroxy-1.4-benzoxazin-3-ones), defense chemicals in the Gramineae. *Phytochemistry*, 27, 3349-3358

Nguyen, T. T. X., Dehne, H. W., y Steiner, U. (2015). Histopathological assessment of the infection of maize leaves by *Fusarium graminearum*, *F. proliferatum*, and *F. verticillioides*. *Fungal Biology*, 120 (9), 1094–1104. doi:10.1016/j.funbio.2016.05.013

Nguyen, T. T., Dehne, H., y Steiner, U. (2016). Maize leaf trichomes represent an entry point of infection for *Fusarium* species. *Fungal Biology*, 120 (8), 895–903. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2016.05.014>

- Nyvall, R. F., y Kommedahl, T. (1970). Saprophytism and survival of *Fusarium moniliforme* in corn stalks. *Phytopathology*, 60, 1233-1235
- Ooka, J., y Kommedahl, T. (1977). Wind and rain dispersal of *Fusarium moniliforme* in corn fields. *Phytopathology*, 67, 1023-1026
- Ortiz , H., León , J., Rivero, M., y Hoyos-Carvajal, L. (2011). *Manual de prácticas de fitopatología general* . Bogotá: Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá. 80 pp.
- Osborn, A. (1999). Antimicrobial phytoprotectants and fungal pathogens: a commentary. *Fungal Genetics and Biology*, 26, 163-168
- Plantegenest, M., Le May, C., y Fabre, F. (2007). Landscape epidemiology of Plant disease. *Journal of The Royal Society Interface*, 4(16), 963–972. doi:10.1098/rsif.2007.1114
- Pradhan Mitra, P., y Loqué, D. (2014). Histochemical Staining Secondary Cell Wall Elements. *Journal of Visualized Experiments*, 87(1), 1–11. doi:10.3791/51381
- Prussin, A. J. (2013). Monitoring and Predicting the Long Distance Transport of *Fusarium graminearum*, Causal Agent of Fusarium Head Blight in Wheat and Barley. *Virginia Polytechnic Institute and State Univesity*, 172 pp.
- Reddy, C. S., y Holbert, J. R. (1926). Seed treatments for sweet-corn disease. *Journal of Agricultural Research*, 33 (8), 769–779
- Reid, L. M., Nicol, R. W., Ouellet, T., Savard, M., Miller, J. D., Young, J. C., Stewart, D. W., y Schaafsma. A. W. (1999). Interaction of *Fusarium graminearum* and *F. moniliforme* in maize ears: Disease progress, fungal biomass, and mycotoxin accumulation. *Phytopathology*, 89(11):1028-1037
- Ritchie, S. W., J. J. Hanway, y G. O Benson. 1996. How a Corn Plant Develops. Iowa State University Cooperative Extension Special Report No. 48. Ames, Iowa, USA.
- Saab, I., y Steve, B. (2006). *Diagnosing Chilling and Flooding Injury to Corn Prior to Emergence*. *Pioneer Hi-Brend Int'l*. Retrieved from [https://www.pioneer.com/growingpoint/agronomy/library\\_corn/crop\\_injury/flooding\\_injury.jsp](https://www.pioneer.com/growingpoint/agronomy/library_corn/crop_injury/flooding_injury.jsp)
- Saunders, M., y Kohn, L. (2008). Host-synthesized secondary compounds influence the in vitro interactions between fungal endophytes od maize. *Applied Environmental Microbiology*, 74, 136-142

- Schmale, D., y Bergstrom, G. (2004). Spore deposition of the ear rot pathogen, *Gibberella zeae*, inside corn canopies. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 26, 591-595
- Schmale, D., Shields, E., y Bergstrom, G. (2006). Night time spore deposition of the fusarium head blight pathogen, *Gibberella zeae*, in rotational wheat fields. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 28, 100-108
- Schulz, B., Remmert, A., Dammann, U., Aust, H., y Strack, D. (1999a). The endophyte-host interaction: a balanced antagonism. *Mycological Research*, 103, 1275-1283
- Schulz, M., y Wieland, I. (1999b). Variation in metabolism of BOA among species in various field communities- Biochemical evidence for co-evolutionary processes in plant communities?, *Chemoecology*, 9, 133-141
- Shepherd, G., Thiel, P., Stockenstrom, S., y Sydenharn, E. (1996). Worldwide survey of fumonisin contamination of corn and corn-based products. *Journal of AOAC International*, 79, 671-687
- Sisic, A., Bacanovic, J., y Finckh, M. (2016). Endophytic *Fusarium equiseti* stimulates plant growth and reduces root rot disease of pea (*Pisum sativum* L.) caused by *Fusarium avenaceum* and *Peyronellaea pinodella*. *European Journal of Plant Pathology*, 148, 271–282. <https://doi.org/10.1007/s10658-016-1086-4>
- Trail, F., Gaffoor, I., y Vogel, S. (2005). Ejection mechanics and trajectory of the ascospores of *Gibberella zeae* (anamorph *Fusarium graminearum*). *Fungal Genetics and Biology*, 42, 528-533
- Van Wyck, P., Scholtz, D., y Marasas, W. (1988). Protection of maize seedlings by *Fusarium moniliforme* against infection by *Fusarium graminearum* in the soil. *Plant and Soil*, 107, 251-257
- Vance, C., Kirk, T., y Sherwood, R. (1980). Lignification as a mechanism of disease resistance. *Annual Review of Phytopathology*, 18, 259-288
- Warham, E. J., Butler, L. D., y Sutton, R. C. (2008). Ensayos para la semilla de maíz y de trigo. *CIMMYT*, 84 pp.
- Whitney, N., y Mortimore, C. (1957). Root and stalk rot of field corn in southwestern Ontario. I. Sequence of infection and incidence of the disease in relation to maturation of inbred lines. *Canadian Journal of Plant Science*, 37, 342-346
- Wicklow, D. T. (1988) Patterns of fungal association with maize kernels harvested in North

---

Carolina. *Plant Disease*, 72: 113–115

Windels, C., Windels, M., y Kommedahl, T. (1976). Association of *Fusarium* species with picnic beetles on corn ears. *Phytopathology*, 66, 328-331

Wilke, A. L., Bronson, C. R., Pathology, P., y Tomas, A. (2007). Seed Transmission of *Fusarium verticillioides* in Maize Plants Grown Under Three Different Temperature Regimes. *Plant Disease*, 91(9), 1109–1115

Xie, Y., Arnason, J., Philogéne, B., Atkinson, J., y Morand, P. (1991). Distribution and variation of hydroxamic acids and related compounds in maize (*Zea mays*) root system. *Canadian Journal of Botany*, 69, 677-681

Yates, I. E., Bacon, C. W., y Hinton, D. M. (1997). Effects of Endophytic Infection by *Fusarium moniliforme* on Corn Growth and Cellular Morphology. *Plant Disease*, 81(7), 723–728

Yates, I.E, Hiett, K., Kapczynski, D., Smart, W., Glenn, A.E, Hinton, D.M, Bacon, C.W., Meinersmann, R., Liu, S. y Jaworski, A. (1999). GUS transformation of the maize fungal endophyte *Fusarium moniliforme*. *Mycological Research*, 103, 129-136

Yates, I. E., Widstrom, N. W., Bacon, C. W., Glenn, A., Hinton, D. M., y Sparks, D. (2005). Field performance of maize grown from *Fusarium verticillioides* -inoculated seed. *Mycopathologia*. 159: 65–73



### **3. Capítulo III: Efecto del potencial de inóculo de *Fusarium graminearum* y *Fusarium subglutinans* en semilla y residuos de cosecha sobre la pudrición del tallo, volcamiento, crecimiento y rendimiento de plantas de maíz de clima frío (*Zea mays* L.) en el valle de Ubaté**

#### **3.1 Resumen**

Se han reportado efectos variables de prácticas de cultivo que inciden sobre el potencial de inóculo, incidencia y volcamiento de maíz a nivel comercial. Los resultados obtenidos de diferentes prácticas evaluadas bajo condiciones comerciales en Simijaca (Cundinamarca) mostraron un efecto significativo del historial del lote del cultivo sobre la germinación de semillas de maíz con mayores valores en lotes con presencia de residuos del cultivo. En cuanto a la altura de la planta y el diámetro del tallo, los mayores valores se obtuvieron en lotes con rotación, valores intermedios donde se retiraron los residuos de cosecha y bajos donde se mantuvieron. Por su parte, la incidencia de la pudrición del tallo y diámetro de la mazorca fue mayor donde se dejaron los residuos de cosecha, intermedia donde se retiraron y baja en la rotación de cultivos. El historial del lote del cultivo y los tratamientos térmicos de la semilla de forma individual, no tuvieron efecto significativo sobre el porcentaje de volcamiento, sin embargo, el tratamiento con calor seco a 50 °C en el lote de rotación presentó menor porcentaje de volcamiento con una reducción del 54%. En cuanto a parámetros de rendimiento, la rotación tuvo un efecto negativo sobre el *fitness* del cultivo, reduciendo a la mitad el número de mazorcas aptas para cosecha pese que se obtuvieron los mayores valores de altura de plantas y diámetro del tallo en este historial

del lote del cultivo. Los lotes con historial maíz-maíz, donde se retiraron o no los residuos de cosecha obtuvieron el doble de la producción. Lo anterior, destaca la importancia de la asociación del maíz variedad regional Simijaca con *Fusarium graminearum* (*Fusarium graminearum species complex*) (FGSC) y *Fusarium subglutinans* (*Fusarium fujikuroi species complex*) (FFSC) en el valle de Ubaté. En síntesis, periodos de rotación de cultivo mayores a un año no son deseables y el manejo del potencial de inóculo en los residuos de cosecha y en la semilla en el corto plazo, permite obtener mayor rendimiento del cultivo. Lo anterior siempre y cuando se implementen estas medidas de manejo en forma conjunta.

### 3.2 Introducción

El interés en la labranza cero o labranza de conservación y cultivos múltiples se ha incrementado en las dos últimas décadas debido a la escasez y costo elevado de combustibles fósiles, escases de alimento a nivel mundial y preocupación por la erosión del suelo. Aunque en algunos casos las prácticas de labranza mínima pueden reducir la severidad de enfermedades por las conservación de la humedad del suelo previniendo el estrés por sequía para las plantas (Dodd, 1980a), en otras ocasiones la severidad de enfermedades se puede incrementar (Broders *et al.* 2007).

Los sistemas de rotación maíz-soja o maíz-soja-trigo en combinación con labranza mínima o sistemas sin labranza, por ejemplo, ayudan a conservar el suelo, prevenir la erosión, e incrementar el contenido de materia orgánica. No obstante, pueden favorecer la supervivencia de *Fusarium graminearum* (*Fusarium graminearum species complex*) (FGSC) debido a que *Fusarium* spp. sobrevive sobre detritos de maíz y de soja (Broders *et al.* 2007). El alto nivel de residuos vegetales sobre la superficie del suelo previene al suelo de la sequía y calentamiento en contraste con un suelo que ha sido mecanizado, sin

embargo, de esta forma se incrementa el tiempo que requiere la semilla para germinar debido a la disminución de la temperatura, lo que predispone a las plántulas a la infección por patógenos de suelo (Broders *et al.* 2007).

Tradicionalmente, los residuos de maíz han sido considerados una fuente de inóculo mayor de hongos fitopatógenos de maíz. Los residuos sobre la superficie son la principal fuente de inóculo de *Colletotrichum graminicola*, *Cercospora zea-maydis*, *Setosphaeria turcica*, *Kabatiella zea* y *Bipolaris maydis*. Todas las enfermedades asociadas a estos patógenos han mostrado incremento en la severidad en situaciones de labranza mínima o sin labranza (Cotten y Munkvold, 2007). La relevancia de los residuos del cultivo como una fuente de inóculo depende de la cantidad de residuos, la tasa de descomposición y actividad microbial, los cuales podrían influenciar tanto la degradación de residuos y el crecimiento de patógenos (Quemada, 2004; Stroo *et al.* 1989; Takeuchi, 1987; Unger, 1994).

Dentro del género *Fusarium*, en varias especies se reportan los residuos del cultivo como un elemento clave en su epidemiología, y la supervivencia, producción de inóculo, y dispersión los cuales están influenciados por el ambiente. *F. graminearum* está principalmente modulado por la temperatura y humedad en la capa de residuos del cultivo (McMullen *et al.* 2012). Los principales factores que influyen la producción de peritecios y ascosporas de este hongo son la luz (Tschanz *et al.* 1976), temperatura (Dufault *et al.* 2006) y humedad (Manstretta y Rossi, 2015). Manzo y Claflin (1984), encontraron que las conidias e hifas de *Fusarium verticillioides* (FFSC) sobrevivieron inviernos de Kansas en los tallos de sorgo sin ninguna pérdida de viabilidad. Por su parte, Nyvall y Kommedahl (1970) estudiaron la supervivencia de *F. verticillioides* por ocho meses en los residuos de los tallos de maíz en un campo en Iowa y observaron un mayor periodo de supervivencia para los residuos enterrados a 30 cm que en los residuos de superficie.

El papel del tamaño y la profundidad de entierro de los residuos de cosecha de maíz en la supervivencia de *F. verticillioides* (FFSC), *F. proliferatum* (FFSC) y *F. subglutinans* (FFSC) fue evaluado por Cotten y Munkvold (2007). Después de 630 días, estas especies de *Fusarium* fueron recuperadas entre un 0 y 50% de fragmentos del tallo inoculados en un campo de monocultivo de maíz, del 0 al 28% de piezas del tallo puestas en un campo de rotación maíz/soya/avena y de un 0 a 25% de las piezas del tallo no inoculadas en ambas localidades. Para este tiempo, la supervivencia fue mayor en los residuos sobre la superficie. Este estudio confirmó que *F. verticillioides*, *F. proliferatum* y *F. subglutinans* pueden sobrevivir al menos 630 días en los residuos sobre la superficie o enterrados lo que demuestra que los residuos de maíz pueden actuar como una fuente de inóculo de largo tiempo para la infección de plantas de maíz por estas tres especies de *Fusarium*.

El entierro de detritos para destruir fitopatógenos es una práctica agrícola ancestral (Drayton, 1929), el manejo de los residuos de cosecha a través de la rotación o mecanización se sugiere como una medida de control de enfermedades en maíz, pero hay poca evidencia demostrando convincentemente el éxito de este enfoque (Sumner *et al.* 2003). La relación entre la presencia de residuos en el campo y la severidad de la enfermedad no es clara (Cotten y Munkvold, 2007). Leslie *et al.* (1990) encontraron que *F. verticillioides* fue común en el tejido hospedero, pero no en los residuos de cosecha o suelo. En un sistema de rotación maíz/soja, la supervivencia de las especies de *Fusarium* por más de un año podría además incrementar la importancia de los residuos como una fuente de inóculo para la infección del grano (Cotten y Munkvold, 2007).

La mayoría de los hongos toxigénicos como es el caso de *F. graminearum* (FGSC) y *F. subglutinans* (FFSC) sobreviven en residuos del cultivo y el manejo de los residuos en superficies a través de la rotación de cultivos o mecanización ha sido investigada como

una táctica para la reducción de micotoxinas. En un estudio las concentraciones de deoxinivalenol (DON) fueron significativamente afectadas por la rotación de cultivos, los niveles de DON fueron más de dos veces mayores cuando maíz seguía maíz en la rotación (Schaafsma *et al.* 2001). En general, la presencia de los residuos de maíz parece ser un factor importante contribuyendo a la contaminación de DON en trigo. El riesgo de niveles no aceptables de DON en trigo o cebada pueden ser reducidos por la no siembra de estos cultivos en campos con residuos de maíz sobre la superficie (Munkvold, 2003).

Otra fuente de inóculo de *Fusarium* spp. corresponde a la semilla (Duncan y Howard, 2010; Machado *et al.* 2003; Munkvold *et al.* 1997). Existen diversos estudios sobre tratamientos para el control de enfermedades en semilla en el mundo (Bennett y Colyer, 2010; Clear *et al.* 2002; Coutinho *et al.* 2007; Daniels, 1983). Clear *et al.* (2002) evaluaron el porcentaje de incidencia de *F. graminearum* y la viabilidad de las semillas de trigo y cebada luego de ser tratadas con calor en seco. Los autores encontraron que, bajo tratamientos con calor en seco durante 15 días a 60 °C, 5 días a 70 °C y 2 días a 80 °C, hubo una completa eliminación de *F. graminearum* de las semillas de trigo sin una reducción significativa de la germinación. Por otro lado, en semillas de cebada, *F. graminearum* fue eliminado solo después de 21 días a 60 °C, 9 días a 70 °C o 5 días a 80 °C presentando una reducción significativa de la germinación bajo tratamientos por 10 días a 80 °C. Coutinho *et al.* (2007) evaluaron la calidad sanitaria y fisiológica de semillas de maíz sometidas a tratamientos con calor en húmedo realizados con agua caliente a 60 °C. Los tratamientos con calor de 10 y 20 minutos redujeron significativamente el porcentaje de ocurrencia de *F. verticillioides* en las semillas, aunque redujeron significativamente la tasa de germinación de las semillas y alteraron el patrón electroforético si se comparan con el tratamiento de cinco minutos.

Teniendo en cuenta lo anterior, este capítulo evalúa el efecto de la disminución del potencial de inóculo de *F. graminearum* (FGSC) y *F. subglutinans* (FFSC) en lotes comerciales en Simijaca (Cundinamarca) mediante el manejo de residuos de cosecha en sistemas de siembra en monocultivo y rotación de cultivos junto con el tratamiento térmico y químico de la semilla sobre la incidencia de pudrición del tallo y posterior volcamiento de plantas, el crecimiento y rendimiento del cultivo de maíz variedad regional Simijaca en el valle de Ubaté.

### **3.3 Metodología**

#### **3.3.1 Tratamientos evaluados**

Un día previo al montaje del experimento, semillas de maíz Simijaca se pusieron en imbibición en agua corriente de llave por cuatro horas, trascurrido este tiempo se trataron por calor a temperaturas de 50 °C, 55 °C y 60 °C por medio de su exposición a calor seco (Bennett y Colyer, 2010) en un cámara de calor (Model FD 23, BINDER, Germany) o calor húmedo mediante agua caliente (Daniels, 1983) en un evaporador (Waterbath B-480, BÜCHI Labortechnik AG, Switzerland). En el horno, el tiempo de exposición fue de 10 minutos, el tratamiento a 50 °C en baño María fue de 10 minutos en tanto que los tratamientos a 55 °C y 60 °C se realizaron por 5 minutos. Como tratamiento comercial se evaluó el tratamiento a la semilla usado por los agricultores basado en la mezcla de los ingredientes activos Thiabendazole (0,2 g de i.a /Kg), Metalaxil + Propamocarb (5,0 g de i.a /Kg), Clorhidrato de Oxitetraciclina + Sulfato de Gentamicina (2,0 g de i.a /Kg) y Carboxim + Thiram (4,0 g de i.a /Kg). El estudio consideró un control correspondiente a la semilla sin ningún tratamiento.

### 3.3.2 Montaje de los ensayos en campo

Las evaluaciones fueron realizadas durante los meses de marzo a agosto en el año 2017. Las semillas tratadas y control fueron llevadas a campo en dos localidades en el municipio de Simijaca, (Cundinamarca, Colombia) en la finca de Oscar Reina (5°N 29' 50'', -73°W 49' 47'') en un área de 480 m<sup>2</sup> y Francisco Cristancho (5°N 29'41'', -73°.49'17'') en un área de 960 m<sup>2</sup>. Los dos lotes seleccionados tenían historiales de manejo distinto, el primero sin siembra de maíz por un periodo de dos años y cuyo último cultivo fue calabacín, y el segundo con siembra en monocultivo de maíz por un periodo de dos años. A este último, se le realizaron dos manejos de residuos de cosecha, en la mitad del lote se retiraron los residuos de cosecha y en la otra parte se mantuvieron durante el tiempo del estudio.

En ambos lotes se tomaron muestras de suelo a una profundidad de 30 cm al inicio del estudio para análisis químico y textural. El manejo del cultivo en todos los tratamientos evaluados fue el convencional de la zona y únicamente se fraccionó la fertilización normalmente usada por los agricultores en tres aplicaciones durante el desarrollo vegetativo del cultivo cuando la planta tuvo tres, seis y nueve hojas verdaderas (V3, V6 y V9 respectivamente) según la escala propuesta por Ritchie *et al.* (1996). La distancia de siembra entre hileras fue de 0,9 m y entre plantas de 0,5 m, con una densidad de 22000 plantas por hectárea.

### 3.3.3 Variables evaluadas

En este ensayo, se evaluó para cada uno de los tratamientos el porcentaje de germinación de la semilla y se determinó el número de plantas establecidas un mes después de

siembra. Mes a mes, se midió la altura de la planta de cinco plantas desde la base hasta el cogollo o la espiga según la etapa de desarrollo, el diámetro de la base del tallo de 10 plantas, la incidencia de la pudrición del tallo por tratamiento, considerando como afectadas plantas que presentaban síntomas de clorosis, antocianocencia y enanismo y el porcentaje de volcamiento para cada tratamiento. Los periodos de evaluación coincidieron con los estados de desarrollo tres (V3), seis (V6), nueve (V9) hojas verdaderas y aparición de la espiga (VT) donde se alcanza la altura final de la planta e inicio de la formación de la mazorca con la aparición de estigmas (R1) según la escala propuesta por Ritchie *et al.* (1996). El rendimiento en términos del número y peso total de mazorcas y el número de mazorcas por planta fue determinado por tratamiento, en tanto que, el diámetro y longitud de la mazorca se evaluó sobre 10 mazorcas en el punto final de evaluación cinco meses después de siembra cuando la mazorca estaba en estado choclo con el 40% de materia seca y grano lechoso (R4) (Ritchie *et al.* 1996).

### **3.3.4 Diseño experimental**

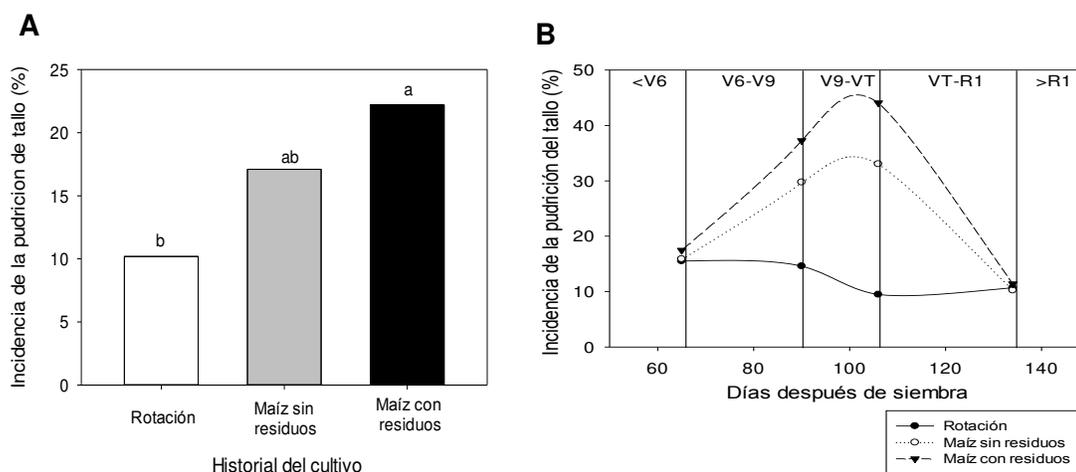
El ensayo se desarrolló bajo un diseño de parcelas divididas con tres parcelas principales (historial del lote del cultivo) y ocho subparcelas (tratamientos a la semilla incluyendo el control) con cuatro repeticiones y bloqueo de la variable tiempo, excepto para la variable del porcentaje de volcamiento donde el tiempo no fue considerado como bloque. Cada tratamiento se sembró en un área de 15 m<sup>2</sup>. Los datos fueron analizados usando el programa estadístico SAS v 9.4 (SAS Institute, Cary, NC, USA). Los datos de las variables porcentaje de germinación, número y peso total de las mazorcas, número de mazorcas por planta y longitud de la mazorca fueron sujetos a análisis de normalidad, análisis de varianza y comparadas bajo la prueba de Tukey o Duncan con un nivel de significancia de 0,05. Los datos del diámetro del tallo, diámetro de la mazorca, porcentaje de volcamiento

fueron transformados por medio de raíz cuadrada; la variable altura de la planta se transformó con la potencia 0,07, y la incidencia de la pudrición del tallo por medio de logaritmo natural. Una vez transformados, los datos fueron sujetos a análisis de normalidad, análisis de varianza y comparación múltiple bajo la prueba de Tukey o Duncan con un nivel de significancia de 0,05. Los análisis de varianza (ANOVA) de las variables mencionadas se muestran en el Anexo J.

