

# Efecto de productos biorracionales en la incidencia de hongos y concentración de aflatoxinas en maíz blanco cultivado en Sinaloa, México

Effect of biorrational products on the incidence of fungus and aflatoxins concentration in white corn grown in Sinaloa, Mexico

Cipriano GARCÍA GUTIÉRREZ<sup>1</sup>✉, Glenda Judith LIZÁRRAGA SÁNCHEZ<sup>2</sup>, Adolfo Dagoberto ARMENTA BOJÓRQUEZ<sup>1</sup> y Miguel Ángel APODACA SÁNCHEZ<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Instituto Politécnico Nacional (IPN), Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional (CIIDIR) Unidad Sinaloa. Comisión de Operación y Fomento de Actividades Académicas (COFAA).

Bulevar Juan de Dios Bátiz Paredes No 250, Colonia San Joachin. C. P. 81000. Guasave, Sinaloa, México y

<sup>2</sup>Escuela Superior de Agricultura del Valle del Fuerte (ESAVF), Universidad Autónoma de Sinaloa (UAS). Calle 16 Avenida Japaraqui S/N C.P. 81110. Juan José Ríos, Ahome, Sinaloa, México.

E-mails: garciaciprian@hotmail.com y cgarciag@ipn.mx. ✉ Autor para correspondencia

Recibido: 28/05/2012

Fin de arbitraje: 23/07/2012

Revisión recibida: 09/09/2012

Aceptado: 11/12/2012

## RESUMEN

En Sinaloa México la pudrición de la mazorca del maíz es una enfermedad que causa pérdidas mayores al 30%. Recientemente se ha asociado el ataque de insectos plaga como gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda* (J.E Smith), con la posterior invasión de hongos que en su conjunto causan la enfermedad. Por esta razón, se evaluó en campo el efecto de cinco fungicidas biorracionales; *Bacillus subtilis* (Cohn), *Trichoderma harzianum* (Rifai), *Beauveria bassiana* (Balsamo), *Glomus fasciculatum* (Thaxter), sales de potasio de formononetina y ácido salicílico, sobre la incidencia y severidad de la enfermedad, utilizando un diseño de bloques completamente al azar. Se identificó a las especies involucradas en la enfermedad y se determinó la concentración de aflatoxinas [B1 y G1] de los granos cosechados en cada tratamiento. Los tratamientos con menor porcentaje de incidencia y severidad fueron los hongos *B. bassiana* (4,7 y 3,6%, respectivamente) y *G. fasciculatum* (6,0 y 3,8%, respectivamente), ambos presentaron diferencia significativa respecto a los demás tratamientos incluyendo el testigo. Se identificó a *Fusarium verticillioides* (Sacc), *Aspergillus* sp. y *Penicillium pinophilum* (Hedgcock) como los principales agentes asociados a la enfermedad, con mayor predominio de *F. verticillioides* sobre *Aspergillus* sp., y *P. pinophilum*. No hubo diferencia significativa en la concentración de aflatoxinas ( $\alpha = 0,05$ ), así mismo los hongos no sobrepasaron los niveles de tolerancia (20  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) de la Norma Oficial Mexicana. Este conocimiento permitirá implementar el uso de los productos biorracionales *G. fasciculatum* y *B. bassiana* para el control de la enfermedad en Guasave Sinaloa, México.

**Palabras clave:** Biorracionales, aflatoxinas, *Fusarium*, maíz

## ABSTRACT

In Sinaloa Mexico cob rot of maize is a disease that causes major losses to 30%. Recently it has been associated with the onset of insect pests as armyworm *Spodoptera frugiperda* (J.E Smith), with the subsequent invasion of fungi which together cause the disease. For this reason, we evaluated in field the effect of five biorrational fungicides, *Bacillus subtilis* (Cohn), *Trichoderma harzianum* (Rifai), *Beauveria bassiana* (Balsamo), *Glomus fasciculatum* (Thaxter), potassium formononetin and salicylic acid on the incidence and severity of the disease, using a block design completely randomized. Were identified the species involved in the disease and the concentration of aflatoxin [B1 and G1] of grain harvested in each treatment. Treatments with lower percentage of incidence and severity were the fungi *B. bassiana* (4.7 and 3.6%, respectively) and *G. fasciculatum* (6.0 and 3.8%, respectively), both showed significant difference compared to the other treatments including the control. *Fusarium verticillioides* were identified (Sacc), *Aspergillus* sp. and *Penicillium pinophilum* (Hedgcock) as major agents associated with the disease, with higher prevalence of *F. verticillioides* on *Aspergillus* sp., and *P. pinophilum*. There was no significant difference in aflatoxin concentration ( $\alpha = 0.05$ ), likewise fungi did not exceed the tolerance levels (20 mg / kg) of the Official Mexican Standard. This knowledge will implement the use of biorrational *G. fasciculatum* and *B. bassiana* for control of this disease in Guasave Sinaloa, México.