### 3.4 Resultados

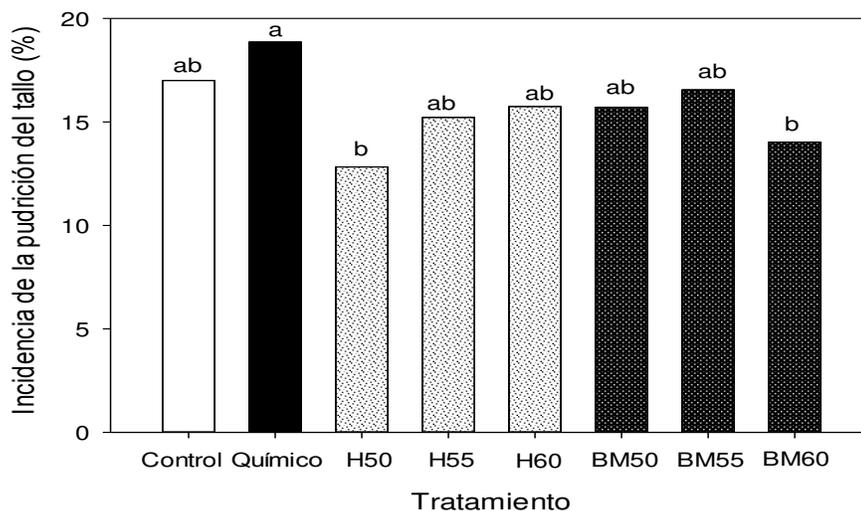
#### 3.4.1 Efecto de tratamiento de semillas, manejo de residuos e historial del lote del cultivo sobre la pudrición del tallo y volcamiento de maíz variedad regional Simijaca

En cuanto al comportamiento de la incidencia de la enfermedad (Figura 3-1a), teniendo en cuenta la sumatoria de sintomatologías externas tales como clorosis, antocianocencia y enanismo asociadas a la pudrición del tallo antes de ocurrir el evento del volcamiento, se encontró que, con respecto a historiales del lote del cultivo, la rotación de cultivos con especies distintas a gramíneas por 24 meses redujo significativamente la incidencia de la enfermedad ( $P=0,0376$ ). Aunque no hubo diferencia estadística entre el retiro o no de residuos de cosecha, en el monocultivo de maíz se evidenció una tendencia a presentar menores valores de enfermedad retirando los residuos de cosecha del lote.



**Figura 3-1.** Incidencia de la pudrición del tallo de maíz variedad regional Simijaca bajo tres historiales del lote del cultivo y condiciones de manejo de residuos. A). según historial del lote del cultivo donde letras diferentes denotan diferencias estadísticas según Tukey ( $p<0,05$ ) y B) comportamiento de la incidencia de la pudrición del tallo en el tiempo en los estados de desarrollo de seis y nueve hojas verdaderas (V6, V9), espigamiento (VT) e inicio de la formación de la mazorca (R1).

Entre fechas de evaluación el comportamiento de la incidencia de pudrición del tallo no fue estadísticamente diferente ( $P=0,0634$ ), en el estado de desarrollo V6 la incidencia de la enfermedad se comportó de forma similar en los tres historiales evaluados, en tanto que en los estados de desarrollo V9 y VT la incidencia fue mayor en el historial de monocultivo de maíz con residuos de cosecha, seguido por el historial de monocultivo sin residuos de cosecha y por último la rotación. En el momento de la formación de la mazorca (R1) el porcentaje de plantas sintomáticas vuelve a ser bajo y muy similar entre los tres historiales del lote del cultivo (Figura 3-1b). Por su parte, al comparar los tratamientos de semilla térmicos, químico y el control se encontró diferencia significativa para la incidencia de la enfermedad para al menos uno de los tratamientos ( $P=0,0022$ ) (Figura 3-2) presentándose la mayor incidencia en el tratamiento químico (18,86%) y la más baja en el tratamiento térmico de la semilla por medio de calor seco a 50 °C (12,82%) y calor húmedo a 60 °C. Los demás tratamientos evaluados presentaron valores intermedios de incidencia.



**Figura 3-2.** Incidencia de la pudrición del tallo de maíz, en el estado de aparición de estigmas de la mazorca (R1) 140 días después de la siembra en plantas de la variedad regional Simijaca provenientes de semillas tratadas por medio de calor. H: calor seco mediante horno a 50, 55 y 60 °C; BM: calor húmedo mediante baño maría a 50, 55 y 60 °C. Letras diferentes denotan diferencia estadística según Tukey ( $p<0,05$ ).

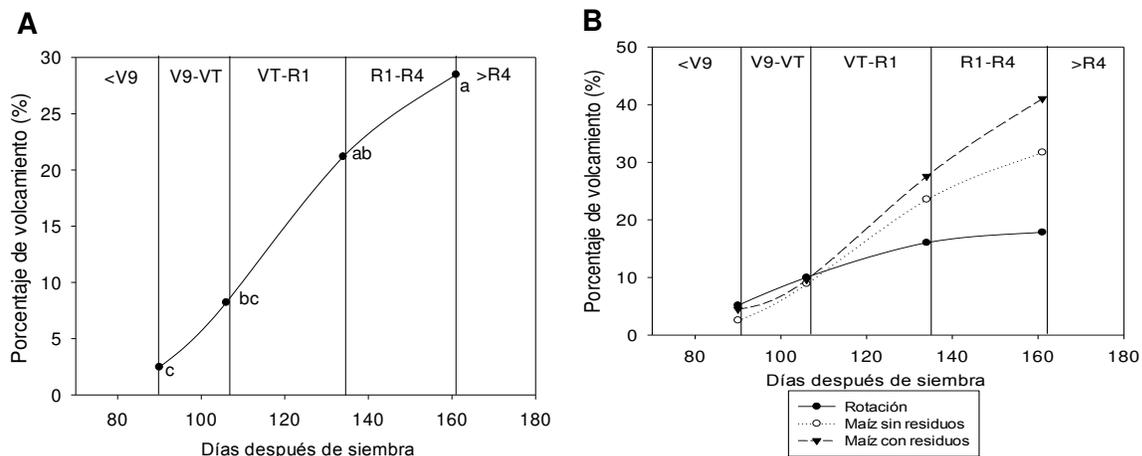
**Tabla 3-1.** Interacciones entre el historial del cultivo y el tratamiento térmico a la semilla de maíz variedad regional Simijaca sobre la incidencia de la pudrición del tallo y el porcentaje de volcamiento. Letras diferentes indican efecto significativo según Duncan ( $p < 0,05$ ) y Tukey ( $p < 0,05$ ) para la incidencia y el volcamiento respectivamente.

| Historial del cultivo<br>(Parcela principal) | Tratamiento a la semilla<br>(Sub-parcelas) | Incidencia |       | Volcamiento |     |
|--|--|------------|-------|-------------|-----|
|  |  |            | %     | %           |     |
| <b>Rotación</b>                              | Control                                    | 11,33      | fg    | 11,87       | abc |
|  | Químico                                    | 17,54      | abcde | 13,77       | abc |
|  | H50  | 7,68       | h     | 5,76        | c   |
|  | H55  | 9,86       | fgh   | 12,35       | abc |
|  | H60  | 8,90       | gh    | 7,51        | bc  |
|  | BM50                                       | 8,97       | gh    | 12,78       | abc |
|  | BM55                                       | 12,16      | efg   | 8,20        | bc  |
|  | BM60                                       | 7,80       | h     | 12,43       | abc |
| <b>Maíz sin residuos</b>                     | Control                                    | 17,80      | abcd  | 14,04       | ab  |
|  | Químico                                    | 16,23      | cde   | 12,95       | abc |
|  | H50  | 13,40      | def   | 10,79       | abc |
|  | H55  | 17,61      | abcde | 11,32       | abc |
|  | H60  | 19,43      | abcd  | 11,33       | abc |
|  | BM50                                       | 19,51      | abcd  | 11,73       | abc |
|  | BM55                                       | 17,23      | abcde | 15,19       | ab  |
|  | BM60                                       | 16,43      | bcde  | 13,79       | abc |
| <b>Maíz con residuos</b>                     | Control                                    | 24,38      | ab    | 10,75       | abc |
|  | Químico                                    | 23,57      | abc   | 15,15       | ab  |
|  | H50  | 20,52      | abc   | 16,95       | ab  |
|  | H55  | 20,33      | abc   | 16,66       | ab  |
|  | H60  | 25,47      | a     | 16,04       | ab  |
|  | BM50                                       | 22,17      | abc   | 19,04       | a   |
|  | BM55                                       | 21,64      | abc   | 19,63       | a   |
|  | BM60                                       | 20,77      | abc   | 15,44       | ab  |

Las interacciones entre el historial del cultivo y el tratamiento a la semilla (Tabla 3-1) indicaron que la mayoría de tratamientos a la semilla bajo el sistema de rotación tienen menor incidencia de la pudrición del tallo respecto al historial de monocultivo en maíz con y sin residuos del cultivo, estos dos últimos no se diferencian excepto para el tratamiento de calor seco a 50 °C ( $P=0,0193$ ). Se encontró que el tratamiento a la semilla con calor seco a 50 °C y calor húmedo a 60 °C siempre que se hagan dentro de un esquema de rotación reduce la incidencia de la pudrición del tallo. En general, dentro de los tratamientos

a la semilla se observó que hay una tendencia a presentar mayores incidencias en el historial de maíz-maíz con residuos de cosecha, en este último el tratamiento de semilla con calor seco a 60 °C presentó la mayor incidencia (Tabla 3-1).

Respecto al volcamiento, este fue detectable desde los 90 días después de siembra y fue un porcentaje bajo ( $P=0,0012$ ) en estados de desarrollo vegetativo (V9 y VT) respecto estados de desarrollo (R1 y R4) (Figura 3-3a). En el momento de la cosecha cuando el grano tenía el 40% de masa seca (R4), el porcentaje de volcamiento fue mayor en el historial de monocultivo de maíz con residuos de cosecha (41,05%), intermedio en el de monocultivo de maíz sin residuos de cosecha (31,73%) y bajo en el de rotación (17,84 %) aunque estos valores no mostraron diferencia estadística ( $P=0,2741$ ). Esta tendencia se mantuvo desde el momento del inicio de la formación de la mazorca (R1) (Figura 3-3b). El porcentaje de volcamiento final al momento de la cosecha (R4) (Figura 3-3) fue cercano al máximo registro de la incidencia de la enfermedad en el estado de espigamiento (VT) (Figura 3-1b).



**Figura 3-3.** Comportamiento del porcentaje de volcamiento de maíz variedad regional Simijaca según: A) la fecha de evaluación y B) el historial del lote del cultivo y las condiciones de manejo de residuos. (V6, V9): estados de desarrollo de seis y nueve hojas verdaderas, (VT): espigamiento, (R1): inicio de la formación de la mazorca. Letras diferentes denotan diferencia estadística según Tukey ( $p<0,05$ ).

Los resultados obtenidos en el volcamiento de plantas tampoco mostraron efecto individual de los tratamientos a la semilla ( $P= 0,1343$ ), aunque se encontraron dos combinaciones de tratamientos que incrementaron el porcentaje de volcamiento (maíz con residuos-BM50 y maíz con residuos-BM55) y tres combinaciones de tratamientos que lo redujeron ( $P=0,0122$ ) (Tabla 3-1) estos tratamientos correspondieron a rotación-H50”, “rotación-H60” “rotación-BM55”. Las comparaciones múltiples de los tratamientos que fueron significativas al 0,05 en la prueba de Tukey se muestran en la tabla 3-2.

**Tabla 3-2.** Comparaciones múltiples entre medias de los tratamientos sobre el porcentaje de volcamiento que fueron significativas al 0,05 en la prueba de Tukey.

| Comparaciones              | Diferencia entre medias | Límite de confianza al 95% simultaneo |         |
|----------------------------|-------------------------|---------------------------------------|---------|
| maizconreBM60-rotacionH50  | 2,33937025              | 0,02408704                            | 8,43205 |
| maizconreBM55-rotacionH50  | 3,164841                | 0,145924                              | 10,0876 |
| maizconreBM50-rotacionH50  | 3,857296                | 0,34774609                            | 11,1442 |
| maizconreH60-rotacionH50   | 2,41398369              | 0,00478864                            | 9,23005 |
| maizconreH55-rotacionH50   | 2,02066225              | 0,00059536                            | 7,94394 |
| maizconreH50-rotacionH50   | 2,951524                | 0,11812969                            | 9,56232 |
| maizsinreBM55-rotacionH50  | 2,24580196              | 0,01545049                            | 8,25355 |
| maizconreBM55-rotacionH60  | 2,06525641              | 0,00160801                            | 8,03212 |
| maizconreBM50-rotacionH60  | 2,63120841              | 0,06140484                            | 8,97841 |
| maizconreH50-rotacionH60   | 1,89365121              | 0,00000324                            | 7,5647  |
| maizconreBM50-rotacionBM55 | 2,24910009              | 0,01572516                            | 8,25988 |

El tratamiento “rotación-H50” mostró menor porcentaje de volcamiento respecto a la mayoría de tratamientos excepto con respecto al tratamiento químico y control dentro del historial de monocultivo de “maíz con residuos de cosecha” (Tabla 3-2) y también respecto al tratamiento “maíz sin residuos-BM55”. Por su parte, el tratamiento “rotación-H60” presentó el menor porcentaje de volcamiento respecto al tratamiento “maíz con residuos-BM55, maíz con residuos- BM50 y maíz con residuos-H50”. Finalmente, el tratamiento “rotación-BM55” tuvo menor porcentaje de volcamiento respecto a “maíz con residuos-BM50” (Tabla 3-2). Los resultados obtenidos mostraron que los tratamientos a la semilla por medio de calor seco a 50 y 60 °C reducen el porcentaje de volcamiento en 53,6%, 22,6% y el tratamiento con calor húmedo a 55 °C en un 44% siempre que se hagan en un historial de rotación.



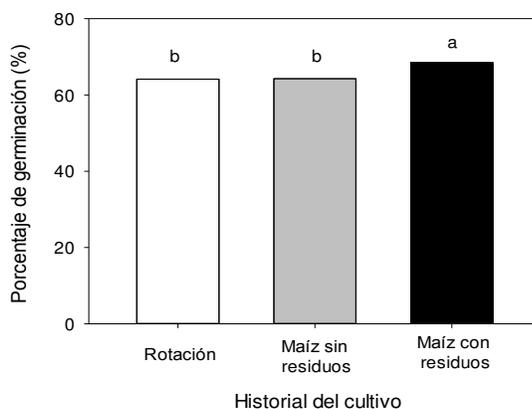
**Figura 3-4.** Sintomatología interna en cortes longitudinales del tallo de plantas de maíz variedad regional Simijaca en estado de espigamiento (VT), 106 días después de siembra según el historial del lote del cultivo y manejo de los residuos de cosecha.

Los resultados de cortes longitudinales del tallo de plantas según los historiales del lote del cultivo (Figura 3-4) mostraron que en el historial de rotación, las cañas son principalmente de color crema y con ligeras coloraciones marrones en nudos y entrenudos, las áreas

necróticas se incrementaron en el historial de monocultivo de maíz donde se retiraron los residuos de cosecha y estas lesiones necróticas ocuparon la mayor área de tejido del tallo en el historial de monocultivo de maíz donde no se retiraron los residuos de cosecha.

### 3.4.2 Efecto de tratamiento de semillas, manejo de residuos e historial del lote del cultivo sobre el establecimiento del cultivo, parámetros de crecimiento, desarrollo y componentes de rendimiento de maíz variedad regional Simijaca

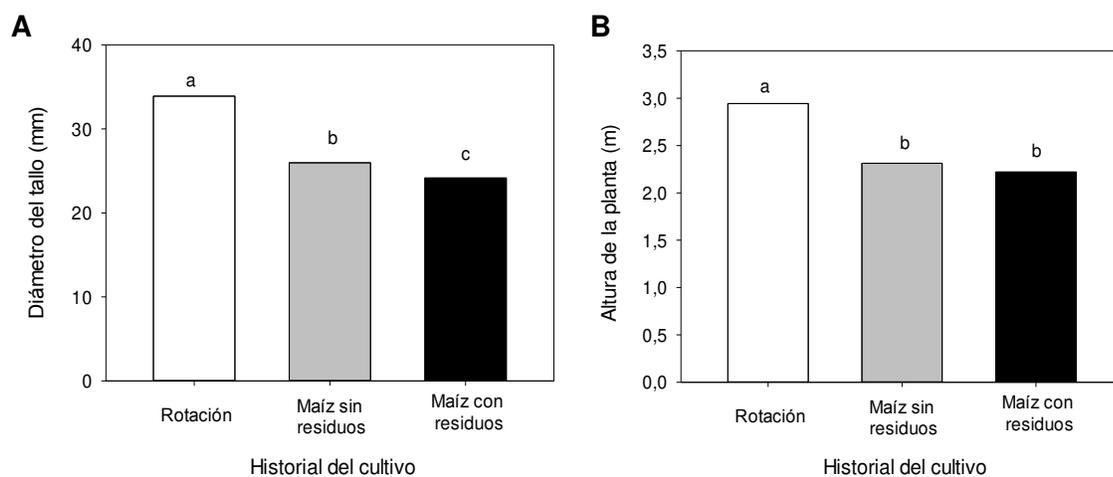
La germinación de la semilla mostró que no hubo diferencia estadística entre los tratamientos térmicos y el control, pero si respecto a los tratamientos químicos (Thiabendazole, Metalaxil + Propamocarb, Clorhidrato de Oxitetraciclina + Sulfato de Gentamicina, Carboxim+ Thiram) siendo el porcentaje de germinación menor ( $P < 0,0001$ ) en el tratamiento químico. Con respecto a los historiales del lote del cultivo, los porcentajes de germinación fueron similares en el historial de rotación y donde se retiraron los residuos de cosecha (64,17% y 64,27% respectivamente) en tanto que en el lote donde se dejaron los residuos de cosecha, el porcentaje de germinación fue mayor con 68,5% ( $P = 0,0413$ ) (Figura 3-5).



**Figura 3-5.** Porcentaje de germinación de semilla de maíz variedad regional Simijaca por historial del lote del cultivo y manejo de los residuos de cosecha 30 días después de siembra. Letras diferentes denotan diferencia estadística según Duncan ( $p < 0,05$ ).

Las variables diámetro del tallo y altura como medida del vigor de la planta al momento de la aparición de la espiga no se vieron afectadas por los tratamientos térmicos y químico respecto al control. No obstante, entre historiales del cultivo el mayor diámetro del tallo (Figura 3-6a) se obtuvo en el lote que viene de rotación (33,9 mm) seguido por el lote en monocultivo de maíz donde se retiraron los residuos de cosecha (25,98 mm) y por último donde no se retiraron los residuos de cosecha (24,16 mm) ( $P < 0,0001$ ).

La altura de la planta por su parte fue mayor en el lote de rotación con valores de 2,9 m ( $P < 0,0001$ ) respecto a los 2,3 m en el lote en monocultivo de maíz donde se retiraron los residuos de cosecha y 2,2 m donde no se retiraron (Figura 3-6b). Sin embargo, estos últimos valores no se diferenciaron estadísticamente. Efecto significativo solo se encontró en el tratamiento químico, presentando menores valores de altura de la planta respecto a los demás tratamientos realizados a la semilla ( $P < 0,0001$ ). En la figura 3-7 se muestra la diferencia en altura de las plantas de maíz respecto la altura de una persona que mide 1,70 m como referencia.

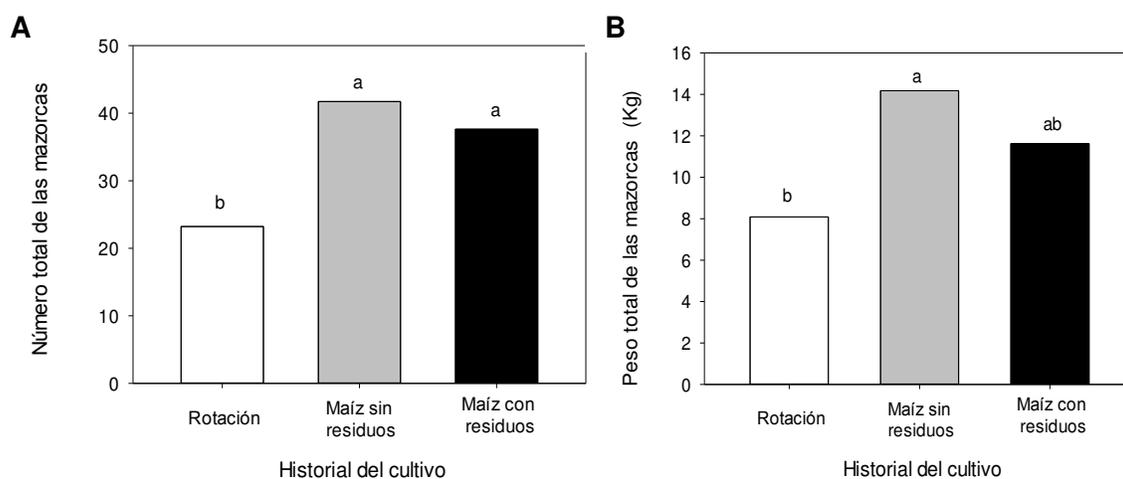


**Figura 3-6.** Efecto del historial del lote del cultivo y el manejo de los residuos de cosecha sobre el crecimiento de planta de maíz variedad regional Simijaca en el momento de espigamiento (VT) 106 días después de siembra. A) Diámetro del tallo y B) altura de la planta. Letras diferentes denotan diferencia estadística según Tukey ( $p < 0,05$ ).



**Figura 3-7.** Diferencia en altura de plantas de maíz variedad regional Simijaca en estado de espigamiento (VT) 106 días después de la siembra en dos historiales del lote del cultivo con distinto manejo de los residuos de cosecha. A) Historial de rotación y B) historial de monocultivo de maíz con residuos de cosecha. Como referencia se muestra la diferencia en altura de las plantas de maíz respecto la altura de una persona que mide 1,70 m.

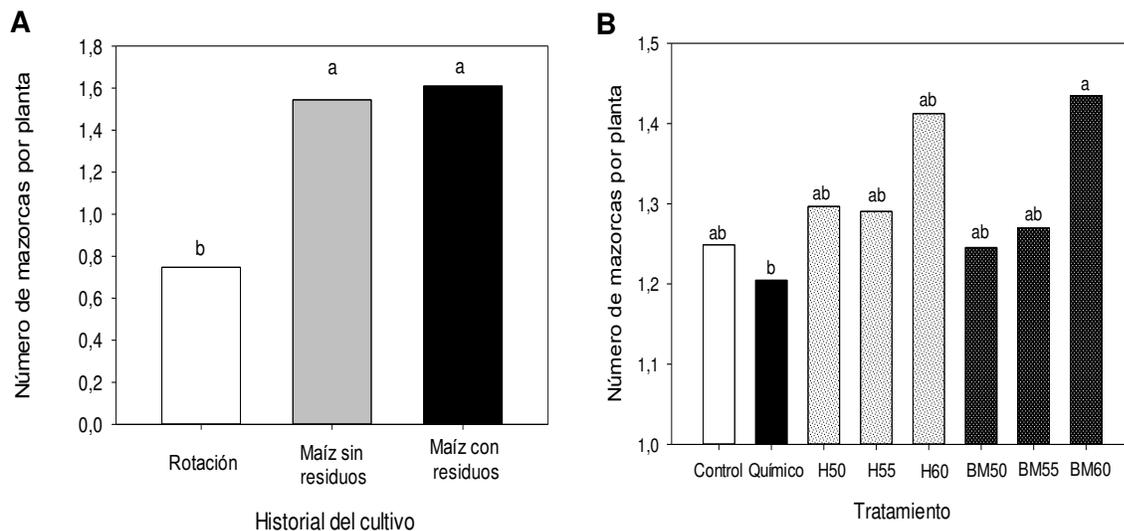
Respecto al peso y número total de mazorcas (Figura 3-8a) el historial con residuos y sin residuos de cosecha obtuvieron un número total de mazorcas similar, pero duplicando el obtenido en el historial de rotación ( $P=0,0035$ ).



**Figura 3-8.** Efecto del historial del lote del cultivo y manejo de los residuos de cosecha sobre parámetros de rendimiento de plantas de maíz variedad regional Simijaca al momento de la cosecha (R4) 161 días después de la siembra. A) Número total de mazorcas y B) peso total de las mazorcas. Letras diferentes denotan diferencias estadísticas según Tukey ( $p<0,05$ ).

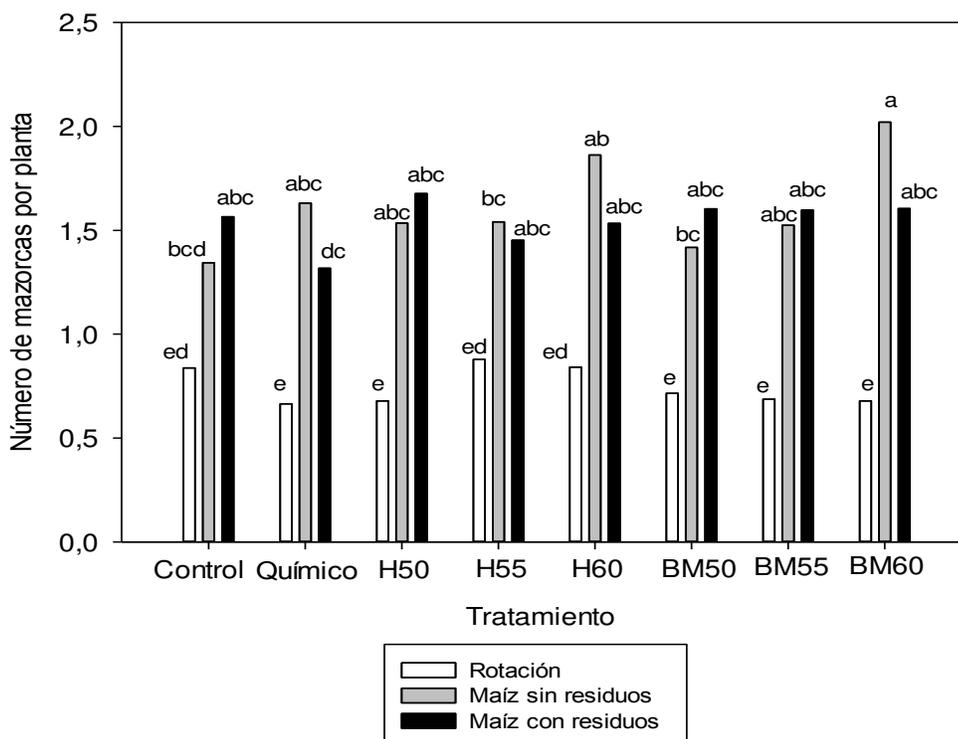
Sin embargo, en términos de peso total de las mazorcas cosechadas (Figura 3-8b) se observó una tendencia a menor peso de las mazorcas en el historial de maíz con residuos de cosecha, siendo menor en dos kilogramos, respecto al lote sin residuos ( $P=0,0068$ ). Al igual que el número de mazorcas, el peso total de las mazorcas fue reducido a la mitad en el historial de rotación respecto los otros dos historiales del cultivo evaluados. Respecto a los tratamientos a la semilla diferencia significativa se encontró únicamente entre el tratamiento químico y los tratamientos térmicos y control siendo menor en el tratamiento químico ( $P<0,0001$ ).

En cuanto la variable número de mazorcas por planta (Figura 3-9a), los historiales con y sin residuos de cosecha no presentaron diferencia, aunque si respecto al historial de rotación ( $<P0,0001$ ). Además, se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos térmicos, químicos y control ( $P=0,0547$ ) (Figura 3-9b).



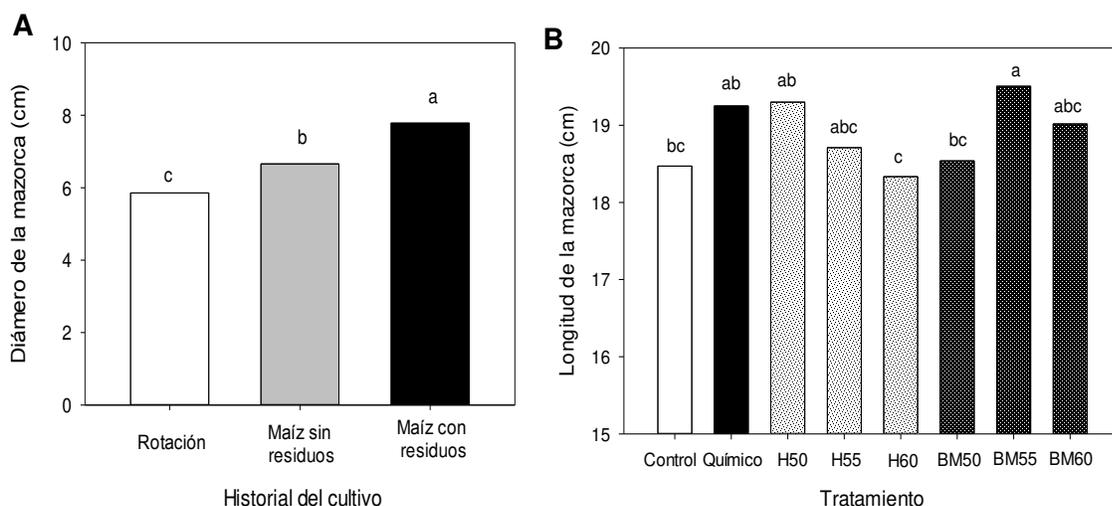
**Figura 3-9.** Efecto del historial del lote del cultivo, manejo de los residuos de cosecha y tratamientos a la semilla de maíz variedad regional Simijaca sobre el número de mazorcas por planta. A) Efecto según el historial de lote del cultivo y B) efecto según el tratamiento a la semilla. Letras diferentes denotan diferencia estadística según Tukey ( $P=0,0547$ ).

El mayor número de mazorcas por planta se encontró en el tratamiento térmico de la semilla a 60 °C por el método húmedo y en contraste el menor número de mazorcas por planta se obtuvo en el tratamiento químico; los demás tratamientos presentaron valores intermedios. Las interacciones entre historiales de cultivo y tratamientos a la semilla indicaron que la mayoría de tratamientos a la semilla bajo el esquema de rotación tienen en promedio una mazorca por planta ( $P=0,0032$ ). La mayoría de tratamientos a la semilla bajo el historial maíz-maíz sin residuos de cosecha no se diferenciaron con el historial maíz-maíz con residuos de cosecha. Los tratamientos a la semilla por medio de calor húmedo a 60 °C aumentaron a dos el número de mazorcas por planta cuando se realizaron en conjunto con el retiro de residuos de cosecha de la superficie del cultivo (Figura 3-10).



**Figura 3-10.** Interacciones entre historial del lote de cultivo y manejo de los residuos de cosecha y el tratamiento a la semilla sobre el número de mazorcas por planta de maíz variedad regional Simijaca. Letras diferentes denotan efecto significativo según Tukey ( $p < 0,05$ ).

El diámetro de la mazorca (Figura 3-11a) no presentó diferencia estadística entre tratamientos, aunque sí entre historiales del cultivo ( $P=0,0007$ ). El mayor diámetro de la mazorca se obtuvo en el historial con residuos de cosecha (7,78 cm), intermedio en el lote sin residuos (6,66 cm) y el menor valor se obtuvo en el lote de rotación (5,86 cm). Respecto a la longitud de la mazorca (Figura 3-11b), no se encontró diferencia estadística entre historiales del cultivo. Sin embargo, el tratamiento a 55 °C por el método húmedo obtuvo mayores longitudes respecto al control y los tratamientos en horno a 60 °C y húmedo a 50 °C. El tratamiento químico, y los tratamientos térmicos a 50 °C y 55 °C por método seco y 60° C por método húmedo mostraron menores valores, aunque sin diferencia estadística entre ellos ( $P=0,0273$ ).



**Figura 3-11.** Efecto del historial del lote del cultivo y manejo de los residuos de cosecha sobre parámetros de rendimiento de plantas de maíz variedad regional Simijaca al momento de la cosecha (R4) 161 días después de la siembra. A) diámetro de la mazorca, donde letras diferentes denotan diferencia estadística según Tukey ( $p<0,05$ ) y B) longitud de la mazorca en plantas, donde letras diferentes muestran diferencia estadística según Duncan ( $p<0,05$ ).

Las interacciones entre el historial del cultivo y los tratamientos a la semilla sobre el diámetro y la longitud de la mazorca se muestran en la tabla 3-3 y en ella se observa que

el diámetro del tallo en todos los tratamientos térmicos dentro del historial de rotación presenta los más bajos calibres ( $P=0,053$ ), intermedios en el lote en monocultivo de maíz donde se retiraron los residuos de cosecha y los más altos donde los residuos de cosecha se dejaron.

**Tabla 3-3.** Interacciones entre el historial del cultivo y el tratamiento térmico a la semilla de maíz variedad regional Simijaca sobre el diámetro y la longitud de la mazorca de maíz variedad regional Simijaca al momento de la cosecha (R4) 161 días después de la siembra. Letras diferentes indican efecto significativo según Duncan ( $p<0,05$ )

| Historial del cultivo<br>(parcela principal) | Tratamiento a la semilla<br>(sub-parcelas) | Diámetro |     | Longitud |      |
|--|--|----------|-----|----------|------|
|  |  | %        |     | %        |      |
| <b>Rotación</b>                              | Control                                    | 5,95     | g   | 18,95    | abcd |
|  | Químico                                    | 5,76     | g   | 18,65    | bcd  |
|  | H50  | 6,05     | g   | 19,98    | ab   |
|  | H55  | 5,71     | g   | 18,13    | dc   |
|  | H60  | 5,86     | g   | 17,77    | d    |
|  | BM50                                       | 5,95     | g   | 19,09    | abcd |
|  | BM55                                       | 5,95     | g   | 19,94    | ab   |
|  | BM60                                       | 5,76     | g   | 18,41    | bcd  |
| <b>Maíz sin residuos</b>                     | Control                                    | 6,86     | ed  | 18,43    | bcd  |
|  | Químico                                    | 6,45     | f   | 19,43    | abc  |
|  | H50  | 6,55     | ef  | 18,84    | abcd |
|  | H55  | 6,76     | edf | 18,78    | bcd  |
|  | H60  | 7,02     | d   | 18,65    | bcd  |
|  | BM50                                       | 6,71     | edf | 18,38    | bcd  |
|  | BM55                                       | 6,76     | edf | 20,38    | a    |
|  | BM60                                       | 6,50     | ef  | 18,68    | bcd  |
| <b>Maíz con residuos</b>                     | Control                                    | 7,67     | bc  | 18,04    | cd   |
|  | Químico                                    | 8,01     | ab  | 19,53    | abc  |
|  | H50  | 7,40     | c   | 19,05    | abcd |
|  | H55  | 8,12     | a   | 19,23    | abcd |
|  | H60  | 7,90     | ab  | 18,67    | bcd  |
|  | BM50                                       | 7,67     | bc  | 18,15    | cd   |
|  | BM55                                       | 7,78     | abc | 18,20    | cd   |
|  | BM60                                       | 7,84     | abc | 19,94    | ab   |

El tratamiento por medio de calor seco a 55 °C en el historial de maíz sin residuos de cosecha presenta el mayor calibre de la mazorca ( $P=0,053$ ). En cuanto a la longitud de la mazorca, la mayoría de tratamientos a la semilla dentro del historial de rotación y monocultivo de maíz con o sin residuos de cosecha son similares entre sí, sin embargo, el tratamiento por medio de calor seco a 60°C en el historial de rotación presenta la longitud más baja y el tratamiento a la semilla por medio de calor húmedo a 55 °C en el historial de maíz donde se retiraron los residuos de cosecha presenta la mayor longitud ( $P=0,0025$ ). Situaciones intermedias se presentaron en las demás combinaciones.

### **3.5 Discusión**

Desde el punto de vista de la enfermedad, la pudrición del tallo tiene un comportamiento de carácter monocíclico, en este sentido y con base en los resultados obtenidos la estimación del porcentaje de volcamiento como manifestación final de la pudrición del tallo puede realizarse calculando la incidencia de sintomatologías externas asociadas a la pudrición del tallo (enanismo, clorosis y antocianescencia) presentadas en el estadio de desarrollo (VT), la cual será cercana al porcentaje de volcamiento registrado al momento de la cosecha (R4) (Figura 3-1 y 3-3). En el estado de desarrollo R4, la incidencia de la enfermedad fue baja y similar entre historiales del cultivo esto debido a que la mayoría de las plantas que se contaron como enfermas en estados de desarrollo anteriores para ese momento ya se habían volcado.

El paso de una fase de crecimiento vegetativo a una reproductiva induce la expresión del síntoma final de la pudrición del tallo, correspondiente al volcamiento, debido al

debilitamiento del tallo por la demanda del vertedero y el peso de la mazorca (Figura 3-3 a). En este estudio la mayor incidencia de la pudrición del tallo se registró en el lote con residuos de cosecha (22%), intermedio en el lote sin residuos de cosecha (17%) y bajo en el lote de rotación (10%). La implementación individual de los tratamientos térmicos a la semilla o la planificación de la secuencia de cultivos con el retiro o no de los residuos de cosecha no tuvo un efecto significativo sobre el porcentaje de volcamiento. Sin embargo, la implementación conjunta de la rotación y de los tratamientos térmicos a la semilla por medio de calor seco por diez minutos a 50 °C generó reducciones del volcamiento del 54%.

Dado que en maíz compuestos antimicrobiales como los ácidos hidroxámicos como DIMBOA y DIBOA tienen la mayor concentración absoluta durante los primeros 6 a 8 días después de la germinación (Klun y Robinson, 1969), y a los cuales las especies de *Fusarium* spp. son tolerantes lo cual propicia su asociación con maíz (Glenn *et al.* 2001), es probable que al dejar los residuos de cosecha en el suelo se favorezca la germinación de la semilla debido a la temprana colonización de *F. graminearum* (FGSC) y *F. subglutinans* (FFSC). En este estudio, el porcentaje de establecimiento fue mayor en el historial de monocultivo de maíz donde se dejaron los residuos de cosecha (68,5%). Esto contrasta con la considerable reducción de la germinación de la semilla expuesta a tratamientos térmicos en el laboratorio conforme se incrementa la temperatura y tiempo de exposición, donde hubo la gradual disminución en el índice de severidad en la semilla y porcentaje de aislamiento de *Fusarium* spp. (Piñeros-Guerrero *et al.* 2019).

Pese a que se registró mayor número de plantas en el historial de monocultivo de maíz donde se dejaron los residuos de cosecha, la asociación entre *F. graminearum* y *F. subglutinans* y maíz tiene un coste en términos energéticos para la planta cuantificable mediante la altura y diámetro del tallo. De esta forma, mayores calibres del tallo (Figura 3-

6 a) se obtuvieron cuando se siembra maíz luego de un periodo de rotación de al menos dos años (33,9 mm), intermedios cuando se retiran los residuos de cosecha (25,98 mm) y los más bajos cuando se dejan los residuos de cosecha en el suelo (24,16 mm). En cuanto a la altura de la planta (Figura 3-6 b), esta fue mayor cuando se sembró el maíz luego del periodo de rotación por al menos dos años (2,9 m) respecto a los lotes donde se retiran (2,3 m) o no (2,2 m) los residuos de cosecha.

Yates *et al.* en 1997 reportaron un ligero pero significativo incremento en el peso, altura y diámetro del tallo en plantas de maíz inoculadas con *F. verticillioides* (FFSC) a los 28 días, bajo condiciones de cuarto de crecimiento. Esto contrasta con el comportamiento de la altura y diámetro del tallo observado en este estudio en condiciones de campo, ya que bajo el escenario de menor cantidad de inóculo posible (rotación) se presentaron mayores alturas y calibres del tallo. Por lo anterior, se podría considerar que los ligeros incrementos de altura y diámetro del tallo en estadios tempranos de desarrollo favorecidos por la asociación *Fusarium* spp. - maíz, son transitorios y representan un costo energético para la planta traducido en términos de crecimiento en altura y diámetro del tallo al final del ciclo del cultivo.

El análisis químico del suelo (Anexo K) de los lotes evaluados indica que los aumentos obtenidos en el crecimiento se deben principalmente al tratamiento de los residuos del cultivo y la rotación ya que el pH de ambos historiales muestra suelos muy ácidos, con contenidos de nitrógeno, calcio, potasio, fósforo, azufre, cobre, hierro, manganeso y boro comparables, y hay diferencias únicamente en el contenido de magnesio y zinc que no se asocian con promoción del crecimiento como se observó en el lote con rotación.

Dodd, (1980b) reporta que las plantas de maíz con tallo podrido presentan entre un 10-19% más de granos que plantas sanas adyacentes sin ningún síntoma evidente de estrés ni enfermedad. Esta observación destaca la importancia del ciclaje de carbohidratos ya que aparentemente la translocación de una cantidad importante de azúcares disponibles en los tallos de las plantas a causa de la pudrición del tallo, resulta en su almacenamiento en las mazorcas. En este estudio, el aumento en el número y peso de las mazorcas en los historiales de monocultivo de maíz puede en parte ser explicado por lo anterior ya que, aunque mucha energía en la etapa de prefloración es gastada en el crecimiento y mantenimiento celular, hasta el 20% del peso de los granos viene de los carbohidratos almacenados en el tallo (Dodd, 1980a).

Dado que el peso de diez mazorcas entre historiales del cultivo ( $P=0,122$ ), tratamientos a la semilla ( $P=0,22$ ) y sus interacciones ( $P=0,1556$ ) no mostraron diferencia estadística significativa y que los historiales del cultivos aquí planteados no son comprables en el número y peso total de las mazorcas debido a las dinámicas propias de la germinación y del porcentaje de volcamiento, las diferencias encontradas en términos de rendimiento se deben al número de mazorcas por planta, teniendo en cuenta el número de plantas en pie al momento de la cosecha. Los resultados obtenidos a partir de los tratamientos térmicos a la semilla por medio de calor húmedo a 60 °C donde se incrementó el número de mazorcas por planta y con ello el *fitness* del cultivo (Figura 3-9 y figura 3-10) siempre que se hagan bajo un esquema de retiro de los residuos de cosecha, sugiere la implementación conjunta de estas dos prácticas como alternativa para el manejo de la pudrición del tallo de maíz.

Aunque ha sido conocida la disminución de inóculo de *Fusarium* spp. presente en la semilla por medio de tratamientos de calor y sus implicaciones sobre germinación y vigor de las

plantas (Bennett y Colyer, 2010; Clear *et al.* 2002; Coutinho *et al.* 2007; Daniels, 1983) a nuestro conocimiento pocos estudios evalúan parámetros de crecimiento y rendimiento en semillas tratadas térmicamente bajo condiciones de campo.

En cuanto a parámetros de rendimiento, la rotación del cultivo tuvo un efecto negativo sobre el *fitness* del cultivo, reduciendo a la mitad el número de mazorcas aptas para cosecha pese a que se obtuvieron los mayores valores de altura y diámetro del tallo. Los lotes con historial maíz-maíz donde se retiraron o no los residuos de cosecha obtuvieron el doble de la producción, lo anterior, destaca la importancia de la asociación del maíz variedad regional Simijaca con *F. graminearum* y *F. subglutinans* en el valle de Ubaté.

El mayor diámetro de la mazorca en el historial con residuos de cosecha (7,78 cm) se podría explicar por la mayor intensidad lumínica y menor competencia intraespecífica del maíz ya que en el historial con residuos de cosecha se obtuvo un mayor porcentaje de volcamiento (Figura 3-3 b) lo que implica mayor radiación lumínica sobre las plantas que quedan en pie. Una situación intermedia se presentó en el lote sin residuos de cosecha (6,66 cm) y la más baja en la rotación (5,86 cm). Respecto a la longitud de la mazorca el tratamiento a 55 °C por el método húmedo generó las mayores longitudes (19,55 cm) respecto al control (18,47 cm) y a los tratamientos en seco a 60 °C (18,33 cm) y húmedo a 50 °C (18,54 cm). Estos resultados muestran cambios en el crecimiento y desarrollo de las plantas de maíz asociados a las prácticas del cultivo que no son evidentes desde la siembra, pero que se reflejan en parámetros de la mazorca y en rendimiento al momento de la cosecha.

El tratamiento químico comercial implementados por los agricultores de la zona a la semilla de maíz como medida de manejo de la pudrición del tallo de maíz mostró una reducción

---

del porcentaje de germinación de la semilla, el número y peso de mazorcas, el número de mazorcas por planta e incremento la incidencia de la pudrición del tallo, por lo cual no se puede considerar como un tratamiento recomendado para el manejo de la enfermedad.

Las prácticas de labranza mínima dejan residuos de maíz sobre la superficie del suelo, lo que resulta en un incremento en la cantidad de inóculo inicial para los subsecuentes ciclos de producción (Manstretta y Rossi, 2015). En el presente estudio se evidenció que dejar sobre la superficie del suelo los residuos de cosecha estimula la germinación de la semilla de maíz sí se compara con el historial de retiro y entierro de residuos o la rotación de cultivos, lo cual se traduce en un mayor potencial de rendimiento por el mayor número de plantas establecidas. Esto sugiere reevaluar la forma en que se realizan las prácticas de no mecanización o labranza cero ya que, aunque dejar los residuos de cosecha ha contribuido a brotes de enfermedades (Keller *et al.* 2011), es posible que la asociación entre *F. graminearum* y *F. subglutinans* y maíz sea beneficiosa para el cultivo. Por lo anterior, el manejo del potencial de inóculo mediante la planificación del manejo de residuos de cosecha es probable que sea lo adecuado y no la completa eliminación o sobre-acumulación del potencial de inóculo y tal decisión debe considerar el contexto ecológico y climático donde crece y se desarrolla el cultivo como lo mencionan Hawkes y Connor (2017).

Con los resultados de este estudio se muestra una relación de costo-beneficio entre la asociación maíz variedad regional Simijaca y *F. graminearum* y *F. subglutinans* a través del todo el ciclo del cultivo, destacando con ello la importancia de esta asociación para esta variedad de maíz adaptada al trópico frío y sus implicaciones en el rendimiento. Por esto la rotación de cultivos de largo plazo, con el fin de reducción del potencial de inóculo de *Fusarium* spp. parece no ser una medida de manejo deseable en términos de

rendimiento para el cultivo de maíz variedad regional Simijaca, ya que, aunque en efecto se obtienen menores incidencias de la pudrición del tallo y de porcentajes de volcamiento, cuando se implementa la rotación de cultivos respecto al monocultivo con o sin retiro de residuos de cosecha, el *fitness* del cultivo reflejado en el número de mazorcas por planta es reducido a la mitad.

El manejo del potencial de inóculo en los residuos de cosecha, semilla y mediante rotaciones del cultivo menores a un año permitiría obtener mayor rendimiento por un aumento en el número mazorcas cosechadas por planta siempre y cuando estas medidas se implementen de forma conjunta. A pesar de la extensiva literatura sobre endófitos de pastos donde se ha entendido su beneficio al desempeño vegetal a través del aumento del vigor vegetal, resistencia de plagas y tolerancia al estrés (Funk *et al.* 1994) pocas investigaciones han documentado el impacto de hongos sobre el crecimiento y desarrollo de los cultivos en campo (Yates *et al.* 1997). Para el caso de maíz, los resultados del presente estudio podrían ser solo un ejemplo del beneficio prestado por *Fusarium* spp. para el maíz bajo las condiciones del trópico frío.

Sí bien son necesarios estudios adicionales, para profundizar en la pudrición del tallo de maíz de clima frío y su manejo, la evaluación integral de la enfermedad y de parámetros de crecimiento y rendimiento del cultivo abordada en este estudio permitió evidenciar que la rotación de cultivos con especies diferentes a gramíneas por periodos superiores a dos años no es deseable en términos de rendimiento para la zona de estudio. El manejo de los residuos de cosecha de maíz en el corto plazo junto con la desinfección de la semilla de maíz por medio de tratamientos térmicos puede contribuir al rendimiento del cultivo. Sin embargo, la pertinencia de tales medidas de manejo requiere también el análisis de la

fecha de siembra y la evaluación del riesgo de ocurrencia de la enfermedad que permitan decidir si tales medidas de manejo son o no necesarias.

### 3.6 Conclusiones

- i. La germinación fue positivamente afectada por la presencia de los residuos de cosecha, en tanto que la altura y diámetro del tallo fueron afectados de forma negativa. Aunque se obtuvieron plantas más altas y de mayor calibre cuando maíz se sembró en un lote bajo esquema de rotación por dos años, el rendimiento se redujo a la mitad, debido a una disminución del *fitness* del cultivo en términos del número de mazorcas por planta.
- ii. El tratamiento térmico a la semilla por medio de calor húmedo a 60 °C por cinco minutos incrementó el número de mazorcas por planta (el *fitness* de la planta). Cuando estas semillas fueron sembradas en un historial de monocultivo de maíz donde se retiraron los residuos de cosecha el aumento en el rendimiento fue aún mayor.
- iii. Menor incidencia de la pudrición del tallo de maíz se obtuvo en lotes con historial de rotación, intermedia cuando se retiraron los residuos de cosecha en el monocultivo de maíz y alta cuando se dejaron los residuos sobre la superficie del suelo. El manejo de residuos de cosecha del cultivo no tuvo efecto significativo sobre el porcentaje de volcamiento.
- iv. El tratamiento térmico a la semilla a 50 °C por medio de calor seco por diez minutos y a 60 °C por medio de calor húmedo por cinco minutos, redujeron la incidencia de la enfermedad y cuando estos tratamientos a la semilla se implementaron con la rotación de cultivos la disminución fue mayor.

- v. El tratamiento térmico a la semilla a 50 °C por medio de calor seco por diez minutos redujo el porcentaje de volcamiento, siempre que este tratamiento a la semilla se implementó con la rotación de cultivos, siendo también el más efectivo para reducir tanto la incidencia de la pudrición de tallo.
- vi. El tratamiento químico a la semilla usado por los productores, redujo el porcentaje de germinación, el número y peso de mazorcas, el número de mazorcas por planta e incremento la incidencia de la pudrición del tallo por lo que no se considera un tratamiento adecuado para el manejo de la pudrición del tallo de maíz.

### 3.7 Bibliografía

Bennett, R.S. y P.D. Colyer. (2010). Dry heat and hot water treatments for disinfecting cotton seed of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. *Plant Disease*, 94, 1469-1475. Doi: 10.1094/ PDIS-01-10-0052

Broders, K. D., Lipps, P. E., Paul, P. A., y Dorrance, A. E. (2007). Evaluation of *Fusarium graminearum* Associated with Corn and Soybean Seed and Seedling Disease in Ohio. *Plant Disease*, 91(21), 1155–1160. <https://doi.org/10.1094/PDIS-91-9-1155>

Clear, R.M., Patrick, S.K., Wallis, R. y Turkington, T.K. (2002). Effect of dry heat treatment on seed-borne *Fusarium graminearum* and other cereal pathogens. *Plant Pathology*, 24, 489-498. Doi: 10.1080/07060660209507038

Cotten, T. K., y Munkvold, G. P. (2007). Survival of *Fusarium moniliforme*, *F. proliferatum* and *F. subglutinans* in Maize Stalk Residue. *Phytopathology*, 88 (6), 550–555. <https://doi.org/10.1094/phyto.1998.88.6.550>

Coutinho, W., R. Silva, M. Vieira, C. Machado, y Machado. J. (2007). Qualidade sanitária e fisiológica de sementes de milho submetidas a termoterapia e condicionamento fisiológico. *Fitopatologia Brasileira*. 32, 458- 464. Doi: 10.1590/S0100-41582007000600002

- Daniels, B.A. (1983). Elimination of *Fusarium moniliforme* from corn seed. *Plant Disease*, 67, 609-611
- Dodd, J. L. (1980a). The Role of Plant Stresses in Development of Corn Stalk Rots. *Plant Disease*, 64 (6), 533–537
- Dodd, J.L. (1980b). Grain silk size and predisposition of *Zea mays* to stalk rot. *Phytopathology*, 70: 534-535
- Drayton, F. L. (1929). Bulb growing in Holland and its relation to disease control. *Scientia Agricola*, 9:494-50
- Dufault, N.S., De Wolf, E.D., Lipps, P.E., y Madden, L.V., (2006). Role of temperature and moisture in the production and maturation of *Gibberella zeae* perithecia. *Plant Disease*, 90 (5), 637–644, <http://dx.doi.org/10.1094/PD-90-0637>
- Duncan, K. E., y Howard, R. J. (2010). Biology of maize kernel infection by *Fusarium verticillioides*. *Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI*, 23(1), 6–16. doi:10.1094/MPMI-23-1-0006
- Funk, C. R., Belanger, F. C., y Murphy, J. A. (1994). Role of endophytes in grasses used for turf and soil conservation. 201-209. in: *Biotechnology of Endophytic Fungi of Grasses*. C. W. Bacon y J. F. White, Jr., eds. CRC Press, Boca Raton, Florida
- Glenn, A. E., Hinton, D. M., Yates, I. E., y Bacon, C. W. (2001). Detoxification of Corn Antimicrobial Compounds as the Basis for Isolating *Fusarium verticillioides* and Some Other *Fusarium* Species from Corn. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(7), 2973–2981. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.7.2973-2981.2001>
- Hawkes, C. V, y Connor, E. W. (2017). Translating Phytobiomes from Theory to Practice : Ecological and Evolutionary Considerations. *Phytobiomes*, 1(2), 57–69. doi:10.1094/PBIOMES-05-17-0019-RVW
- Keller, M.D., Thomason, W.E., Schmale III, D.G., (2011). The spread of a released clone of *Gibberella zeae* from different amounts of infested corn residue. *Plant Disease*. 95 (11), 1458–1464
- Klun, J., y Robinson, J. (1969). Concentration of two 1,4-benzoxazinones in dent corn at various stages of development of the plant and its relation to resistance of the host plant to the European corn borer. *Journal of Economic Entomology*, 62, 214-220

- Leslie, J. F., Pearson, C. A. S., Nelson, P. E., y Toussoun, T. A. (1990). *Fusarium* spp. from corn, sorghum, and soybean fields in the central and eastern United States. *Phytopathology*, 80:343-350
- Machado, J.D.C., A. Machado, E.A. Pozza, C.F. Machado, y Zancan, W. (2013). Inoculum potential of *Fusarium verticillioides* and performance of maize seeds. *Tropical Plant Pathology*, 38(3), 213-217. Doi: 10.1590/S1982-56762013000300005
- Manzo, S. K., y Claffin, L. E. (1984). Survival of *Fusarium moniliforme* hyphae and conidia in grain sorghum stalks. *Plant Disease*, 68: 866-867
- Manstretta, V., y Rossi, V. (2015). Modelling the effect of weather on moisture fluctuations in maize stalk residues, an important inoculum source for Plant disease. *Agricultural and Forest Meteorology*, 207, 83–93. <https://doi.org/10.1016/j.agrformet.2015.04.001>
- McMullen, M., Bergstrom, G., De Wolf, E., Dill-Macky, R., Hershman, D., Shaner, G., Van Sanford, D. (2012). A unified effort to fight an enemy of wheat and barley: *Fusarium* head blight. *Plant Disease*. 96 (12), 1712–1728
- Munkvold, G., Hellmich, R., y Showers, W. (1997). Reduced *Fusarium* ear rot and symptomless infection in kernels of maize genetically engineered for European corn borer resistance. *Phytopathology*, 87, 1071-1077
- Munkvold, G. P. (2003). Cultural and genetic approaches to managing mycotoxins in maize. *Annual Review of Phytopathology*, 41 (1), 99–116. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.41.052002.095510>
- Nyvall, R. F., y Kommedahl, T. (1970). Saprophytism and survival of *Fusarium moniliforme* in corn stalks. *Phytopathology*, 60: 1233-1235
- Piñeros-Guerrero, N., Maldonado-Archila, G. y Gómez-Caro, S. (2019). Effect of thermal and in vitro fungicide treatments on pathogens of the genus *Fusarium* associated with maize seeds. *Agronomía colombiana*, 37 (3): 228-238
- Quemada, M., (2004). Predicting crop residue decomposition using moisture adjusted time scales. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 70 (3), 283–291, <http://dx.doi.org/10.1007/s10705-004-0531-5>
- Ritchie, S. W., J. J. Hanway, y G. O Benson. (1996). How a Corn Plant Develops. Iowa State University Cooperative Extension Special Report No. 48. Ames, Iowa, USA.

- 
- Schaafsma A.W., Tamburic-Ilinic, L., Miller J.D., Hooker D.C. (2001). Agronomic considerations for reducing deoxynivalenol in wheat grain. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 23: 279–85
- Stroo, H.F., Bristow, K.L., Ellittott, L.F., Papendick, R.I., y Campbell, G.S., (1989). Predicting rates of wheat residue decomposition. *Soil Science Society of America Journal*, 53, 91–99
- Sumner, D. R., Doupnik, B., y Boosalis, M. G. (2003). Effects of Reduced Tillage and Multiple Cropping on Plant disease. *Annual Review of Phytopathology*, 19 (1), 167–187. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.19.090181.001123>
- Takeuchi, S., (1987). Importance and problems of disposal of crop residues containing pathogens of Plant disease. *JARQ– Japan Agricultural Research Quarterly*. 21 (2), 102–108
- Tschanz, A.T., Horst, R.K., Nelson, P.E., (1976). The effect of environment on sexual reproduction of *Gibberella zeae*. *Mycologia*, 68: 327–340
- Unger, P.W., (1994). *Managing Agricultural Residues*. Lewis Publishers, Boca Raton, Florida, USA
- Yates, I. E., Bacon, C. W., y Hinton, D. M. (1997). Effects of Endophytic Infection by *Fusarium moniliforme* on Corn Growth and Cellular Morphology. *Plant Disease*, 81(7), 723–728



## 4. Discusión general

Bajo las condiciones del valle de Ubaté la pudrición del tallo de maíz en las variedades Simijaca y Sogamoso fue detectada como la combinación de la clorosis del cogollo, antocianocencia de las hojas, enanismo de la planta, necrosis interna de cuello y nudos del tallo, la cual avanzó hacia los entrenudos, los cuales ocasionalmente presentaron coloraciones púrpuras. El volcamiento como la manifestación final de la pudrición del tallo ocurrió en cualquier etapa fenológica del cultivo y estas sintomatologías se ajustaron a las reportadas para las pudriciones del tallo causadas por *F. graminearum* (FGSC) y *F. verticillioides* (FFSC) en maíz (CIMMYT, 2004) aunque sobre los nudos del tallo en los residuos de cosecha de maíz se encontraron únicamente peritecios superficiales de *F. graminearum* (FGSC).

Las especies de *Fusarium* asociadas a la pudrición del tallo que fueron identificadas morfológicamente y molecularmente en este estudio y cuya patogenicidad fue confirmada en plantas de maíz variedad Simijaca, correspondieron a *F. graminearum* (FGSC) y *F. subglutinans* (FFSC). En este estudio *Fusarium* spp. se aisló desde la semilla en una frecuencia del 9% e incrementó su presencia al 46%, 64%, 82% y 92% en los estados de desarrollo de tres, seis, nueve hojas verdaderas y aparición de la espiga, indicando que *F. graminearum* y *F. subglutinans* están asociados con el maíz en la mayoría de los estados del ciclo del cultivo como se ha reportado para *F. verticillioides* (FFSC) en maíz (Schulz *et al.* 1999).

*F. graminearum* (FGSC) es predominante en áreas frías o con altos niveles de precipitación, en tanto que, *F. verticillioides* (FFSC) es predominante en áreas cálidas y

secas (Munkvold *et al.* 2018). En Suramérica, *F. verticillioides* es usualmente reportado como la especie más común en granos de maíz (Chulze *et al.* 1996), aunque en zonas frías de producción de Perú y México, *F. subglutinans* (FFSC) es la especie más común (Figuroa *et al.* 2010; Logrieco *et al.* 1993; Reyes-Velázquez *et al.* 2011). En este estudio la frecuente asociación entre *F. graminearum* y *F. subglutinans* con plantas de maíz con pudrición del tallo en el valle de Ubaté permiten inferir que las zonas de producción de clima frío y seco son óptimas para el desarrollo de la enfermedad a causa de *F. graminearum* y *F. subglutinans*, aunque la restricción en los niveles de humedad y precipitación podrían haber evitado epidemias aún más severas a causa de *F. graminearum*.

*F. graminearum* fue detectado en el aire, siendo esta una vía de diseminación del inóculo generado por los peritecios que es efectiva para la colonización área del maíz, adicionalmente *F. subglutinans* y *F. graminearum* fueron detectados en los detritos del cultivo y dado que *F. subglutinans* no forma estructuras de resistencia tipo clamidosporas y en *F. graminearum* son de lenta formación (Leslie y Summerell, 2006) estas estructuras no se detectaron en suelo aún en lotes con historial de pudrición del tallo. Por lo anterior, la fuente principal de inóculo de *F. graminearum* y *F. subglutinans* reside en los residuos de cosecha, como lo han reportado McMullen *et al.* (2012) para *F. graminearum* (FGSC) y para *F. verticillioides* (FFSC) por Cotten y Munkvold (2007), Manzo y Claflin, (1984) y Nyvall y Kommedahl, (1970).

Un limitado número de especies de *Fusarium* ha mostrado tener la capacidad de detoxificar 2- Benzoxazolinone (BOA), un compuesto de bajo peso molecular, naturalmente producido por maíz el cual tiene propiedades antimicrobiales a las cuales *F. verticillioides* (FFSC), *F.*

*subglutinans* (FFSC) y *F. graminearum* (FGSC) son tolerantes (Glenn *et al.* 2001). En este estudio el uso de BOA fue exitoso en la detección de *F. graminearum* (FGSC) y *F. subglutinans* a partir del aire, detritos, semilla y tejidos de la planta. La mayoría de especies con capacidad de metabolizar BOA tienen asociación endófitas con el maíz (Bacon *et al.* 2008) por lo que es probable que *F. subglutinans* y *F. graminearum* tengan también esta asociación con el maíz variedad Simijaca.

El aumento cualitativo en la deposición de lignina observada en los tallos de maíz variedad Simijaca crecidos en suelo naturalmente infectado con *Fusarium* spp., la hoja de ventaja en el desarrollo de plantas inoculadas con *F. subglutinans* y las modificaciones en la longitud en plantas inoculadas con *F. subglutinans* y *F. graminearum* que generó plantas de mayor longitud, con reducción del diámetro del tallo, en contraste con la inoculación conjunta de ambas especies, indicaron modificaciones en el crecimiento y desarrollo de las plantas de maíz sujetas a la inoculación de determinada especie de *Fusarium*. Este resultado concuerda con la promoción del crecimiento y desarrollo en términos de la altura, diámetro del tallo y peso de plántulas inoculadas con *F. verticillioides* (FFSC) observada por Yates *et al.* (1997).

Enmarcados en el concepto del balance fotosintético entre el estrés y la translocación planteado por Dodd (1980), el estrés de alta intensidad por frío y la sequía presentado durante un evento de niño tropical durante 2016/2017 pudo haber hecho migrar una relación normalmente en balance y sin efecto detrimental entre el maíz variedad regional Simijaca y *F. graminearum* y *F. subglutinans* a una interacción patogénica, pasando de biótropos asintomáticos a patógenos hemibiótrofos como se ha reportado para *F. verticillioides* (Bacon *et al.* 2008). Lo anterior puede explicar porque la repentina epidemia

de pudrición del tallo en el valle de Ubaté se consideró como una enfermedad emergente de la cual no se tenía un diagnóstico preciso aun cuando es una enfermedad de reconocida importancia en otras partes del mundo.

En el trópico, las condiciones de temperaturas frías o cálidas son principalmente homogéneas durante todo el ciclo del cultivo de forma que la pudrición del tallo se manifiesta únicamente cuando hay un desbalance entre la planta y su ambiente biótico y abiótico (el fitobioma) (Hawkes y Connor, 2017). En este estudio, menor volcamiento de maíz se reportó con mayores niveles de precipitación con respecto a un año seco y temperaturas mínimas promedio por debajo de los 10 °C hasta por 6 horas se asociaron con un mayor volcamiento de maíz. Como incidan estas dos variables sobre los eventos de volcamiento dependerá también del estado fenológico del maíz en el cual es afectado. Por ende, cultivos más desarrollados que son afectados por sequía y/o frío tienden a volcarse de forma tardía en tanto que los cultivos jóvenes tienden a volcarse de forma temprana uno a dos meses después, dependiendo de la intensidad de estas condiciones de estrés.

Simijaca es un municipio ubicado en medio del valle de Ubaté con zonas planas rodeadas de cadenas montañosas que regulan el movimiento del aire, por lo que el aire frío se concentró en las zonas bajas y fluyó en las laderas de las montañas dándole a la enfermedad una naturaleza localizada en el valle y zonas de escape en las laderas u otras zonas de producción. Además, cualquier característica del paisaje que influencie el movimiento del aire impacta la diseminación del patógeno (Plantegenest *et al.* 2007) y la deposición de esporas (Prussin, 2013; Schmale *et al.* 2006).

El manejo de las principales fuentes de inóculo de *F. graminearum* (FGSC) y *F. subglutinans* (FFSC) identificadas en este estudio, por medio del retiro y entierro de los residuos de cosecha y el tratamiento térmico a la semilla destacó que pese a que se registró mayor número de plantas en el historial de monocultivo de maíz donde se dejaron los residuos de cosecha, la asociación entre *F. graminearum* y *F. subglutinans* y maíz tiene un coste en términos energéticos cuantificable mediante la altura de la planta y el diámetro del tallo. De esta forma, mayores calibres del tallo y altura de la planta se obtuvieron cuando se sembró maíz luego de un periodo de rotación de al menos dos años. Por lo anterior, se podría considerar que los ligeros incrementos de altura y diámetro del tallo en estadios tempranos de desarrollo prestados por la asociación *F. verticillioides* (FFSC) - maíz encontrados por Yates *et al.* (1997), son transitorios y representan un costo energético para la planta.

Respecto a los parámetros de la enfermedad, la incidencia de la pudrición del tallo fue baja y similar cuando la planta tenía tres hojas verdaderas entre los tres historiales del cultivo evaluados, en los estados de desarrollo de seis, nueve hojas verdaderas y en el espigamiento de la planta la incidencia fue alta en el historial de manejo maíz-maíz donde se dejaron los residuos de cosecha, intermedia donde se retiraron y baja en la rotación. En el estado de desarrollo de aparición de estigmas de la mazorca, la incidencia volvió a ser baja y similar entre historiales del cultivo debido a que las plantas contadas como enfermas para este momento ya se habían volcado, denotando con ello un comportamiento de tipo monocíclico de la enfermedad. Con base en lo anterior, el cálculo de la incidencia en el estado de desarrollo de aparición de la espiga puede dar una idea del porcentaje del volcamiento al final de la cosecha.

La implementación de la rotación de cultivos con especies diferentes a gramíneas por más de dos años redujo la incidencia de la enfermedad y los tratamientos a la semilla por medio de calor seco a 50 °C y húmedo a 60 °C también, no obstante, cuando la semilla objeto de estos tratamientos térmicos fue sembrada bajo el historial de rotación la reducción en la incidencia fue mayor. Respecto al porcentaje de volcamiento ningún tratamiento de manejo de residuos de cosecha ni tratamientos a la semilla redujo el volcamiento, sin embargo, la conjunción de los tratamientos térmicos a la semilla por medio de calor seco a 50 °C siempre que se implementó en un historial de rotación, redujo el porcentaje de volcamiento en un 54%.

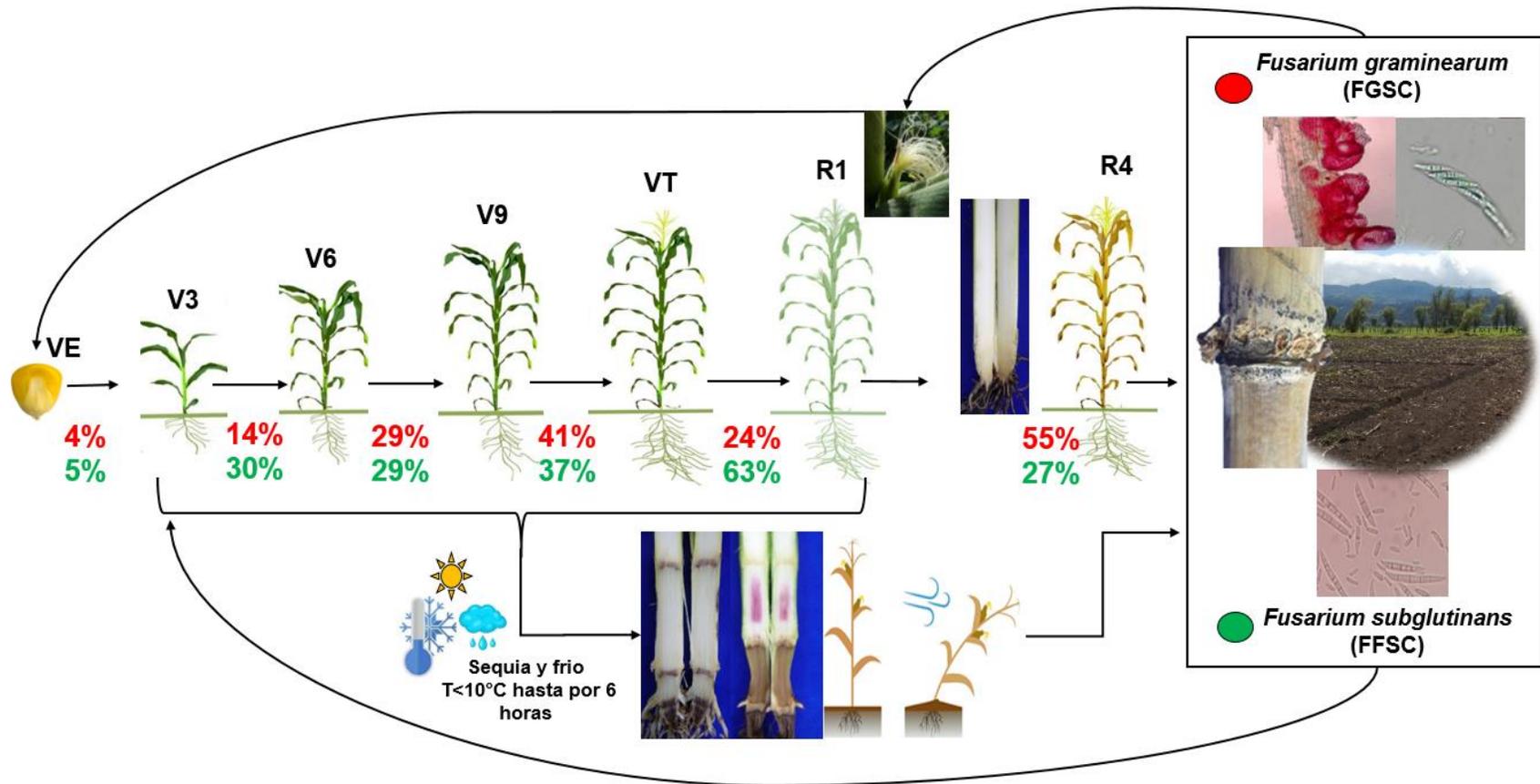
Los tratamientos térmicos a la semilla por medio de calor húmedo a 60 °C incrementaron el número de mazorcas por planta y con ello el *fitness* del cultivo y cuando se sembraron bajo un esquema de retiro de los residuos de cosecha el incremento fue mayor. Aunque ha sido conocida la disminución de inóculo de *Fusarium* spp. presente en la semilla por medio de tratamientos de calor y sus implicaciones sobre la germinación y vigor de las plantas (Bennett y Colyer, 2010; Clear *et al.* 2002; Coutinho *et al.* 2007; Daniels, 1983) pocos estudios evalúan parámetros de crecimiento y rendimiento en semillas tratadas térmicamente bajo condiciones de campo. En contraste, este estudio aporta resultados que muestran el efecto de estos tratamientos térmicos a la semilla sobre el establecimiento del cultivo, crecimiento, niveles de pudrición del tallo y volcamiento asociados a *Fusarium* spp. y parámetros de rendimiento, que tienen aplicación práctica frente al riesgo de epidemias en campo.

El concepto del balance fotosintético entre el estrés y la translocación planteado por Dodd (1980) aplica para la variedad regional Simijaca por lo que a futuro una forma más acertada

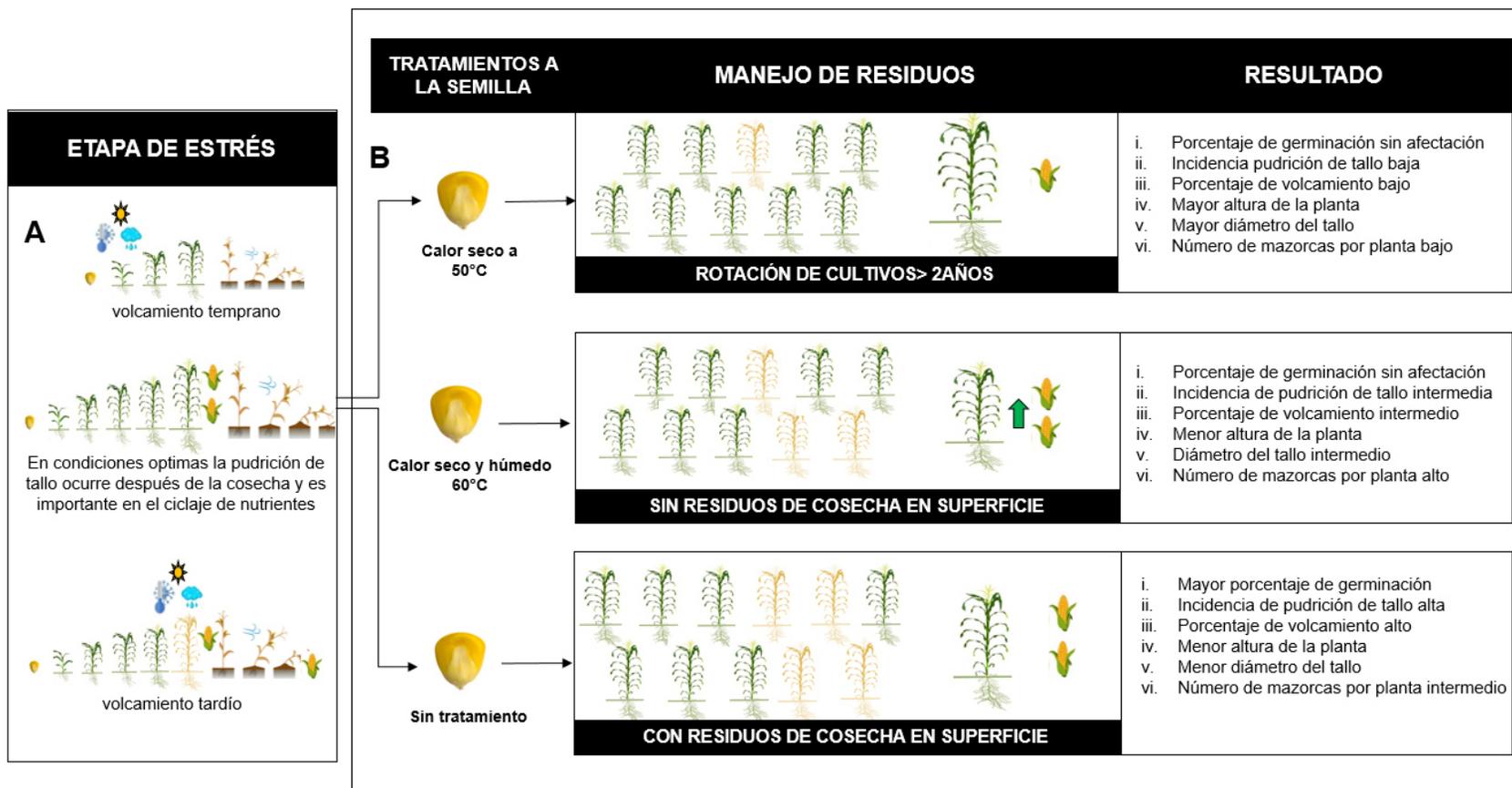
para predecir la vulnerabilidad de cultivos de esta y otras variedades de maíz de clima frío a la pudrición del tallo por *Fusarium* spp. debe incluir estudios que consideren su exposición al frío y a condiciones de sequía, de forma que los esfuerzos en los programas de mejoramiento de variedades consideren como variables tanto el alto rendimiento como el bajo porcentaje de plantas con pudrición del tallo. La evaluación integral realizada de la enfermedad y de parámetros de crecimiento y rendimiento del cultivo, permitió evidenciar que la rotación de cultivos con especies diferentes a gramíneas por periodos superiores a dos años no es deseable en términos de rendimiento para la zona bajo estudio.

El manejo de los residuos de cosecha de maíz en el corto plazo (periodos inferiores a un año) junto con la desinfección de la semilla de maíz por medio de tratamientos térmicos pueden aumentar el rendimiento del cultivo sin que ello implique la contaminación de granos por micotoxinas. Sin embargo, tales medidas de manejo requieren el análisis de la fecha de siembra más oportuna, la evaluación del riesgo de ocurrencia de la enfermedad a lo largo del ciclo del cultivo, y decidir el momento de la remoción de los residuos de cosecha y si los tratamientos térmicos a la semilla son necesarios.

Finalmente, a modo de resumen se propone un ciclo de patogénesis para la pudrición del tallo bajo las condiciones climáticas del valle de Ubaté, las cuales dirigen y modulan el resultado de la asociación entre *F. graminearum* (FGSC) y *F. subglutinans* (FFSC) entre endofitismo y enfermedad con el maíz variedad regional Simijaca (Figura 4-1). Así mismo se presenta un modelo conceptual que resume el efecto del estado de desarrollo del maíz, el manejo de los residuos de cosecha y los tratamientos térmicos a la semilla sobre la enfermedad, crecimiento de las plantas y rendimiento del cultivo bajo las condiciones climáticas del valle de Ubaté (Figura 4-2).



**Figura 4-1.** Ciclo de patogénesis para la pudrición del tallo causada por *F. graminearum* (FGSC) y *F. subglutinans* (FFSC) en maíz (*Zea mays* L.) bajo las condiciones climáticas del valle de Ubaté las cuales modulan la relación entre endofitismo y enfermedad dependiendo del contexto climático. VE: emergencia de la semilla. V3, V6 y V9: tres, seis y nueve hojas verdaderas respectivamente. VT: aparición de la espiga (espigamiento). R1: aparición de los estigmas de la mazorca. R4: grano con el 40% de masa seca. Porcentajes de color rojo: frecuencias de aislamiento de *F. graminearum*. Porcentajes de color verde: frecuencias de aislamiento de *F. subglutinans*.



**Figura 4-2.** Modelo conceptual del efecto del estado de desarrollo del maíz (*Zea mays* L.), el manejo de los residuos de cosecha y tratamientos térmicos a la semilla sobre la enfermedad, crecimiento de las plantas y rendimiento del cultivo bajo las condiciones climáticas del valle de Ubaté. A) Efecto del momento del ciclo del cultivo en la cual el maíz es afectado por episodios de sequía y frío. B) Efecto del manejo de residuos de cosecha, tratamientos a la semilla y su efecto esperado sobre la enfermedad, crecimiento y rendimiento del cultivo. Plantas de color amarillo: plantas con pudrición del tallo que se vuelcan. Plantas verdes: plantas sanas.



## 5. Conclusiones y recomendaciones

### 5.1 Conclusiones generales

- i.* Las variedades regionales Sogamoso y Simijaca fueron susceptibles a la pudrición del tallo de maíz y la enfermedad fue detectada en campo como la combinación de los síntomas externos de clorosis del cogollo, antocianocencia de las hojas y enanismo de la planta desde los 90 días después de siembra cuando las plantas tenían nueve hojas verdaderas (V9). El volcamiento como la manifestación final de la desintegración y pudrición basal del tallo puede ocurrir en cualquier etapa fenológica del cultivo.
- ii.* Las especies de *Fusarium* asociadas a la pudrición del tallo de maíz y encontradas asociadas a las variedades regionales Simijaca y Sogamoso fueron identificadas morfológicamente y molecularmente en este estudio como *F. graminearum* (FGSC) y *F. subglutinans* (FFSC). Las pruebas de patogenicidad los confirmaron como los agentes causales de la pudrición del tallo de maíz en la variedad Simijaca.
- iii.* La frecuencia de aislamiento de *Fusarium* spp. a partir de plantas de maíz fue del 60% para todos los estados de desarrollo del cultivo y del 46%, 64%, 82% y 92% en estados de desarrollo de tres, seis, nueve hojas verdaderas y espigamiento (V3, V6, V9 y VT, respectivamente) sugiriéndose una colonización aérea de las plantas por parte de *F. graminearum* y *F. subglutinans*. En campo se observó la presencia de peritecios superficiales de *F. graminearum* sobre los nudos de maíz y ausencia de peritecios de *F. subglutinans*.
- iv.* En este estudio la frecuente asociación entre *F. graminearum* y *F. subglutinans* con plantas de maíz con pudrición del tallo en el valle de Ubaté permite inferir que las

zonas de producción de clima frío y seco son óptimas y conductivas para el desarrollo de la enfermedad causada por *F. graminearum* y *F. subglutinans*.

- v. *F. graminearum* y *F. subglutinans* se encontraron principalmente sobre los residuos de cosecha, detritos del cultivo y en la semilla y se detectó el movimiento de inóculo de *F. graminearum* por medio del aire. El maíz variedad regional Simijaca se encontró asociado con *F. graminearum* y *F. subglutinans* en todos los estados de desarrollo del cultivo, y el aumento de la proporción de aislamientos de *F. graminearum* respecto a *F. subglutinans* en estados de desarrollo V6 a V9 coincidió con el desarrollo de síntomas visibles de la enfermedad en campo cuando la planta tenía nueve hojas verdaderas (V9).
- vi. La asociación entre *F. subglutinans* y *F. graminearum* y maíz se reflejó en la longitud de la planta y contenido de lignina en el tallo. A partir de la inoculación individual de *F. subglutinans* y *F. graminearum* se obtuvieron 90 días después de siembra, plantas de mayor longitud, pero con reducción del diámetro del tallo reducido comparadas con la inoculación conjunta de ambas especies. La fenología de plantas inoculadas con *F. subglutinans* sugieren una hoja de ventaja.
- vii. Las condiciones de paisaje de la zona de estudio hicieron que la enfermedad se presentara de manera localizada con zonas de escape en las laderas.
- viii. El impacto en el cultivo de la incidencia de la pudrición del tallo de maíz dependerá de la condición de estrés por frío y sequía, del estado de desarrollo de la planta, por lo tanto, cultivos bajo estrés en estados de desarrollo vegetativo serán más afectados que cultivos en estados de desarrollo reproductivo. Sin embargo, la presencia de la pudrición del tallo y posterior volcamiento de las plantas no implicó la contaminación del grano con micotoxinas.

- 
- ix. En condiciones de campo, la germinación fue positivamente afectada por la presencia de los residuos de cosecha, en tanto que la altura y diámetro del tallo fueron afectados de forma negativa.
  - x. El tratamiento térmico a la semilla por medio de calor húmedo a 60 °C por cinco minutos incrementó el número de mazorcas por planta (el *fitness* de la planta). Cuando estas semillas fueron sembradas en un historial de monocultivo de maíz donde se retiraron los residuos de cosecha el aumento en el rendimiento fue mayor.
  - xi. Menor incidencia de la pudrición del tallo de maíz se obtuvo en lotes con historial de rotación, intermedia cuando se retiraron los residuos de cosecha en el monocultivo de maíz y alta cuando se dejaron los residuos sobre la superficie del suelo. El manejo de residuos de cosecha del cultivo no tuvo efecto significativo sobre el porcentaje de volcamiento.
  - xii. El tratamiento térmico a la semilla a 50 °C por medio de calor seco por diez minutos siempre que se implementó con la rotación de cultivos, fue el más efectivo para reducir tanto la incidencia de la pudrición de tallo como el porcentaje de volcamiento.
  - xiii. El tratamiento químico a la semilla usado por los productores, redujo el porcentaje de germinación, el número y peso de mazorcas, el número de mazorcas por planta e incremento la incidencia de la pudrición del tallo por lo que no se considera un tratamiento adecuado para el manejo de la pudrición del tallo de maíz.
  - xiv. El análisis de la naturaleza de la asociación *Fusarium* spp. – maíz, las fuentes de inóculo y las condiciones climáticas conductivas para el desarrollo de la enfermedad son elementos fundamentales a tener en cuenta para el diseño de estrategias de manejo más asertivas de la pudrición del tallo en el valle de Ubaté y en zonas de producción de maíz de clima frío en el trópico andino.

## 5.2 Recomendaciones

- i. Adelantar estudios adicionales que evalúen el efecto del manejo del potencial de inóculo en semilla, residuos de cosecha y sistemas de siembra del cultivo sobre las pudriciones del tallo de maíz en las zonas de producción del trópico frío bajo condiciones de campo con el fin de complementar y soportar los resultados encontrados en el presente trabajo.
- ii. Registrar y documentar la frecuencia de ocurrencia e incidencia de la pudrición del tallo asociada a *Fusarium* spp. en las zonas de producción de clima frío en Colombia y otras zonas de producción del trópico andino en diferentes variedades de maíz adaptadas a estas zonas de producción.
- iii. Aunque en este estudio *F. graminearum* (FGSC) y *F. subglutinans* (FFSC) fueron las especies de *Fusarium* asociadas a la pudrición del tallo en el Valle de Ubaté es importante determinar la distribución de estas y otras especies de *Fusarium* asociadas a la pudrición del tallo en las zonas de producción de clima frío en el trópico alto andino.
- iv. Adelantar análisis filogenéticos más robustos sobre las poblaciones de *F. graminearum* encontradas en el trópico frío alto andino en Colombia que permitan determinar el (los) linaje (s) /poblaciones más predominantes en el país.
- v. Caracterizar atributos de resistencia de las variedades de maíz de clima frío a la pudrición del tallo bajo condiciones de limitada disponibilidad de agua y exposición a episodios de alta intensidad de frío. De igual forma, incluir en los programas de mejoramiento etapas de evaluación bajo estas condiciones, de forma que las mejoras por resistencia a esta afectación sean consistentes con altos rendimientos bajo condiciones de campo.

- 
- vi. Realizar estudios bajo condiciones controladas que aborden el efecto de temperaturas constantes y alternantes y la disponibilidad de agua a nivel *in vitro* e *in vivo* sobre el crecimiento y desarrollo de *Fusarium* spp. para profundizar en aspectos básicos de su biología y producción de micotoxinas.
  - vii. Evaluar tratamientos químicos y biológicos para el control de *F. graminearum* y *F. subglutinans* a nivel *in vitro* y su eficacia en semillas y plantas de maíz bajo condiciones controladas, con el fin de contar con un mayor número de herramientas de manejo con aplicación práctica para el manejo de la pudrición del tallo bajo condiciones de campo.
  - viii. Determinar el efecto de la inoculación de *Fusarium* spp. sobre el crecimiento y desarrollo de plantas de maíz en condiciones controladas y en campo, y la evaluación de los atributos de rendimiento los cuales son estudios fundamentales para determinar el beneficio de la asociación *Fusarium* spp.- maíz y orientar decisiones de manejo.
  - ix. Evaluar las respuestas de la planta de maíz a la inoculación de *F. graminearum* y *F. subglutinans* por medio de análisis del transcriptoma y proteoma con el fin de dilucidar los mecanismos de la interacción planta - microorganismo que son modulados por condiciones ambientales específicas y que promueven o limitan la relación biótrofa o hemibiótrofa que se pueda presentar entre *Fusarium* spp. y maíz.
  - x. Desarrollar modelos de predicción y de riesgo de la pudrición del tallo de maíz en las zonas de producción de clima frío en la zona alto andina, por medio de la integración de información climatológica, condiciones de paisaje, prácticas del cultivo y resistencia de las variedades de maíz adaptadas a estas zonas de producción que permitan la selección de fechas de siembra más apropiadas y la planeación de la producción a nivel regional.



## 6. Bibliografía

AGRONET, (2017). Sistema de estadísticas agropecuarias. Consultado en línea: <http://www.agronet.gov.co/estadistica/Paginas/default.aspx>: Fecha de consulta: 14 mayo de 2018.

Andrews, D.I., y Kassam, A. H. (1976). The importance of multiple cropping in increasing world food supplies. In *Multiple Cropping*, pp. 1-10. ASA Spec. Publ. 27. Madison, Wisconsin: American Society of Agronomy.

Bacon, C. W., Glenn, A. E., y Yates, I. E. (2008). *Fusarium verticillioides*: managing the endophytic association with maize for reduced fumonisins accumulation. *Toxin Reviews*, 27(3-4), 411–446. doi:10.1080/15569540802497889.

Bennett, R.S. y Colyer. P.D. (2010). Dry heat and hot water treatments for disinfecting cotton seed of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. *Plant Disease*. 94, 1469-1475. Doi: 10.1094/ PDIS-01-10-0052

Brodgers, K. D., Lipps, P. E., Paul, P. A., y Dorrance, A. E. (2007). Evaluation of *Fusarium graminearum* Associated with Corn and Soybean Seed and Seedling Disease in Ohio. *Plant Disease*, 91 (21), 1155–1160. <https://doi.org/10.1094/PDIS-91-9-1155>

Buriticá C.P. (1999). Directorio de patógenos y enfermedades de las plantas de importancia económica en Colombia. ICA -Universidad Nacional de Colombia. Medellín. Antioquía. 329 pp.

Centro Internacional de Mejoramiento del Maíz y Trigo (CIMMYT). (2004). *Maize Diseases: A Guide for Field Identification*. 4th edition. México, DF. 119 pp.

Chulze, S.N., Ramirez, M.L., Farnochi, M.C., Pascale, M., Visconti, A., y March, G., (1996). *Fusarium* and fumonisin occurrence in Argentinian corn at different ear maturity stages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44 (9), 2797–2801

Clear, R.M., S.K. Patrick, R. Wallis, y Turkington., T.K. (2002). Effect of dry heat treatment on seed-borne *Fusarium graminearum* and other cereal pathogens. *Plant Pathology*, 24, 489-498. Doi: 10.1080/07060660209507038

Cotten, T. K., y Munkvold, G. P. (2007). Survival of *Fusarium moniliforme*, *F. proliferatum*, and *F. subglutinans* in Maize Stalk Residue. *Phytopathology*, 88(6), 550–555.

<https://doi.org/10.1094/phyto.1998.88.6.550>

Coutinho, W., R. Silva, M. Vieira, C. Machado, y Machado, J. (2007). Qualidade sanitária e fisiológica de sementes de milho submetidas a termoterapia e condicionamento fisiológico. *Fitopatologia Brasileira*. 32, 458- 464. Doi: 10.1590/S0100-41582007000600002

Daniels, B. A. (1983). Elimination of *Fusarium moniliforme* from corn seed. *Plant Disease*. 67: 609-611

Dodd, J. L. (1980). The Role of Plant Stresses in Development of Corn Stalk Rots. *Plant Disease*, 64 (6), 533–537

Duncan, K. E., y Howard, R. J. (2010). Biology of maize kernel infection by *Fusarium verticillioides*. *Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI*, 23(1), 6–16. doi:10.1094/MPMI-23-1-0006

FAO, (2016). Introducción al maíz y su importancia. Consultado en línea: <http://www.fao.org/docrep/003/X7650S/x7650s02.htm>: Fecha de consulta: 14 mayo de 2018

FAO (2011). Missing food: The Case of Postharvest Grain Losses in Sub-Saharan Africa. [[http://siteresources.worldbank.org/INTARD/Resources/MissingFoods10\\_web.pdf](http://siteresources.worldbank.org/INTARD/Resources/MissingFoods10_web.pdf)]: Fecha de consulta: 14 de mayo 2018

Figueroa-Rivera, M.G., Rodríguez-Guerra, R., Guerrero-Aguilar, B.Z, González-Chavira M.M., Pons-Hernández, J.L., Jiménez-Bremont, J.F., Ramírez-Pimentel, J.G., Andrio-Enríquez, E., y Mendoza-Elos, M. (2010) Caracterización de especies de *Fusarium* asociadas a la pudrición de raíz de maíz en Guanajuato, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 28:124–134

Glenn, A., Gold, S., y Bacon, C. (2002). Fdb1 and Fdb2, *Fusarium verticillioides* loci necessary for detoxification of preformed antimicrobials from corn. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 15, 91-101

Glenn, A. E., Hinton, D. M., Yates, I. E., y Bacon, C. W. (2001). Detoxification of Corn Antimicrobial Compounds as the Basis for Isolating *Fusarium verticillioides* and Some Other *Fusarium* Species from Corn. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(7), 2973–2981. doi:10.1128/AEM.67.7.2973-2981.2001

Gómez, S., Ligarreto, G.A, Maldonado-Archila, G.Y., y M. Osorio. (2017). Enfermedades del maíz en la zona alto andina. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. 12 pp.

Hawkes, C. V, y Connor, E. W. (2017). Translating Phytobiomes from Theory to Practice : Ecological and Evolutionary Considerations. *Phytobiomes*, 1(2), 57–69. <https://doi.org/10.1094/PBIOMES-05-17-0019-RVW>

Lawrence , E., Nelson, P., y Ayers, J. (1981). Histopathology of sweet corn seed and plants infected with *Fusarium moniliforme* and *F. oxysporum*. *Phytopathology*, 71, 379-386

Leslie , J.F y Summerell, B. (2006). *The Fusarium laboratory manual*. USA: *Blackwell publishing*. Iowa, USA. 387 pp.

Ligarreto, G.A. (2017). Selección de semilla de maíz Simijaca. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. 12 pp.

Logrieco, A., Moretti, A., Altomare, C., Bottalico, A., y Torres, E.C. (1993). Occurrence and toxicity of *Fusarium subglutinans* from Peruvian maize. *Mycopathologia*. 122 (3), 183-190

Maldonado-Ramirez, S., Schmale III, D., Shields , E., y Berfstrom, G. (2005). The relative abundance of viable spores of *Gibberella zeae* in the planetary boundary layer suggest the role of long-distance transport in regional epidemics of *Fusarium* head blight. *Agricultural and Forest Meteorology*, 132(1-2), 20-27

Manzo, S. K., y Clafflin, L. E. (1984). Survival of *Fusarium moniliforme* hyphae and conidia in grain sorghum stalks. *Plant Disease*. 68:866-867

McMullen, M., Bergstrom, G., De Wolf, E., Dill-Macky, R., Hershman, D., Shaner, G., Van Sanford, D. (2012). A unified effort to fight an enemy of wheat and barley: *Fusarium* head blight. *Plant Disease*. 96 (12), 1712–1728

Munkvold, G. P., Arias, S., Taschl, I., y Gruber-Dorninger, C. (2018). Mycotoxins in Corn: Occurrence, Impacts, and Management. In *Corn* (3rd ed.). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-811971-6.00009-7>

Munkvold, G. P. (2003). Cultural and genetic approaches to managing mycotoxins in maize. *Annual Review of Phytopathology*, 41(1), 99–116. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.41.052002.095510>

Munkvold, G., Hellmich, R., y Showers, W. (1997). Reduced *Fusarium* ear rot and

symptomless infection in kernels of maize genetically engineered for European corn borer resistance. *Phytopathology*, 87, 1071-1077

Nguyen, T. T., Dehne, H., y Steiner, U. (2016). Maize leaf trichomes represent an entry point of infection for *Fusarium* species. *Fungal Biology*, 120(8), 895–903. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2016.05.014>

Nguyen, T. T. X., Dehne, H. W., y Steiner, U. (2015). Histopathological assessment of the infection of maize leaves by *Fusarium graminearum*, *F. proliferatum*, and *F. verticillioides*. *Fungal Biology*, 120(9), 1094–1104. doi:10.1016/j.funbio.2016.05.013

Nyvall, R. F., y Kommedahl, T. (1970). Saprophytism and survival of *Fusarium moniliforme* in corn stalks. *Phytopathology*, 60: 1233-1235

Office of the Gene Technology Regulator (OGRT). (2008). *The Biology of Zea mays L . ssp mays*. Australian Government. Department of health and ageing. Consultado en línea <http://www.ogtr.gov.au>: Fecha de consulta: 14 de mayo de 2018

Ooka, J., y Kommedahl, T. (1977). Wind and rain dispersal of *Fusarium moniliforme* in corn fields. *Phytopathology*, 67, 1023-1026

Plantegenest, M., Le May, C., y Fabre, F. (2007). Landscape epidemiology of Plant disease. *Journal of The Royal Society Interface*, 4(16), 963–972. doi:10.1098/rsif.2007.1114

Prussin, A. J. (2013). Monitoring and Predicting the Long Distance Transport of *Fusarium graminearum*, Causal Agent of Fusarium Head Blight in Wheat and Barley. *Virginia Polytechnic Institute and State University*, 172 pp.

Ranum, P., Peña-Rosas, J. P., y Garcia-Casal, M. N. (2014). Global maize production, utilization, and consumption. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1312, 105–112. <https://doi.org/10.1111/nyas.12396>

Reyes-Velázquez, W. P, Figueroa-Gomez, R.M., Barberis, M., Reynoso, M.M., Rojo, F.G. A., Chulze, S.F., y Torres AM. (2011) *Fusarium* species (section Liseola) occurrence and natural incidence of bauvericin, fusaproliferin and fumonisins in maize hybrids harvested in Mexico. *Mycotoxin Res.* 27:187–194

Saab, I., y Steve, B. (2006). *Diagnosing Chilling and Flooding Injury to Corn Prior to*

*Emergence. Pioneer Hi-Bred Int'l.* Retrieved from [https://www.pioneer.com/growingpoint/agronomy/library\\_corn/crop\\_injury/flooding\\_injury.jsp](https://www.pioneer.com/growingpoint/agronomy/library_corn/crop_injury/flooding_injury.jsp)

Schmale, D., Shields, E., y Bergstrom, G. (2006). Night time spore deposition of the fusarium head blight pathogen, *Gibberella zeae*, in rotational wheat fields. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 28, 100-108

Schulz, B., Remmert, A., Dammann, U., Aust, H., y Strack, D. (1999). The endophyte-host interaction: a balanced antagonism. *Mycological Research*, 103, 1275-1283

Sumner, D. R., Doupnik, B., y Boosalis, M. G. (2003). Effects of Reduced Tillage and Multiple Cropping on Plant diseases. *Annual Review of Phytopathology*, 19(1), 167–187. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.19.090181.001123>

Varón, F., y Sarria, G. (2007). Enfermedades del maíz y su manejo. In *Instituto Colombiano Agropecuario*. Palmira, Colombia. 56 pp.

Whitney, N., y Mortimore, C. (1957). Root and stalk rot of field corn in southwestern Ontario. I. Sequence of infection and incidence of the disease in relation to maturation of inbred lines. *Canadian Journal of Plant Science*, 37, 342-346

Wicklow, D. T., Roth, S., Deyrup, S. T., y Gloer, J. B. (2005). A protective endophyte of maize: *Acremonium zeae* antibiotics inhibitory to *Aspergillus flavus* and *Fusarium verticillioides*. *Mycological Research*, 109 (Pt5), 610–618. doi:10.1017/S0953756205002820

Will, A. G. K. (1968). A system of vegetable crop rotation in Uganda. *The East African Agricultural Journal*. 34:217-23

Williams, P. H. (1979). Vegetable crop protection in the Peoples Republic of China. *Annual Review of Phytopathology*, 17: 31 1-24

Windels, C., Windels, M., y Kommedahl, T. (1976). Association of *Fusarium* species with picnic beetles on corn ears. *Phytopathology*, 66, 328-331

Yates, I. E., Bacon, C. W., y Hinton, D. M. (1997). Effects of Endophytic Infection by *Fusarium moniliforme* on Corn Growth and Cellular Morphology. *Plant Disease*, 81(7), 723–728



**A. Anexo: Tiempos de desinfección de los explantes de maíz según la etapa fenológica del material vegetal. V3, V6 y V9: tres, seis y nueve hojas verdaderas, VT: espigamiento.**

| Reactivo               | Etapa fenológica |      |    |    |    |
|------------------------|------------------|------|----|----|----|
|                        | Semilla          | V3   | V6 | V9 | VT |
| Etanol 70%             | 30''             | 30'' | 1' | 1' | 1' |
| Hipoclorito 2%         | 30''             | 30'' | 1' | 1' | 2' |
| Agua destilada estéril | 2'               | 2'   | 2' | 2' | 2' |

´ Minutos

'' Segundos

## B. Anexo: Identificación molecular de aislamientos de *Fusarium* spp.



Centro Nacional de Secuenciación Genómica

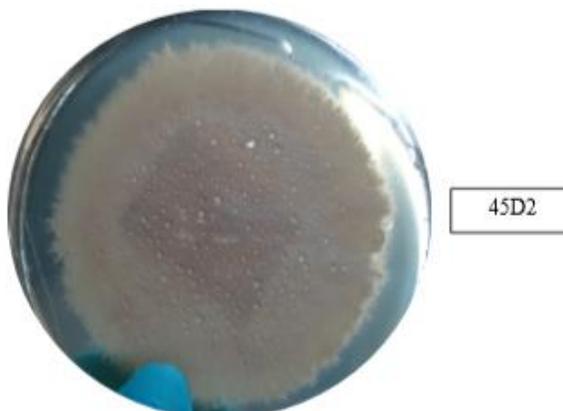
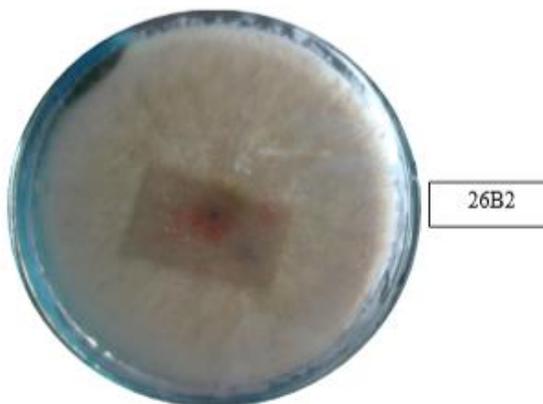
9/10/19

Informe de identificación de hongos basado en secuenciación y análisis filogenético de la región Intergénica ribosomal ITS

### MUESTRAS 26B2 Y 45D2

#### Material recibido:

El 20/08/2019, se recibieron dos cajas de petri identificadas con los códigos: 26B2 y 45D2



Edificio SIU: Carrera 53 N.º 61 - 30  
Teléfono: (574) 2196402 • Fax (574) 219 6565 • NIT: 890980040-8 • Apartado: 1226  
Web: <http://siu.udea.edu.co> • Medellín – Colombia





### Centro Nacional de Secuenciación Genómica

#### Amplificación del marcador ribosomal ITS:

Se amplificó la región intergénica ribosomal ITS mediante PCR utilizando los oligonucleótidos **ITS1**: 5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3' e **ITS4**: 5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3', los cuales amplifican un fragmento aproximado de 560 pares de bases (bp). El producto de PCR se sometió a una reacción de secuenciamiento capilar en ambas cadenas. La secuencia consensus obtenida se presenta final del informe.

#### Clasificación de los microorganismos utilizando el algoritmo CLASSIFIER con la base de datos del Ribosomal Database Project:

1. **26B2**: Fungi 1.0|Ascomycota 1.0|Sordariomycetes 1.0|Hypocreales 1.0|Nectriaceae 1.0|**Gibberella** 1.0|
2. **45D2**: Fungi 1.0|Ascomycota 1.0|Sordariomycetes 1.0|Hypocreales 1.0|Nectriaceae 1.0|**Gibberella** 1.0|

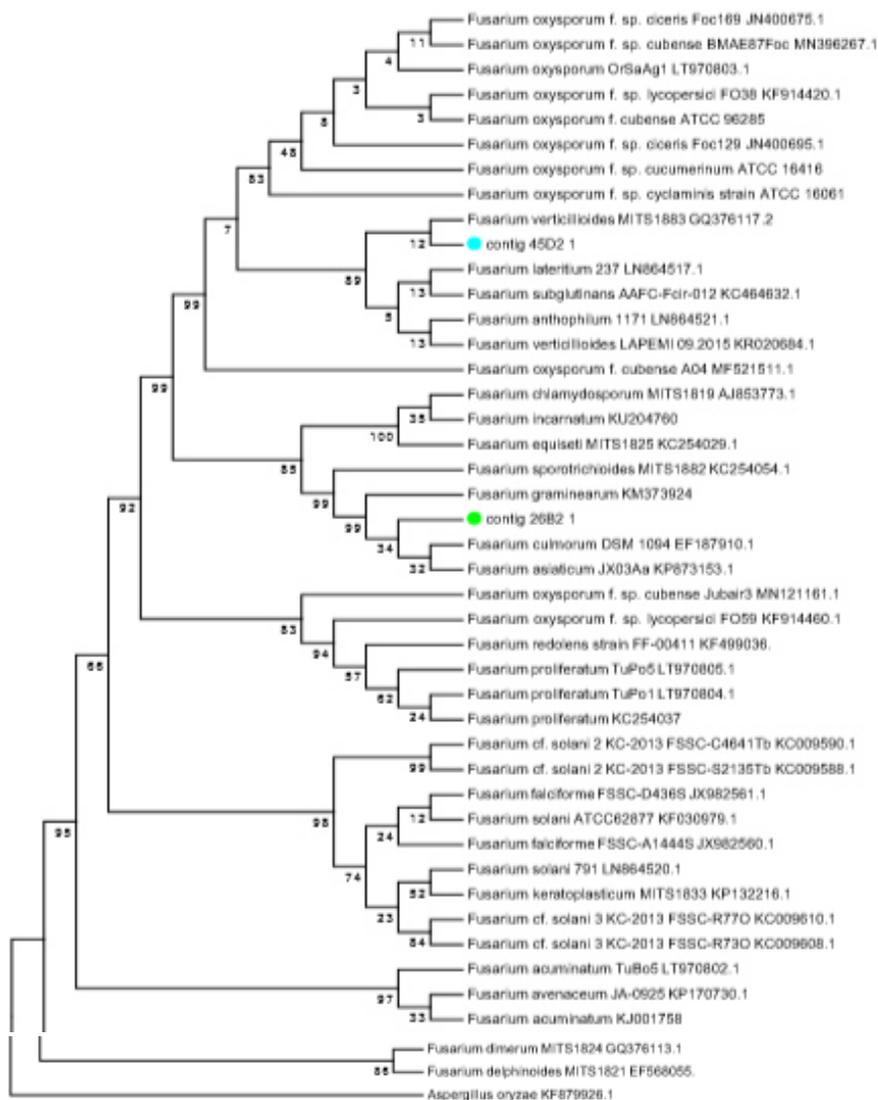
**NOTA:** La clasificación obtenida con el Ribosomal Database Project (RDP), nos indica que las cepas identificadas son del género *Gibberella sp.* Este género y *Fusarium sp.* representan generos anamorfos y por lo tanto la filogenia para la identificación precisa de las dos cepas es construida a partir de secuencias de referencia del género *Fusarium sp* (**Ver filogenia**).





## Centro Nacional de Secuenciación Genómica

### Árbol filogenético (*Neighbor-joining*) de la región intergénica ribosomal ITS de los microorganismos en estudio (26B2 y 45D2):



Edificio SIU: Carrera 53 N.º 61 - 30  
 Teléfono: (574) 2196402 • Fax (574) 219 6565 • NIT: 890980040-8 • Apartado: 1226  
 Web: <http://siu.udea.edu.co> • Medellín – Colombia





### Centro Nacional de Secuenciación Genómica

#### Resultado de la clasificación:

Microorganismos identificados en las muestras 26B2 y 45D2: *Fusarium sp.*

**NOTA:** Es importante resaltar que la región intergénica ribosomal ITS no permite hacer una asignación taxonómica precisa a categoría de especie. Si se necesita esta confirmación, se recomienda utilizar de manera complementaria al menos un gen codificante, según lo indique la literatura científica para el género respectivo.

**Identificación molecular de *Fusarium sp* hasta la categoría taxonómica especie, utilizando el marcador molecular codificante *EF1* (translation elongation factor 1) de las cepas de *Fusarium sp* 26B2 y 45D2**

#### Amplificación del marcador *ef1*:

Mediante PCR convencional, se amplificó el marcador molecular codificante *ef1* de las cepas de *Fusarium sp* 26B2 y 45D2, utilizando los oligonucleótidos EF50Fw: 5' CGACTCTGGCAAGTCGACCAC 3' y EF590R 5' CTCGGCTTGAGCTTGCAAG 3', los cuales amplifican un fragmento de aproximadamente 500 pares de bases (pb). El producto de PCR amplificado para ambas cepas, se sometió a una reacción de secuenciamiento capilar por ambas cadenas. La secuencia consensus obtenida cada una de las cepas se presenta al final del informe.

#### Análisis filogenético usando el marcador *ef1*:

Se llevó a cabo un análisis filogenético que permitiera identificar el taxón al que pertenece la secuencia de *ef1*. Se realizó la búsqueda de las secuencias homólogas de la región *ef1* en las bases de datos y se consideraron las secuencias reportadas en el artículo publicado por A. A. Stakheev1 y colaboradores en el año 2018. Para el análisis filogenético de la secuencia se usó el paquete MEGA versión 6.0. Se calculó matriz de distancias y para la construcción del árbol filogenético se utilizó el método de *Neighbor-joining* con 1000 réplicas de "bootstrap" (Figura 2).

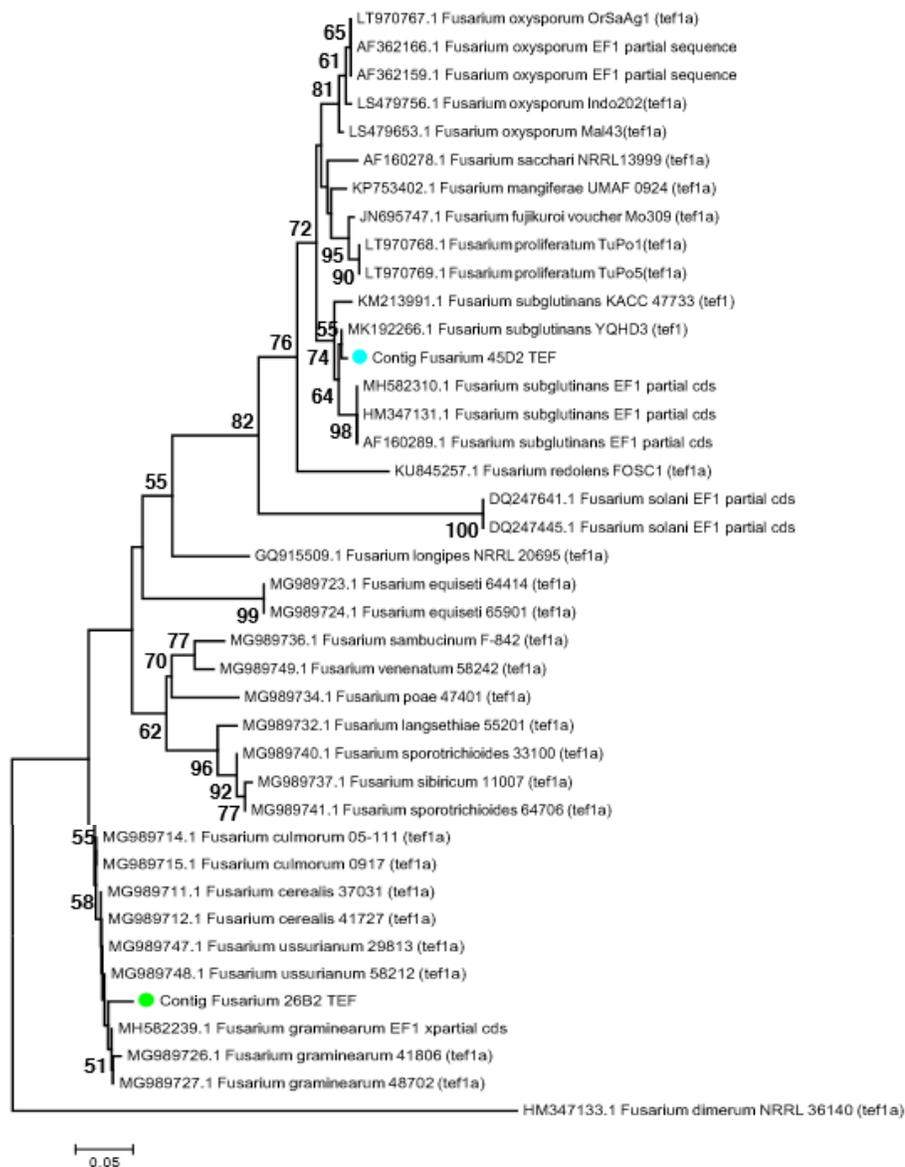


Figura 2. Árbol filogenético (*Neighbor-joining*) usando el marcador molecular codificante *ef1* de las cepas 26B2 y 45D2 de *Fusarium* sp.



### Centro Nacional de Secuenciación Genómica

#### Resultado de la clasificación hasta la categoría taxonómica especie:

- De acuerdo con la matriz de distancia calculada para el marcador *ef1* (TEF), la secuencia de la cepa 45D2 (45D2 TEF) es cercana a la secuencia de referencia de la especie *Fusarium subglutinans* (con una distancia de 0.005). Esto fue corroborado en el árbol filogenético realizado por el método de *Neighbor joining*, donde esta secuencia forma un grupo hermano con la secuencia de *Fusarium subglutinans* ("bootstrap" de 74).
- Así mismo, en el árbol filogenético, la secuencia de la cepa 26B2 (26B2 TEF) se agrupa en la clada que incluye las secuencias de las especies *Fusarium cerealis*, *Fusarium ussurianum* y *Fusarium gramineum*; siendo mas cercana a las especies *Fusarium cereales* y *Fusarium ussurianum* (con distancia de 0.019 calculada en la matriz) y mas distante a la especie *Fusarium gramineum* (distancias entre 0.024 y 0.029 calculadas en la matriz).

#### Clasificación:

- Los resultados obtenidos indican que la cepa 45D2, se puede clasificar a nivel de especie como *Fusarium subglutinans*.
- Los resultados obtenidos indican que la cepa 26B2, se puede clasificar como *Fusarium spp*, siendo las especies mas cercanas *Fusarium cerealis* y *Fusarium ussurianum*.





Centro Nacional de Secuenciación Genómica

Handwritten signature

Juan F. Alzate Restrepo MSc, Ph.D.
Director
Centro Nacional de Secuenciación Genómica- CNSG
Torre 1 Sotano 2, Sede de Investigación Universitaria-SIU
Universidad de Antioquia
Carrera 53 # 61 – 30. Medellín, Colombia
Tel: +57 4 2196665/correo: jfernando.alzate@udea.edu.co cns@udea.edu.co

Secuencias de las regiones intergénicas ribosomales ITS de los microorganismos:

>contig\_2682\_1
TTCCGAGGGGTACCTGGGAGGGAATCAATACCGATTTACAACTCCCAACCCCTGTTG
AACATACCTTAATGTCCTGGCTGGGCGGATCAGGCGGCGGCGGCGGTAAGAAAGGGACGCGCGCGC
GCAGACCTCAAACTCTCTCTTTTATGAGACTCTCTGAGATTAAGAAACAAACAAACAAACAA
AACTTTCACAAACGGAATCTCTGGGTTCTGGCACTGAGAAAGGAAAGCGAGCAAAAGGGAATA
AGTAAAGTGAATTCAGAAATCAGTGAATCACTGAAATCTTGAACGACATGGCGCGCC
CAGTATCTGGCGGCGCATGCTGTTCTGAGGCTCAATTTCAACCTCAAGCGCGACTTGGTG
TGGAGCTGGAGCGGCTGGCTGCACTCCCAAGACATTTGGGCTCAGTGGAGCTTCCAG
AGCGAGTAAATTAACACAGTTACTAGGTAAGCTGCGCGCGCGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGG
TTCTGAATGTTGACTCGGATCAGTGAAGTAAGCCGCTGAACCTTAAGCAZATC

>contig\_4502\_1
TCCGAGGATCACTACCGAGTTTCAACTCCCAACCCCTGGAAACAGCAATGTTGTTG
CTCGGCGGATCAGCGCGCTCCCGGTAAGACGGGACCGCGCGAGGAGCCCGCAAACT
CTGTTCTAGATGTAATCTCTGAGTAAACCAZAAATCAAACTTTCACAAACGGA
TCTCTGGCTGGGCACTCAAGAGACACAGCAAAATGCAATGATGTAATGAAATTCAC
GAACTTCAAGTAAACACAGGACTCTTGAAGCACTTGGCGCGCGCGGCGGCGGCGGCGGCGG
ATGCGCTGGAGGCTCATTTCAACCTCAAGCGGACTTGGGTTGGGACTCGCGGACTC
AAAAGCGTTCCCAAAATGATTTGGCGCTCACTGAGCTTCCAGAGCTAGTATGTAATA
CCCTGTTACTGTTAAGTGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGG
TGGATCAGTGAAGTAAAGCGCTGAACCTTAAGCAZATC

>Contig\_2682\_SF1\_(TF)
GAGCCCCACCCAGAAAAAATTCACCAAAAGCGCAAAAAATTTTGGACTTGGAGC
GGGTAACAGCGGCGTATTCAGCTGCTGTTGGAGGCGATTTGAATGATGTTTTGA
CGAAAGGGCGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGG
TTCCTTGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGG
CAGTCAATGGAAATTTGAATCTACCCCGGAAACAAATTAATGAGCGGTTGGATGCGAG
TGTATCGCGAGTGGCGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGG
GAGGAAAGGAAACCCCGCGGAGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGG
GGTACAGCAACACAGCAGAGGAGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGG
CGAACATCGAGGAGTTCGAGGAGGTTGGGCTCAATTTCTAGATCGCGCGCGCGCTTTTCC
GTTTGAATCATCAATGCAATGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGG
CTGAGGCGCAAAAATTTGGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGG
ACTCGG
GGTCAATCGATTAACCACTGCAATGAGGAGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGG
TCAATGCGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGG
GGTTCGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGG
AACHAGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGG
CAAGCGG
AATGCGG
CGG
TTCTTGAATTTTTTTTT

>Contig\_4502\_SF1\_(TF)
AAAAAAAATTAAGGGTAAATAATTCGACAAAATTTTGGTTCTCAAGGGGGGGGGG
GCAAGTTTCAAGTGTAGGAAATTAAGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGG
TAAGGCTTGGTGAATTTTCCCGGATGTTAGCTTTCGAGAGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGG
TCAAGTACCGGTTTGAAGGAGTCCAGCGCTTGTGATGTTATGAGATGCCCGGCGGCGGCGGCGG
GTTTGGTGGGATAGGCGGAGATGAGCTGAAGTGGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGG
CGACTGGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGG
GTTTACCGG
AGCGG
AGAGGTTAGTACTTTCCTTGGAGTGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGG
TGAAGCTTGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGG
TTGGGCGG
ACCTTTCAGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGG
CTGAGCTGGTAAAGGTTCTTCAAGTACGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGG

Edificio SIU: Carrera 53 N.º 61 - 30
Teléfono: (574) 2196402 • Fax (574) 219 6565 • NIT: 890980040-8 • Apartado: 1226
Web: http://siu.udea.edu.co • Medellín – Colombia



## C. Anexo: ANOVA frecuencias de aislamiento

### FRECUENCIA AISLAMIENTO ENTRE VARIEDADES

**ANOVA**

AUDPC

|                  | Suma de cuadrados | gl | Media cuadrática | F     | Sig. |
|------------------|-------------------|----|------------------|-------|------|
| Entre grupos     | 3526781,668       | 1  | 3526781,668      | 3,121 | ,091 |
| Dentro de grupos | 24856870,03       | 22 | 1129857,728      |       |      |
| Total            | 28383651,69       | 23 |                  |       |      |

### FRECUENCIA AISLAMIENTO ENTRE ORIGEN DE EXPLANTE

**ANOVA**

AUDPC

|                  | Suma de cuadrados | gl | Media cuadrática | F     | Sig. |
|------------------|-------------------|----|------------------|-------|------|
| Entre grupos     | 5340139,168       | 2  | 2670069,584      | 2,433 | ,112 |
| Dentro de grupos | 23043512,53       | 21 | 1097310,120      |       |      |
| Total            | 28383651,69       | 23 |                  |       |      |

## D. Anexo: ANOVA AUMGC

### ANOVA

AUDPC

|                  | Suma de cuadrados | gl | Media cuadrática | F      | Sig. |
|------------------|-------------------|----|------------------|--------|------|
| Entre grupos     | 37283,507         | 2  | 18641,753        | 40,454 | ,000 |
| Dentro de grupos | 25805,467         | 56 | 460,812          |        |      |
| Total            | 63088,974         | 58 |                  |        |      |

CLA

### ANOVA

AUDPC

|                  | Suma de cuadrados | gl | Media cuadrática | F      | Sig. |
|------------------|-------------------|----|------------------|--------|------|
| Entre grupos     | 138622,539        | 2  | 69311,270        | 33,290 | ,000 |
| Dentro de grupos | 116592,956        | 56 | 2082,017         |        |      |
| Total            | 255215,495        | 58 |                  |        |      |

PDA

### ANOVA

AUDPC

|                  | Suma de cuadrados | gl | Media cuadrática | F      | Sig. |
|------------------|-------------------|----|------------------|--------|------|
| Entre grupos     | 37586,953         | 2  | 18793,477        | 24,089 | ,000 |
| Dentro de grupos | 43688,712         | 56 | 780,156          |        |      |
| Total            | 81275,665         | 58 |                  |        |      |

SNA

### ANOVA

AUDPC

|                  | Suma de cuadrados | gl | Media cuadrática | F      | Sig. |
|------------------|-------------------|----|------------------|--------|------|
| Entre grupos     | 20905,155         | 2  | 10452,578        | 42,679 | ,000 |
| Dentro de grupos | 13715,025         | 56 | 244,911          |        |      |
| Total            | 34620,180         | 58 |                  |        |      |

AW

## E. Anexo: análisis microbiológico de lotes con historial de pudrición del tallo

|  |  |   |
|--|--|---|
| <br>UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA<br>SEDE BOGOTÁ   | <b>FORMATO DE ENTREGA DE RESULTADOS DE ANÁLISIS FITOPATOLÓGICO</b> | <br>Clínica de Plantas<br>Facultad de Agronomía<br>Universidad Nacional |
| Laboratorio de Sanidad Vegetal: Clínica de Plantas. Facultad de Ciencias Agrarias. Edificio 500. Laboratorio 321. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá. Tel: 3165000 ext. 19085 ó 19111 correo electrónico: <a href="mailto:cliplantas_fabog@unal.edu.co">cliplantas_fabog@unal.edu.co</a> . <a href="http://agronomia.unal.edu.co">http://agronomia.unal.edu.co</a> |  |   |
| N° REMISIÓN  |  | 2110  |

### IDENTIFICACIÓN DEL SOLICITANTE

|                   |                        |            |                        |
|-------------------|------------------------|------------|------------------------|
| Nombre:           | PROYECTO FRIJOL Y MAIZ | Contacto:  | Dra. Sandra Gómez Caro |
| C.C ó NIT:        |                        | Dirección: |                        |
| Teléfono y/o Fax: | 3204037910             | E-mail:    |                        |

### MUESTRA

|   |  |
|---|--|
| Identificación de la muestra:   | Remisión 2110.   |
| Cultivo y/o variedad  | Suelo  |
| Análisis solicitado:  | Determinación de unidades formadoras de colonia (ufc) de hongos y bacterias sin identificación (suelo y sustratos) |
| Fecha de elaboración del informe:   |  |
| Fecha de entrega del informe:   |  |
| <b>Descripción de la muestra:</b> Se recibieron como muestra 4 bolsas que contienen suelo. Se solicita realizar determinación de unidades formadoras de colonia (ufc) de hongos y bacterias sin identificación (suelo y sustratos).<br>Las bolsas vienen identificadas como:<br>MUESTRA 1. CON RESIDUOS SIMIJACA ANTONIO FORERO<br>MUESTRA 2. SIN RESIDUOS SIMIJACA- ANTONIO FORERO<br>MUESTRA 3. CON RESIDUOS SIMIJACA- ANTONIO FORERO<br>MUESTRA 4. SIN RESIDUOS SIMIJACA- ANTONIO FORERO |  |

### PROCEDIMIENTOS REALIZADOS

|   |
|---|
| <b>Identificación</b>   |
| 1. Homogenización de cada una de las muestras de suelo.   |
| 2. Método de dilución estándar base 10 a partir de 100 gramos de sustrato en 900 ml de agua destilada.  |
| 3. Diluciones seriadas y siembra de superficie de las diluciones $10^{-4}$ , $10^{-5}$ y $10^{-6}$ en medio de cultivo de uso general para hongos Papa -dextrosa- Agar (PDA), 5 repeticiones por factor de dilución |
| 4. Diluciones seriadas y siembra de superficie de las diluciones $10^{-4}$ , $10^{-5}$ y $10^{-6}$ en medio de cultivo de uso general para bacterias Agar Nutritivo (AN), 5 repeticiones por factor de dilución     |
| 5. Incubación a 25 °C.  |
| 6. Pruebas bioquímicas para identificación de géneros comunes de bacterias  |

### RESULTADOS

|  |
|--|
| A continuación se presentan el resultado obtenido del análisis de :<br><br><p style="text-align: center;"><b>MUESTRA IDENTIFICADA COMO M1:</b></p> Mediante el uso de método de dilución estándar base 10 partiendo de 100 gramos de suelo en 900 ml de agua destilada se estableció:<br><br>la población total de hongos en el sustrato de siembra M1 es de: $1.80 \times 10^7$ ufc/g. sustrato.<br><br>Dentro de los géneros de hongos identificados se encontraron: |
|--|

|  |  |  |
|--|--|--|
|  <b>UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA</b><br>SEDE BOGOTÁ   | <b>FORMATO DE ENTREGA DE RESULTADOS DE ANÁLISIS FITOPATOLÓGICO</b> |  <b>Clínica de Plantas</b><br>Facultad de Agronomía<br>Universidad Nacional |
| Laboratorio de Sanidad Vegetal: Clínica de Plantas. Facultad de Ciencias Agrarias. Edificio 500. Laboratorio 321. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá. Tel: 3165000 ext. 19085 ó 19111 correo electrónico: <a href="mailto:cliplantas_fabog@unal.edu.co">cliplantas_fabog@unal.edu.co</a> <a href="http://agronomia.unal.edu.co">http://agronomia.unal.edu.co</a> |  |  |
| N° REMISIÓN  |  | 2110   |

| Géneros identificados | ufc/g. sustrato                           |
|-----------------------|---|
| <i>Cladosporium</i>   | 2.0 x10 <sup>6</sup> ufc/g. sustrato      |
| <i>Beauveria</i>      | 4.0 x10 <sup>6</sup> ufc/g. sustrato      |
| <i>Penicillium</i>    | 6.0 x10 <sup>6</sup> ufc/g. sustrato      |
| Levaduras             | 6.0 x10 <sup>6</sup> ufc/g. sustrato      |
| <b>TOTAL:</b>         | <b>1.8 X10<sup>7</sup> ufc/g sustrato</b> |

Utilizando el método de las diluciones seriadas no se observaron crecimiento de colonias de *Fusarium*. Se identificaron **actinomicetes** en una concentración de: 1.0 x10<sup>7</sup> ufc/g. sustrato

Población de bacterias: población total: 4.6 x10<sup>7</sup> ufc/g. sustrato

| Forma celular |  | Tinción de Gram |                                      | Géneros identificados |                                      |
|---------------|--|-----------------|--------------------------------------|-----------------------|--------------------------------------|
| Cocos         | 1.0 x10 <sup>7</sup> ufc/g. sustrato       |                 |                                      |                       |                                      |
| Bacilos       | 3.0 x10 <sup>7</sup> ufc/g. sustrato       | Gram +          | 2.0 x10 <sup>6</sup> ufc/g. sustrato | <i>Bacillus</i>       |                                      |
|               |  | Gram -          | 3.4 x10 <sup>7</sup> ufc/g. sustrato | <i>Erwinia</i>        | 2.4 x10 <sup>7</sup> ufc/g. sustrato |
|               |  |                 | 1.0 x10 <sup>7</sup> ufc/g. sustrato | NO IDENTIFICADOS      | Posible <i>Azotobacter</i>           |
| <b>TOTAL</b>  | <b>4.6 X10<sup>7</sup> ufc/g. sustrato</b> |                 |                                      |                       |                                      |

#### MUESTRA IDENTIFICADA COMO M2:

Mediante el uso de método de dilución estándar base 10 partiendo de 100 gramos de suelo en 900 ml de agua destilada se estableció:

La población total de hongos en el sustrato identificado como M2 es de: 6.0 x10<sup>6</sup> ufc/g. sustrato. Dentro de los géneros de hongos identificados se encontraron:

| Géneros identificados |  |
|-----------------------|--|
| <i>Aspergillus</i>    | 2.0 x10 <sup>6</sup> ufc/g. sustrato       |
| <i>Cladosporium</i>   | 2.0 x10 <sup>6</sup> ufc/g. sustrato       |
| <i>Penicillium</i>    | 2.0 x10 <sup>6</sup> ufc/g. sustrato       |
| <b>TOTAL</b>          | <b>6.0 X10<sup>6</sup> ufc/g. sustrato</b> |

Utilizando el método de las diluciones seriadas no se observaron crecimiento de colonias de *Fusarium*.

Población de bacterias: población total 6.0 X10<sup>7</sup> ufc/g. sustrato, identificando:

Laboratorio de Sanidad Vegetal: Clínica de Plantas. Facultad de Ciencias Agrarias. Edificio 500. Laboratorio 321.  
Universidad Nacional de Colombia. Bogotá. Tel: 3165000 ext. 19085 ó 19111 correo electrónico:

[cliplantas\\_fabog@unal.edu.co](mailto:cliplantas_fabog@unal.edu.co) <http://agronomia.unal.edu.co>

N° REMISIÓN

2110

| Forma celular |                                      |        |                                      | Género(s) identificado |                                       |
|---------------|--------------------------------------|--------|--------------------------------------|------------------------|---------------------------------------|
| cocos         | 2.8 x10 <sup>7</sup> ufc/g. sustrato |        |                                      |                        |                                       |
| Bacilos       | 3.2 x10 <sup>7</sup> ufc/g. sustrato | Gram + | 2.0 x10 <sup>6</sup> ufc/g. sustrato | <i>Bacillus</i>        |                                       |
|               |                                      | Gram - | 3.0 x10 <sup>7</sup> ufc/g. sustrato | <i>Erwinia</i>         | 2.40 X10 <sup>7</sup> ufc/g. sustrato |
|               |                                      |        |                                      | <i>Pantoea</i>         | 6.0 x10 <sup>6</sup> ufc/g. sustrato  |
| TOTAL         | 6.0 X10 <sup>7</sup> ufc/g. sustrato |        |                                      |                        |                                       |

#### MUESTRA IDENTIFICADA COMO M3:

Mediante el uso de método de dilución estándar base 10 partiendo de 100 gramos de suelo en 900 ml de agua destilada se estableció:

la población total de hongos en el sustrato de siembra identificado como M3 es de: 6.8 X10<sup>5</sup> ufc/g. sustrato. Dentro de los géneros de hongos identificados se encontraron:

| Género identificado |                                       |
|---------------------|---------------------------------------|
| <i>Aspergillus</i>  | 2.0 x10 <sup>6</sup> ufc/g. sustrato  |
| <i>Beauveria</i>    | 6.0 x10 <sup>6</sup> ufc/g. sustrato  |
| <i>Cladosporium</i> | 2.0 x10 <sup>6</sup> ufc/g. sustrato  |
| <i>Penicillium</i>  | 8.0 x10 <sup>6</sup> ufc/g. sustrato  |
| Levaduras           | 5.0 x10 <sup>7</sup> ufc/g. sustrato  |
| Total               | 6.8 x 10 <sup>7</sup> ufc/g. sustrato |

Se identificaron **actinomycetes** en una concentración de: 2.0 x10<sup>6</sup> ufc/g. sustrato.

La población total de bacterias es de: 7.0 x10<sup>7</sup> ufc/g. sustrato .

| Forma celular |  |        |                 |                                      |
|---------------|--|--------|-----------------|--------------------------------------|
| cocos         | 4.60 x 10 <sup>7</sup> ufc/g. sustrato |        |                 |                                      |
| Bacilos       | 2.4 x10 <sup>7</sup> ufc/g. sustrato   | Gram + | <i>Bacillus</i> | 8.0 x10 <sup>6</sup> ufc/g. sustrato |
|               |  | Gram - | <i>Erwinia</i>  | 1.6 x10 <sup>7</sup> ufc/g. sustrato |
| Total         | 7.0 x10 <sup>7</sup> ufc/g. sustrato   |        |                 |                                      |

|   |  |   |
|---|--|---|
|  <p>UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA<br/>SEDE BOGOTÁ</p>   | <p>FORMATO DE ENTREGA DE RESULTADOS DE ANALISIS FITOPATOLOGICO</p> |  <p>Clínica de Plantas<br/>Facultad de Agronomía<br/>Universidad Nacional</p> |
| <p>Laboratorio de Sanidad Vegetal: Clínica de Plantas. Facultad de Ciencias Agrarias. Edificio 500. Laboratorio 321. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá. Tel: 3165000 ext. 19085 ó 19111 correo electrónico: <a href="mailto:cliplantas_fabog@unal.edu.co">cliplantas_fabog@unal.edu.co</a> <a href="http://agronomia.unal.edu.co">http://agronomia.unal.edu.co</a></p> |  |   |
| <p>N° REMISION</p>  |  | <p>2110</p>   |

**MUESTRA IDENTIFICADA COMO M4:**

Mediante el uso de método de dilución estándar base 10 partiendo de 100 gramos de suelo en 900 ml de agua destilada se estableció:

La población total de hongos en el sustrato de siembra identificado como M4 es de:  $1.4 \times 10^7$  ufc/g. sustrato. Dentro de los géneros de hongos identificados se encontraron:

| Generos identificados |                                   |
|-----------------------|-----------------------------------|
| <i>Aspergillus</i>    | $2.0 \times 10^6$ ufc/g. sustrato |
| <i>Penicillium</i>    | $6.0 \times 10^6$ ufc/g. sustrato |
| Levaduras             | $6.0 \times 10^6$ ufc/g. sustrato |
| Total                 | $1.4 \times 10^7$ ufc/g. sustrato |

La población total de bacterias en el sustrato es de:  $7.20 \times 10^7$  ufc/g. sustrato.

| Forma celular |                                    |        |                                    | Género identificado |                                   |
|---------------|------------------------------------|--------|------------------------------------|---------------------|-----------------------------------|
| Cocos         | $4.60 \times 10^7$ ufc/g. sustrato |        |                                    |                     |                                   |
| Bacilos       | $2.6 \times 10^7$ ufc/g. sustrato  | Gram + | $4.0 \times 10^6$ ufc/g. sustrato  | <i>Bacillus</i>     |                                   |
|               |                                    | Gram - | $2.20 \times 10^7$ ufc/g. sustrato | <i>Erwinia</i>      | $1.0 \times 10^7$ ufc/g. sustrato |
|               |                                    |        |                                    | <i>Pantoea</i>      | $6.0 \times 10^6$ ufc/g. sustrato |
|               |                                    |        |                                    | NO IDENTIFICADAS    | $6.0 \times 10^6$ ufc/g. sustrato |
| Total         | $7.20 \times 10^7$ ufc/g. sustrato |        |                                    |                     |                                   |

RESULTADOS VALIDOS SOLO PARA LA MUESTRA ANALIZADA.

**COMENTARIOS**

Esta información debe servir como base para que un Ingeniero Agrónomo establezca las medidas de manejo del problema.

SANDRA GOMEZ CARO I.A. Ph. D.  
Coordinadora Clínica de plantas

# F. Anexo: AOAC 995.15 High Performance Liquid Chromatography (HPLC) a espectrofluorometria.

49.5.01

## AOAC Official Method 995.15 Fumonisin B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, and B<sub>3</sub> in Corn Liquid Chromatographic Method

First Action 1995  
Final Action 1999

### AOAC-IUPAC Method

(Applicable for determination of fumonisins in corn at  $\geq 1 \mu\text{g/g}$ .)

**Caution:** Fumonisin is hepatotoxic and carcinogenic to rats; effects on humans are not fully known. Wear protective gloves to avoid skin contact with corn extracts. Any laboratory spillages should be washed with a 5% aqueous solution of commercial sodium hypochlorite followed by H<sub>2</sub>O.

See Table 995.15 for results of the interlaboratory study supporting acceptance of the method.

#### A. Principle

Fumonisin is extracted from corn with methanol-H<sub>2</sub>O solution. Filtered extract is purified on strong anion exchange solid-phase extraction cartridge and fumonisins are eluted with acetic acid-methanol solution. Residue is dissolved in methanol and *o*-phthalaldehyde (OPA)/2-mercaptoethanol is added to form flu-

orescent fumonisin derivatives, determined by reversed-phase liquid chromatography with fluorescence detection.

#### B. Apparatus

(a) *Liquid chromatograph (LC)*.—LC pump delivering 1 mL/min constant flow rate, with injection system calibrated to deliver 10  $\mu\text{L}$ .

(b) *LC column*.—(1) 150  $\times$  4.6 mm id, C<sub>18</sub> reversed-phase, stainless steel, packed with 5  $\mu\text{m}$  octadecyl silica (ODS) material, and (2) suitable corresponding reversed-phase guard column containing similar packing material. Maintain LC column oven at ambient temperature (ca 23°C).

(c) *Fluorescence detector*.—Variable wavelength; set at 335 nm (excitation) and 440 nm (emission).

(d) *Tissue homogenizer*.

(e) *Solid-phase extraction (SPE) cartridges*.—10 mL capacity; containing 500 mg silica-based strong anion exchange (SAX) sorbent (Varian Bond Elut<sup>®</sup> cartridge is suitable). Evaluate performance of individual batches of sorbent using certified or in-house reference materials.

(f) *SPE manifold*.

(g) *Solvent evaporator*.—To hold 4 mL capacity glass vials; operating at 60°C.

(h) *Membrane filter*.—Porosity 0.45  $\mu\text{m}$ .

#### C. Reagents

(All reagents must be analytical grade, unless otherwise noted.)

Table 995.15 Interlaboratory study results for determination of fumonisins in corn by liquid chromatographic method

| Fumonisin analogue | Amount added, ng/g           | Mean, ng/g | Recovery, % | $s_r$ | $s_R$  | RSD <sub>r</sub> , % | RSD <sub>R</sub> , % | $r^a$  | $R^b$  |
|--------------------|------------------------------|------------|-------------|-------|--------|----------------------|----------------------|--------|--------|
| B <sub>1</sub>     | 500                          | 405        | 81.1        | 28.8  | 56.2   | 7.1                  | 13.9                 | 80.6   | 157.4  |
|                    | 1000                         | 813        | 81.3        | 47.4  | 127.4  | 5.8                  | 15.7                 | 132.7  | 356.7  |
|                    | 2000                         | 1621       | 81.1        | 124.7 | 261.1  | 7.7                  | 16.1                 | 349.2  | 731.1  |
|                    | 4000                         | 3245       | 81.1        | 199.7 | 494.1  | 6.2                  | 15.2                 | 559.2  | 1383.5 |
|                    | 8000                         | 6732       | 84.2        | 736.6 | 1099.7 | 10.9                 | 16.3                 | 2062.5 | 3079.2 |
|                    | NB <sub>1</sub> <sup>c</sup> | 4246       | —           | 561.7 | 944.1  | 13.2                 | 22.2                 | 1572.8 | 2643.5 |
| B <sub>2</sub>     | 200                          | 152        | 75.9        | 12.7  | 24.7   | 8.4                  | 16.3                 | 35.6   | 69.2   |
|                    | 400                          | 313        | 78.3        | 26.6  | 49.4   | 8.5                  | 15.8                 | 74.5   | 138.3  |
|                    | 800                          | 618        | 77.3        | 73.4  | 119.7  | 11.9                 | 19.3                 | 205.5  | 335.2  |
|                    | 1600                         | 1294       | 80.9        | 93.1  | 222.3  | 7.2                  | 17.2                 | 260.7  | 622.4  |
|                    | 3200                         | 2619       | 81.9        | 318.4 | 467.7  | 12.2                 | 17.9                 | 891.5  | 1309.6 |
|                    | NB <sub>2</sub> <sup>d</sup> | 1234       | —           | 215.4 | 329.4  | 17.5                 | 26.7                 | 603.1  | 922.3  |
| B <sub>3</sub>     | 100                          | 76         | 75.8        | 7.7   | 14.9   | 10.1                 | 19.6                 | 21.6   | 41.7   |
|                    | 200                          | 161        | 80.7        | 27.7  | 35.3   | 17.2                 | 21.9                 | 77.6   | 98.8   |
|                    | 400                          | 319        | 79.7        | 48.9  | 71.4   | 15.4                 | 22.4                 | 136.9  | 199.9  |
|                    | 800                          | 656        | 82.0        | 52.7  | 138.8  | 8.0                  | 21.2                 | 147.6  | 388.6  |
|                    | 1600                         | 1389       | 86.8        | 198.3 | 270.9  | 14.3                 | 19.5                 | 554.4  | 758.5  |
|                    | NB <sub>3</sub> <sup>e</sup> | 373        | —           | 63.2  | 92.7   | 16.9                 | 24.9                 | 177.0  | 259.6  |

<sup>a</sup>  $r = 2.8 \times s_r$ .

<sup>b</sup>  $R = 2.8 \times s_R$ .

<sup>c</sup> NB<sub>1</sub> = Corn naturally contaminated with fumonisin B<sub>1</sub> at a mean concentration of 4246 ng/g.

<sup>d</sup> NB<sub>2</sub> = Corn naturally contaminated with fumonisin B<sub>2</sub> at a mean concentration of 1234 ng/g.

<sup>e</sup> NB<sub>3</sub> = Corn naturally contaminated with fumonisin B<sub>3</sub> at a mean concentration of 373 ng/g.

- (a) *Methanol*.  
 (b) *Phosphoric acid*.—Concentration >85%.  
 (c) *2-Mercaptoethanol*.  
 (d) *Acetonitrile-H<sub>2</sub>O solution*.—1+1 (v/v).  
 (e) *Acetic acid-methanol solution (1 + 99)*.—Use glacial acetic acid when preparing solution.  
 (f) *Sodium dihydrogen phosphate solution*.—0.1M. Dissolve 15.6 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O in 1 L H<sub>2</sub>O.  
 (g) *Methanol-H<sub>2</sub>O solution*.—3 + 1 (v/v).  
 (h) *Sodium hydroxide*.—1M. Dissolve 40.0 g NaOH in 1 L H<sub>2</sub>O.  
 (i) *Disodium tetraborate solution*.—0.1M. Dissolve 3.8 g Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>·10H<sub>2</sub>O in 100 mL H<sub>2</sub>O.  
 (j) *LC mobile phase*.—Methanol-0.1M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (77 + 23; v/v), adjusted to apparent pH 3.3 with H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, (b) Filter mobile phase through membrane filter and pump at 1 mL/min flow rate. LC mobile phase composition may have to be adjusted to conform with individual LC column characteristics.  
 (k) *o-Phthalaldehyde (OPA) reagent*.—Dissolve 40 mg OPA in 1 mL methanol, (a), and dilute with 5 mL 0.1M Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>, (i), add 50 µL 2-mercaptoethanol, (c), and mix. Store OPA reagent at room temperature in capped amber or aluminum foil-covered vial up to 1 week.  
 (l) *Fumonisin standards*.—Available from PROMEC, Medical Research Council, PO Box 19070, Tygerberg 7505, South Africa.  
 (m) *Fumonisin standard solutions*.—Prepare stock solution of individual fumonisin B1, fumonisin B2, and fumonisin B3 at concentrations of 250 µg/mL in acetonitrile-H<sub>2</sub>O solution, (d). Transfer 100 µL aliquots of each stock solution to clean glass vial and add 200 µL acetonitrile-H<sub>2</sub>O solution, (d), to yield standard working solution containing the 3 fumonisin analogues at individual concentrations of 50 µg/mL. Fumonisin stock and working standard solutions are stable up to 6 months at 4°C.

#### D. Extraction and Cleanup

Grind corn laboratory sample to yield material of such size that ca 90% is retained between 500–250 µm mesh screens. Weigh 50 g test portion into 250 mL plastic centrifuge bottle. Add 100 mL methanol-H<sub>2</sub>O solution, C(g), and homogenize 3 min at 60% full speed setting. Alternatively, blender may also be used at the same speed settings, but period of 5 min should be allowed for complete extraction.

Centrifuge mixture 10 min at 500 ×g and filter supernate through fluted filter paper. Filtrate should have apparent pH ca 5.8. If necessary, adjust pH to 5.8–6.5 with 1M NaOH (only 2–3 drops should be required).

Fit SPE cartridge to SPE manifold. Condition cartridge by washing successively with 5 mL methanol, C(a), followed by 5 mL methanol-H<sub>2</sub>O solution, C(g). Apply 10 mL filtered extract to cartridge, while maintaining flow rate ≤2 mL/min. Wash cartridge with 5 mL methanol-H<sub>2</sub>O solution followed by 3 mL methanol. Do not let cartridge dry. Elute fumonisins with 10 mL acetic acid-methanol solution, C(e), at flow rate ≤1 mL/min. (Note: It is critical that flow rate does not exceed 1 mL/min.) Collect eluate in 20 mL glass collection vial.

Sequentially transfer aliquot of eluate to 4 mL glass vial, while evaporating solvent to dryness under stream of N at ca 60°C. Rinse collection vial with 1 mL methanol and add rinsing solvent to 4 mL vial, washing sides of vial to concentrate residue at its base. Evaporate additional methanol to dryness to ensure that all acetic acid has evaporated. Dried residues may be retained up to 1 week at 4°C prior to LC analysis.

#### E. Derivatization and LC Analysis

(a) *Preparation of standard derivative*.—Transfer 25 µL fumonisin standard working solution, C(m), to base of small test tube. Add 225 µL OPA reagent, C(k), mix, and inject 10 µL into LC system within 1 min after addition of OPA reagent.

(Note: It is critical to adhere to reproducible times between addition of OPA reagent and injection into LC system. Fluorescence of OPA-fumonisin begins to decrease after 2 min.)

(b) *Detector and recorder response*.—Adjust sensitivity settings of fluorescence detector so fumonisin B<sub>1</sub> standard-OPA derivative yields at least 80% recorder response.

(c) *Corn extracts*.—Redissolve residue from D in 200 µL methanol. Transfer 25 µL solution to base of small test tube and add 225 µL OPA reagent. Mix and inject 10 µL solution into LC system within 1 min of adding OPA reagent. All fumonisin peaks should be on scale. Peak identity should be confirmed by comparison of retention times in extracts with those observed for individual fumonisin standard.

If fumonisin chromatographic peaks exceed those of fumonisin standard solution, make additional dilutions of extracts with methanol and repeat derivatization with OPA reagent.

#### F. Calculations

Calculate fumonisin present in aliquot injected (*F*; ng) into LC system using peak areas for each fumonisin analogue, as follows:

$$F \text{ (ng)} = \frac{P_t}{P_f} \times S$$

where  $P_t$  = individual fumonisin peak area of test solution;  $P_f$  = individual fumonisin peak area of standard solution;  $S$  = amount of individual fumonisin standard injected into LC system (50 ng/fumonisin analogue) [based on concentration in fumonisin standard working solution, C(m)].

Calculate concentration of fumonisin present in corn  $C$  (ng/g), as follows:

$$C \text{ (ng/g)} = \frac{F \times V_i \times D}{V_t \times W}$$

where  $V_t$  = total volume of derivatized solution, 250 µL;  $D$  = any dilution factor which may have been used;  $V_i$  = injection volume, 10 µL;  $W$  = test portion equivalent weight, 0.625 g.

References: *J. AOAC Int.* **79**, 688(1996).  
 CAS-116355-83-0 (Fumonisin B<sub>1</sub>)  
 CAS-116355-84-1 (Fumonisin B<sub>2</sub>)  
 CAS-136379-59-4 (Fumonisin B<sub>3</sub>)

Revised: June 2000

# G. Anexo: NTC 59.61 *High Performance Liquid Chromatography (HPLC) acoplada a UV*

**NORMA TÉCNICA  
COLOMBIANA**

**NTC  
5961**

2012-12-12

**DETERMINACIÓN DE DEOXINIVALENOL (DON)  
EN HARINA DE TRIGO BLANCA, HARINA DE  
TRIGO INTEGRAL Y SALVADO DE TRIGO  
MEDIANTE CROMATOGRFÍA LÍQUIDA DE ALTA  
EFICIENCIA /EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA**



E: DETERMINATION OF DEOXYNIVALENOL IN WHITE FLOUR, WHOLE WHEAT FLOUR, AND BRAN BY SOLID-PHASE EXTRACTION/LIQUID CHROMATOGRAPHY

CORRESPONDENCIA: esta es una versión idéntica por traducción (IDT) a su documento de referencia la AOAC PVM 2:1997.

DESCRIPTORES: determinación de deoxinivalenol; determinación de DON; harina de trigo blanca; harina de trigo integral, salvado de trigo.

I.C.S.: 65.120

Editada por el Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación (ICONTEC)  
Apartado 14237 Bogotá, D.C. - Tel. (571) 6078888 - Fax (571) 2221435

Prohibida su reproducción

Editada 2012-12-21

## H. Anexo: ANOVA longitud de la planta

### Procedimiento GLM

Variable dependiente: longitud planta

| Fuente          | DF  | Suma de cuadrados | Cuadrado de la media | F-Valor | Pr > F |
|-----------------|-----|-------------------|----------------------|---------|--------|
| Modelo          | 4   | 3520.13000        | 880.03250            | 7.06    | <.0001 |
| Error           | 195 | 24291.02500       | 124.56936            |         |        |
| Total corregido | 199 | 27811.15500       |                      |         |        |

| R-cuadrado | Coef Var | Raiz MSE | altura Media |
|------------|----------|----------|--------------|
| 0.126573   | 11.94527 | 11.16106 | 93.43500     |

| Fuente       | DF | Tipo I SS   | Cuadrado de la media | F-Valor | Pr > F |
|--------------|----|-------------|----------------------|---------|--------|
| tratamientos | 4  | 3520.130000 | 880.032500           | 7.06    | <.0001 |

| Fuente       | DF | Tipo III SS | Cuadrado de la media | F-Valor | Pr > F |
|--------------|----|-------------|----------------------|---------|--------|
| tratamientos | 4  | 3520.130000 | 880.032500           | 7.06    | <.0001 |

# I. Anexo: Análisis de fumonisinas y deoxinivalenol en semilla de maíz variedad Simijaca



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA  
SEDE BOGOTÁ  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y DE ZOOTECNIA  
LABORATORIO DE TOXICOLOGÍA  
**INFORME DE RESULTADOS DE ANÁLISIS**

|                                 |                                   |                  |                          |
|---------------------------------|-----------------------------------|------------------|--------------------------|
| Remitente:                      | Universidad Nacional de Colombia. | Resultado:       | 198/2017                 |
| Persona de contacto:            | German Maldonado                  | Fecha reporte:   | 2017-12-13               |
| Dirección:                      | No suministrada                   | Tipo de Informe: | Final                    |
| Teléfono:                       | No suministrada                   | e-mail:          | gymaldonadoa@unal.edu.co |
| Fecha de recepción de muestras: | 2017-12-01                        |                  | Página 1 de 1            |

#### ANÁLISIS DE FUMONISINAS

Técnica : AOAC 995.15 HPLC-espectrofluorometría Límite de cuantificación : 50 µg/kg  
Fecha de análisis: 2017-12-12

| No.  | MUESTRA       | PESO (g) | FB1 (µg/kg) | FB2 (µg/kg) | FB3 (µg/kg) | F total (µg/kg) |
|------|---------------|----------|-------------|-------------|-------------|-----------------|
| 198A | MAIZ UNAL     | 1000     | 70          | N.D.        | Trazas <LOQ | 70              |
| 198B | MAIZ SIMIJACA | 1000     | N.D.        | N.D.        | N.D.        | ---             |

#### ANÁLISIS DE DEOXINIVALENOL

Técnica : NTC 5961 HPLC-UV Límite de cuantificación: 100 µg/kg  
Fecha de análisis: 2017-12-05

| No.  | MUESTRA       | PESO (g) | DEOXINIVALENOL (µg/kg) |
|------|---------------|----------|------------------------|
| 198A | MAIZ UNAL     | 1000     | N.D.                   |
| 198B | MAIZ SIMIJACA | 1000     | N.D.                   |

#### OBSERVACIONES

**N.D.:** No Detectable.

**LOD:** Límite de detección

**LOQ:** Límite de cuantificación

**<LOQ:** La concentración encontrada es detectable pero es menor al límite de cuantificación.

Los resultados son válidos únicamente para la muestra analizada.

Las muestras recibidas se conservarán durante un período máximo de 30 días.

Los resultados están expresados en (partes por billón µg/kg).

Este resultado no es válido sin el sello seco del laboratorio de Toxicología.

Elaborado por:  
Edwin Reyes  
Analista

Revisado por:  
Milena Cepeda  
Analista

Aprobado por:  
Prof. Gonzalo J. Díaz, MV, MSc, PhD  
Director

## J. Anexo: ANOVA de variables capítulo III

### Incidencia de la pudrición del tallo

Procedimiento GLM  
Tests de hipótesis para el análisis del modelo mixto de la varianza

Variable dependiente: logincidencia

| Fuente  | DF     | Tipo III SS | Cuadrado de la media | F-Valor | Pr > F |
|---|--------|-------------|----------------------|---------|--------|
| tiempo  | 3      | 46.739053   | 15.579684            | 4.61    | 0.0533 |
| Error   | 6.0001 | 20.298640   | 3.383061             |         |        |
| Error: 0.9999*MS(tiempo*parcelaprinci) + 0.0001*MS(Error) |        |             |                      |         |        |

| Fuente   | DF     | Tipo III SS | Cuadrado de la media | F-Valor | Pr > F |
|--|--------|-------------|----------------------|---------|--------|
| * parcelaprincipal   | 2      | 40.192428   | 20.096214            | 5.96    | 0.0376 |
| Error  | 6.0023 | 20.250237   | 3.373731             |         |        |
| Error: 0.9969*MS(tiempo*parcelaprinci) + 0.0031*MS(Error)          |        |             |                      |         |        |
| * Este test supone que uno o más efectos fijados son igual a cero. |        |             |                      |         |        |

| Fuente   | DF  | Tipo III SS | Cuadrado de la media | F-Valor | Pr > F |
|--|-----|-------------|----------------------|---------|--------|
| * tiempo*parcelaprinci   | 6   | 20.300391   | 3.383399             | 15.78   | <.0001 |
| subparcela   | 7   | 4.929480    | 0.704211             | 3.28    | 0.0022 |
| parcelapr*subparcela   | 14  | 5.912676    | 0.422334             | 1.97    | 0.0193 |
| Error: MS(Error)   | 346 | 74.192959   | 0.214431             |         |        |
| * Este test supone que uno o más efectos fijados son igual a cero. |     |             |                      |         |        |

### Porcentaje de volcamiento

Procedimiento GLM  
Tests de hipótesis para el análisis del modelo mixto de la varianza

Variable dependiente: raíz volcamiento

| Fuente   | DF | Tipo III SS | Cuadrado de la media | F-Valor | Pr > F |
|--|----|-------------|----------------------|---------|--------|
| * parcelaprincipal   | 2  | 40.350979   | 20.175489            | 1.62    | 0.2741 |
| tiempo   | 3  | 832.298554  | 277.432851           | 22.25   | 0.0012 |
| Error  | 6  | 74.805593   | 12.467599            |         |        |
| Error: MS(tiempo*parcelaprinci)                                    |    |             |                      |         |        |
| * Este test supone que uno o más efectos fijados son igual a cero. |    |             |                      |         |        |

| Fuente   | DF  | Tipo III SS | Cuadrado de la media | F-Valor | Pr > F |
|--|-----|-------------|----------------------|---------|--------|
| * subparcela   | 7   | 12.616592   | 1.802370             | 1.60    | 0.1343 |
| parcelapr*subparcela   | 14  | 32.889256   | 2.349233             | 2.08    | 0.0122 |
| tiempo*parcelaprinci   | 6   | 74.805593   | 12.467599            | 11.07   | <.0001 |
| Error: MS(Error)   | 351 | 395.486625  | 1.126743             |         |        |
| * Este test supone que uno o más efectos fijados son igual a cero. |     |             |                      |         |        |

## Germinación

Procedimiento GLM  
 Tests de hipótesis para el análisis del modelo mixto de la varianza  
 Variable dependiente: germinacion

| Fuente   | DF     | Tipo III SS | Cuadrado de la media | F-Valor | Pr > F |
|--|--------|-------------|----------------------|---------|--------|
| repetición   | 3      | 148.978503  | 49.659501            | 1.47    | 0.3128 |
| Error  | 6.0136 | 202.476678  | 33.669662            |         |        |
| Error: 0.9993*MS(repeticio*parcelapri) + 0.0007*MS(Error)          |        |             |                      |         |        |
| Fuente   | DF     | Tipo III SS | Cuadrado de la media | F-Valor | Pr > F |
| * parcelaprincipal   | 2      | 381.894375  | 190.947188           | 5.67    | 0.0413 |
| Error  | 6.0185 | 202.672613  | 33.675206            |         |        |
| Error: 0.9991*MS(repeticio*parcelapri) + 0.0009*MS(Error)          |        |             |                      |         |        |
| * Este test supone que uno o más efectos fijados son igual a cero. |        |             |                      |         |        |
| Fuente   | DF     | Tipo III SS | Cuadrado de la media | F-Valor | Pr > F |
| repeticio*parcelapri   | 6      | 201.923972  | 33.653995            | 0.59    | 0.7374 |
| * subparcela   | 7      | 5772.823357 | 824.689051           | 14.45   | <.0001 |
| parcelapr*subparcela   | 14     | 2015.075639 | 143.933974           | 2.52    | 0.0065 |
| Error: MS(Error)   | 62     | 3539.661548 | 57.091315            |         |        |
| * Este test supone que uno o más efectos fijados son igual a cero. |        |             |                      |         |        |

## Diámetro del tallo

Procedimiento GLM  
 Tests de hipótesis para el análisis del modelo mixto de la varianza  
 Variable dependiente: raiz diámetro tallo

| Fuente   | DF     | Tipo III SS | Cuadrado de la media | F-Valor | Pr > F |
|--|--------|-------------|----------------------|---------|--------|
| repeticion   | 3      | 1.609026    | 0.536342             | 1.05    | 0.4382 |
| Error  | 6.0027 | 3.080452    | 0.513178             |         |        |
| Error: 0.9993*MS(repeticio*parcelapri) + 0.0007*MS(Error)          |        |             |                      |         |        |
| Fuente   | DF     | Tipo III SS | Cuadrado de la media | F-Valor | Pr > F |
| * parcelaprincipal   | 2      | 142.256636  | 71.128318            | 138.64  | <.0001 |
| Error  | 6.0043 | 3.080376    | 0.513031             |         |        |
| Error: 0.9989*MS(repeticio*parcelapri) + 0.0011*MS(Error)          |        |             |                      |         |        |
| * Este test supone que uno o más efectos fijados son igual a cero. |        |             |                      |         |        |
| Fuente   | DF     | Tipo III SS | Cuadrado de la media | F-Valor | Pr > F |
| repeticio*parcelapri   | 6      | 3.080583    | 0.513431             | 3.19    | 0.0042 |
| subparcela   | 7      | 1.128083    | 0.161155             | 1.00    | 0.4286 |
| parcelapr*subparcela   | 14     | 2.282797    | 0.163057             | 1.01    | 0.4372 |
| Error: MS(Error)   | 909    | 146.274109  | 0.160918             |         |        |
| * Este test supone que uno o más efectos fijados son igual a cero. |        |             |                      |         |        |

## Altura de la planta

Procedimiento GLM  
Tests de hipótesis para el análisis del modelo mixto de la varianza

Variable dependiente: potencia 0,07 altura planta

| Fuente  | DF     | Tipo III SS | Cuadrado de la media | F-Valor | Pr > F |
|---|--------|-------------|----------------------|---------|--------|
| repeticion  | 3      | 0.002949    | 0.000983             | 0.92    | 0.4846 |
| Error   | 6.0019 | 0.006390    | 0.001065             |         |        |
| Error: 0.9993*MS(repeticio*parcelapri) + 0.0007*MS(Error) |        |             |                      |         |        |

| Fuente   | DF     | Tipo III SS | Cuadrado de la media | F-Valor | Pr > F |
|--|--------|-------------|----------------------|---------|--------|
| * parcelaprincipal   | 2      | 0.132830    | 0.066415             | 62.39   | <.0001 |
| Error  | 6.0026 | 0.006390    | 0.001064             |         |        |
| Error: 0.9991*MS(repeticio*parcelapri) + 0.0009*MS(Error)          |        |             |                      |         |        |
| * Este test supone que uno o más efectos fijados son igual a cero. |        |             |                      |         |        |

| Fuente   | DF  | Tipo III SS | Cuadrado de la media | F-Valor | Pr > F |
|--|-----|-------------|----------------------|---------|--------|
| repeticio*parcelapri   | 6   | 0.006391    | 0.001065             | 4.25    | 0.0003 |
| subparcela   | 7   | 0.008751    | 0.001250             | 4.99    | <.0001 |
| parcelapr*subparcela   | 14  | 0.004144    | 0.000296             | 1.18    | 0.2839 |
| Error: MS(Error)   | 917 | 0.229755    | 0.000251             |         |        |
| * Este test supone que uno o más efectos fijados son igual a cero. |     |             |                      |         |        |

## Número total de mazorcas

Procedimiento GLM  
Tests de hipótesis para el análisis del modelo mixto de la varianza

Variable dependiente: ntotalmazorcas

| Fuente   | DF | Tipo III SS | Cuadrado de la media | F-Valor | Pr > F |
|--|----|-------------|----------------------|---------|--------|
| repeticion   | 3  | 108.471146  | 36.157049            | 0.20    | 0.8922 |
| * parcelaprincipal   | 2  | 6040.993958 | 3020.496979          | 16.77   | 0.0035 |
| Error  | 6  | 1080.573542 | 180.095590           |         |        |
| Error: MS(repeticio*parcelapri)                                    |    |             |                      |         |        |
| * Este test supone que uno o más efectos fijados son igual a cero. |    |             |                      |         |        |

| Fuente   | DF | Tipo III SS | Cuadrado de la media | F-Valor | Pr > F |
|--|----|-------------|----------------------|---------|--------|
| repeticio*parcelapri   | 6  | 1080.573542 | 180.095590           | 4.61    | 0.0006 |
| * subparcela   | 7  | 2897.521563 | 413.931652           | 10.61   | <.0001 |
| parcelapr*subparcela   | 14 | 555.474375  | 39.676741            | 1.02    | 0.4489 |
| Error: MS(Error)   | 63 | 2458.562812 | 39.024807            |         |        |
| * Este test supone que uno o más efectos fijados son igual a cero. |    |             |                      |         |        |

## Peso total de mazorcas

Procedimiento GLM  
Tests de hipótesis para el análisis del modelo mixto de la varianza

Variable dependiente: pesototalmazorcas

| Fuente   | DF | Tipo III SS | Cuadrado de la media | F-Valor | Pr > F |
|--|----|-------------|----------------------|---------|--------|
| repeticion   | 3  | 16.976545   | 5.658848             | 0.24    | 0.8639 |
| * parcelaprincipal   | 2  | 599.310190  | 299.655095           | 12.83   | 0.0068 |
| Error  | 6  | 140.089277  | 23.348213            |         |        |
| Error: MS(repeticio*parcelapri)                                    |    |             |                      |         |        |
| * Este test supone que uno o más efectos fijados son igual a cero. |    |             |                      |         |        |

| Fuente   | DF | Tipo III SS | Cuadrado de la media | F-Valor | Pr > F |
|--|----|-------------|----------------------|---------|--------|
| repeticio*parcelapri   | 6  | 140.089277  | 23.348213            | 5.11    | 0.0002 |
| * subparcela   | 7  | 333.538382  | 47.648340            | 10.42   | <.0001 |
| parcelapr*subparcela   | 14 | 91.114327   | 6.508166             | 1.42    | 0.1688 |
| Error: MS(Error)   | 63 | 287.958003  | 4.570762             |         |        |
| * Este test supone que uno o más efectos fijados son igual a cero. |    |             |                      |         |        |

## Número de mazorcas por planta

Procedimiento GLM  
Tests de hipótesis para el análisis del modelo mixto de la varianza

Variable dependiente: nmazorcasplanta

| Fuente   | DF | Tipo III SS | Cuadrado de la media | F-Valor | Pr > F |
|--|----|-------------|----------------------|---------|--------|
| repeticion   | 3  | 0.140495    | 0.046832             | 0.75    | 0.5624 |
| * parcelaprincipal   | 2  | 14.737362   | 7.368681             | 117.53  | <.0001 |
| Error  | 6  | 0.376177    | 0.062696             |         |        |
| Error: MS(repeticio*parcelapri)                                    |    |             |                      |         |        |
| * Este test supone que uno o más efectos fijados son igual a cero. |    |             |                      |         |        |

| Fuente   | DF | Tipo III SS | Cuadrado de la media | F-Valor | Pr > F |
|--|----|-------------|----------------------|---------|--------|
| repeticio*parcelapri   | 6  | 0.376177    | 0.062696             | 1.66    | 0.1446 |
| * subparcela   | 7  | 0.557513    | 0.079645             | 2.11    | 0.0547 |
| parcelapr*subparcela   | 14 | 1.445682    | 0.103263             | 2.74    | 0.0032 |
| Error: MS(Error)   | 63 | 2.373091    | 0.037668             |         |        |
| * Este test supone que uno o más efectos fijados son igual a cero. |    |             |                      |         |        |

**Diámetro de la mazorca**

Procedimiento GLM  
Tests de hipótesis para el análisis del modelo mixto de la varianza

Variable dependiente: raiz diámetro mazorca

| Fuente  | DF     | Tipo III SS | Cuadrado de la media | F-Valor | Pr > F |
|---|--------|-------------|----------------------|---------|--------|
| repeticion  | 3      | 5.386092    | 1.795364             | 5.37    | 0.0390 |
| Error   | 6.0005 | 2.006705    | 0.334423             |         |        |
| Error: 0.9994*MS(repeticio*parcelapri) + 0.0006*MS(Error) |        |             |                      |         |        |

| Fuente   | DF     | Tipo III SS | Cuadrado de la media | F-Valor | Pr > F |
|--|--------|-------------|----------------------|---------|--------|
| * parcelaprincipal   | 2      | 20.228027   | 10.114013            | 30.32   | 0.0007 |
| Error  | 6.0029 | 2.002586    | 0.333601             |         |        |
| Error: 0.9968*MS(repeticio*parcelapri) + 0.0032*MS(Error)          |        |             |                      |         |        |
| * Este test supone que uno o más efectos fijados son igual a cero. |        |             |                      |         |        |

| Fuente   | DF  | Tipo III SS | Cuadrado de la media | F-Valor | Pr > F |
|--|-----|-------------|----------------------|---------|--------|
| * Repeticio*parcelapri   | 6   | 2.007558    | 0.334593             | 13.14   | <.0001 |
| subparcela   | 7   | 0.195671    | 0.027953             | 1.10    | 0.3624 |
| parcelapr*subparcela   | 14  | 0.801740    | 0.057267             | 2.25    | 0.0053 |
| Error: MS(Error)   | 900 | 22.919725   | 0.025466             |         |        |
| * Este test supone que uno o más efectos fijados son igual a cero. |     |             |                      |         |        |

**Longitud de la mazorca**

Procedimiento GLM  
Tests de hipótesis para el análisis del modelo mixto de la varianza

Variable dependiente: longitudmazorca

| Fuente  | DF     | Tipo III SS | Cuadrado de la media | F-Valor | Pr > F |
|---|--------|-------------|----------------------|---------|--------|
| repeticion  | 3      | 321.354012  | 107.118004           | 1.05    | 0.4369 |
| Error   | 6.0006 | 612.789527  | 102.122175           |         |        |
| Error: 0.9995*MS(repeticio*parcelapri) + 0.0005*MS(Error) |        |             |                      |         |        |

| Fuente   | DF     | Tipo III SS | Cuadrado de la media | F-Valor | Pr > F |
|--|--------|-------------|----------------------|---------|--------|
| * parcelaprincipal   | 2      | 1.278589    | 0.639295             | 0.01    | 0.9938 |
| Error  | 6.0033 | 611.544798  | 101.867963           |         |        |
| Error: 0.9967*MS(repeticio*parcelapri) + 0.0033*MS (Error)         |        |             |                      |         |        |
| * Este test supone que uno o más efectos fijados son igual a cero. |        |             |                      |         |        |

| Fuente   | DF  | Tipo III SS | Cuadrado de la media | F-Valor | Pr > F |
|--|-----|-------------|----------------------|---------|--------|
| * repeticio*parcelapri   | 6   | 613.040221  | 102.173370           | 11.88   | <.0001 |
| subparcela   | 7   | 136.435576  | 19.490797            | 2.27    | 0.0273 |
| parcelapr*subparcela   | 14  | 290.518271  | 20.751305            | 2.41    | 0.0025 |
| Error: MS(Error)   | 903 | 7766.898401 | 8.601216             |         |        |
| * Este test supone que uno o más efectos fijados son igual a cero. |     |             |                      |         |        |

## Peso de 10 mazorcas

Procedimiento GLM  
 Tests de hipótesis para el análisis del modelo mixto de la varianza

Variable dependiente: peso10m

| Fuente             | DF | Tipo III SS | Cuadrado de la media | F-Valor | Pr > F |
|--------------------|----|-------------|----------------------|---------|--------|
| repeticion         | 3  | 1.378411    | 0.459470             | 1.54    | 0.2986 |
| * parcelaprincipal | 2  | 1.819740    | 0.909870             | 3.05    | 0.1222 |
| Error              | 6  | 1.792135    | 0.298689             |         |        |

Error: MS(repeticio\*parcelapri)  
 \* Este test supone que uno o más efectos fijados son igual a cero.

| Fuente               | DF | Tipo III SS | Cuadrado de la media | F-Valor | Pr > F |
|----------------------|----|-------------|----------------------|---------|--------|
| repeticio*parcelapri | 6  | 1.792135    | 0.298689             | 2.31    | 0.0447 |
| * subparcela         | 7  | 1.271432    | 0.181633             | 1.40    | 0.2200 |
| parcelapr*subparcela | 14 | 2.635677    | 0.188263             | 1.45    | 0.1556 |
| Error: MS(Error)     | 63 | 8.156328    | 0.129466             |         |        |

\* Este test supone que uno o más efectos fijados son igual a cero.

## K. Anexo: Análisis químico y textural de lotes bajo esquema de rotación de cultivos y monocultivo maíz- maíz

### REPORTE DE ANÁLISIS DE SUELO No. 1124-2017

Página 1 de 1



LABORATORIO DE SUELOS FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

FCA-L-FT-10.002.007

**Remitente:** Germán Maldonado      **Finca:** Aurora      **Lote:** 1  
**E-mail:** gymaldonado@unal.edu.co      **Propietario:** Francisco Cristancho      **Recibido:** 2017-10-03  
**Dirección:** No reporta      **Municipio:** Simijaca      **Reportado:** 2017-10-23  
**Teléfono:** 3143448901      **Dpto:** Cundinamarca      **Recibo No.:** Oficio Prof. Martha  
**Ciudad:** Bogotá      **Cultivo:** Maíz

### RESULTADOS

| pH  | CE<br>dS/m | CO   | N    | Ca         | K    | Mg   | Na   | AI   | CICE | CIC |
|-----|------------|------|------|------------|------|------|------|------|------|-----|
|     |            | %    |      | meq / 100g |      |      |      |      |      |     |
| 4,8 | ns         | 1,39 | 0,12 | 21,3       | 1,12 | 2,67 | 0,25 | 1,11 | 26,4 | ns  |

ns: no solicitado

| P       | S   | Cu   | Fe  | Mn   | Zn   | B    | Ar | L  | A  | Textura |
|---------|-----|------|-----|------|------|------|----|----|----|---------|
| mg / kg |     |      |     |      |      |      | %  |    |    |         |
| 2,51    | 162 | 0,06 | 382 | 2,65 | 0,27 | 0,58 | 14 | 16 | 70 | FA      |

Los resultados corresponden únicamente a las muestras suministradas por el usuario y analizadas en el laboratorio

| PARÁMETRO  |
|--|
| <b>pH</b>  |
| <b>CE:</b> Conductividad eléctrica                           |
| <b>CO:</b> Carbono orgánico oxidable                         |
| <b>N:</b> Nitrógeno total                                    |
| <b>Ca, K, Mg, Na:</b> Bases intercambiables                  |
| <b>CIC:</b> Capacidad de intercambio catiónico               |
| <b>CICE:</b> CIC Efectiva                                    |
| <b>AI:</b> Acidez intercambiable                             |
| <b>P:</b> Fósforo disponible                                 |
| <b>S:</b> Azufre disponible                                  |
| <b>Cu, Fe, Mn, Zn:</b> Microelementos                        |
| <b>B:</b> Boro   |
| Arcilla ( <b>Ar</b> ), limo ( <b>L</b> ), arena ( <b>A</b> ) |
| <b>Textura</b>   |

| MÉTODOS DE ANÁLISIS                                       |
|---|
| Suspensión suelo:agua (relación peso:volúmen 1:1)         |
| Extracto de la pasta de saturación                        |
| Análisis elemental  |
| Estimado a partir del CO (factor empleado 0,0862)         |
| Extracción con NH <sub>4</sub> -Acetato 1M pH 7           |
| Desplazamiento del NH <sub>4</sub> intercambiado con NaCl |
| Estimado por suma de bases y acidez intercambiables       |
| Extracción con KCl 1M                                     |
| Bray II   |
| Extracción con fosfato monocálcico                        |
| Extracción con DTPA                                       |
| Extracción con fosfato monocálcico                        |
| Bouyoucos, dispersión con Na-Hexametafosfato              |
| Triángulo de clasificación textural USDA                  |

| VALORACIÓN        |
|-------------------|
| Potenciométrica   |
| Conductimétrica   |
| Absorción Atómica |
| Volumétrica       |
| Volumétrica       |
| Colorimétrica     |
| Turbidimétrica    |
| Absorción Atómica |
| Colorimétrica     |
| Densimétrica      |

### NIVELES GENERALES DE REFERENCIA

| Elemento | Clima  | Alto  | Medio     | Bajo  |
|----------|--------|-------|-----------|-------|
| N        | Frío   | >0.50 | 0.25-0.50 | <0.25 |
|          | Medio  | >0.25 | 0.15-0.25 | <0.15 |
|          | Cálido | >0.20 | 0.10-0.20 | <0.10 |

| Elemento | Alto  | Medio     | Bajo  |
|----------|-------|-----------|-------|
| P        | >40   | 20-40     | <20   |
| K        | >0.35 | 0.15-0.35 | <0.15 |
| Ca       | >6    | 3,0-6,0   | <3    |
| Mg       | >2.5  | 1.5-2.5   | <1.5  |

Coordinadora: *Martha Cecilia*

RECUERDE: El plan de fertilización es más eficiente si Ud consulta con el profesional de Asistencia Técnica de su localidad

Laboratorio de Aguas y Suelos. Facultad de Agronomía. Edificio 500 Cuarto Piso  
 Conmutador 316 5000 Extensiones 19088 ó 19049; Telefax 316 5498  
 Correo electrónico: [labsuelo\\_faqbog@unal.edu.co](mailto:labsuelo_faqbog@unal.edu.co)  
 Bogotá, Colombia

**REPORTE DE ANÁLISIS DE SUELO No. 1125-2017**

Página 1 de 1



LABORATORIO DE SUELOS FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

FCA-L-FT-10.002.007

|  |                                 |  |
|--|---------------------------------|--|
| <b>Remitente:</b> Germán Maldonado     | <b>Finca:</b> El Retén          | <b>Lote:</b> 2                         |
| <b>E-mail:</b> gymaldonada@unal.edu.co | <b>Propietario:</b> Oscar Reina | <b>Recibido:</b> 2017-10-03            |
| <b>Dirección:</b> No reporta           | <b>Municipio:</b> Simijaca      | <b>Reportado:</b> 2017-10-23           |
| <b>Teléfono:</b> 3143448901            | <b>Dpto:</b> Cundinamarca       | <b>Recibo No.:</b> Oficio Prof. Martha |
| <b>Ciudad:</b> Bogotá                  | <b>Cultivo:</b> Calabacín       |  |

**RESULTADOS**

| pH  | CE   | CO   | N     | Ca         | K    | Mg   | Na   | AI   | CICE | CIC |
|-----|------|------|-------|------------|------|------|------|------|------|-----|
|     | dS/m | %    |       | meq / 100g |      |      |      |      |      |     |
| 4,3 | ns   | 0,65 | <0,08 | 16,4       | 4,04 | 1,57 | 0,35 | 2,33 | 24,7 | ns  |

ns: no solicitado

| P       | S   | Cu   | Fe  | Mn   | Zn   | B    | Ar | L  | A  | Textura |
|---------|-----|------|-----|------|------|------|----|----|----|---------|
| mg / kg |     |      |     |      |      |      | %  |    |    |         |
| 10,7    | 102 | 0,07 | 288 | 3,84 | 1,06 | 0,36 | 30 | 36 | 34 | FAr     |

Los resultados corresponden únicamente a las muestras suministradas por el usuario y analizadas en el laboratorio

| PARÁMETRO                                      | MÉTODOS DE ANÁLISIS                                       | VALORACIÓN        |
|--|---|-------------------|
| <b>pH</b>                                      | Suspensión suelo:agua (relación peso:volúmen 1:1)         | Potenciométrica   |
| <b>CE:</b> Conductividad eléctrica             | Extracto de la pasta de saturación                        | Conductimétrica   |
| <b>CO:</b> Carbono orgánico oxidable           | Análisis elemental  |                   |
| <b>N:</b> Nitrógeno total                      | Estimado a partir del CO (factor empleado 0,0862)         |                   |
| <b>Ca, K, Mg, Na:</b> Bases intercambiables    | Extracción con NH <sub>4</sub> -Acetato 1M pH 7           | Absorción Atómica |
| <b>CIC:</b> Capacidad de intercambio catiónico | Desplazamiento del NH <sub>4</sub> intercambiado con NaCl | Volumétrica       |
| <b>CICE:</b> CIC Efectiva                      | Estimado por suma de bases y acidez intercambiables       |                   |
| <b>AI:</b> Acidez intercambiable               | Extracción con KCl 1M                                     | Volumétrica       |
| <b>P:</b> Fósforo disponible                   | Bray II   | Colorimétrica     |
| <b>S:</b> Azufre disponible                    | Extracción con fosfato monocalcico                        | Turbidimétrica    |
| <b>Cu, Fe, Mn, Zn:</b> Microelementos          | Extracción con DTPA                                       | Absorción Atómica |
| <b>B:</b> Boro                                 | Extracción con fosfato monocalcico                        | Colorimétrica     |
| <b>Arilla (Ar), limo (L), arena (A)</b>        | Bouyoucos, dispersión con Na-Hexametafosfato              | Densimétrica      |
| <b>Textura</b>                                 | Triángulo de clasificación textural USDA                  |                   |

**NIVELES GENERALES DE REFERENCIA**

| Elemento | Clima  | Alto  | Medio     | Bajo  | Elemento | Alto  | Medio     | Bajo  |
|----------|--------|-------|-----------|-------|----------|-------|-----------|-------|
|          | Frío   | >0.50 | 0.25-0.50 | <0.25 | P        | >40   | 20-40     | <20   |
| N        | Medio  | >0.25 | 0.15-0.25 | <0.15 | K        | >0.35 | 0.15-0.35 | <0.15 |
|          | Cálido | >0.20 | 0.10-0.20 | <0.10 | Ca       | >6    | 3,0-6,0   | <3    |
|          |        |       |           |       | Mg       | >2.5  | 1.5-2.5   | <1.5  |

Coordinadora: *Martha Cecilia*

RECUERDE: El plan de fertilización es más eficiente si Ud consulta con el profesional de Asistencia Técnica de su localidad

Laboratorio de Aguas y Suelos. Facultad de Agronomía. Edificio 500 Cuarto Piso  
 Conmutador 316 5000 Extensiones 19088 ó 19049; Telefax 316 5498  
 Correo electrónico: [labsuelo\\_faqqboq@unal.edu.co](mailto:labsuelo_faqqboq@unal.edu.co)  
 Bogotá, Colombia