**Key words:** Biorrationals, aflatoxins, *Fusarium*, corn

## INTRODUCCIÓN

El maíz (*Zea mays* L.) es uno de los alimentos más importantes en México, y en 2006 la producción fue de 21,3 millones de t (SIAP/SAGARPA, 2009). En la región maicera del norte del Estado de Sinaloa se cultivan 200.000 ha de maíz blanco en los ciclos de primavera-verano y otoño-invierno, donde se observa una alta incidencia de pudrición de la mazorca, causada por hongos de los géneros *Fusarium* y *Penicillium*, en Sinaloa el género *Giberella* produce el tizón en plántulas y la pudrición del tallo del maíz afectando también a los granos pequeños, mientras que el hongo *Fusarium verticillioides* (Sacc.) causa un moho blanco-rosado en la mazorca (INIFAP-CEVAF, 2003).

Por otro lado, se ha observado que la pudrición de mazorcas o fusariosis está asociada al ataque del gusano cogollero *Spodoptera frugiperda* (J.E Smith), gusano elotero *Heliothis zea* (Boddie) y *Euxesta stigmatias* (Loew), esto debido a sus hábitos de penetrar la mazorca y los tallos, contribuyendo a la dispersión del hongo (Paliwal *et al.*, 2001).

Gallardo Reyes *et al.*, (2006) realizaron un estudio en el estado de Sonora para identificar a los hongos asociados a granos de maíz de maíz, a partir de 76 muestras de maíz, los géneros encontrados fueron: Siete especies de *Fusarium*, predominando *F. verticillioides*, así como *Aspergillus*, *Penicillium* y *Alternaria*.

Quintero Benítez y Apodaca Sánchez (2008) señalan que en la región Norte de Sinaloa la pudrición de la mazorca del maíz no rebasa el 10% de incidencia y que los daños al cultivo están asociados al ataque de insectos, con la posterior invasión de *Fusarium* y levaduras. La presencia de estos y otros microorganismos en el grano limitan su comercialización, ya que el nivel tolerable de contaminación es de 5% de daño permisible, constituyendo también un problema de salud pública por la presencia de micotoxinas que producen los hongos cuando su incidencia es alta.

Palmgren y Hayes (1987) mencionan que en el maíz las aflatoxinas son sintetizadas principalmente por *Aspergillus flavus* (Alexopoulos) y *Aspergillus parasiticus* (Speare). Se conocen 20 aflatoxinas diferentes, pero solo las aflatoxinas B1, B2, G1 y G2 provienen de sustratos contaminados por *Aspergillus* spp. Las aflatoxinas tipo B se caracterizan por la

fusión de un anillo ciclo pentanona a uno de lactona de la estructura cumarina, la aflatoxina B1 es la más frecuente y tóxica. Las aflatoxinas tipo B presentan fluorescencia azul y las de tipo G lo hacen de color verde, cuando se les observa con luz ultravioleta a 365 nm (IARC, 1982). Las toxinas G tienen un anillo lactona fusionado en lugar del ciclo pentanona (Viquez *et al.*, 1994). Algunos estudios han demostrado que los nutrientes y el tipo de sustrato son importantes en la producción de aflatoxinas, la cual se estimula por un alto nivel de carbohidratos y un bajo nivel de proteínas; los carbohidratos proveen los dos carbonos precursores para la síntesis de la toxina, por lo que el maíz blanco se considera un buen sustrato para la producción de aflatoxinas, debido a su alto contenido de carbohidratos y bajo contenido de nitrógeno (Viquez *et al.*, 1994).

Los productos biorracionales son sustancias derivadas de microorganismos, plantas o minerales; análogas a las naturales y se caracterizan por tener algún efecto favorable en las plantas y efecto negativo en insectos plaga y patógenos. Poseen baja toxicidad a los humanos y otros vertebrados, por lo que son una alternativa para sustituir de forma gradual el uso de plaguicidas químicos y contribuir a una producción más sana (García Gutiérrez *et al.*, 2012).

Algunos de estos productos son la bacteria *Bacillus subtilis* (Cohn), la cual se ha utilizado en pre y pos cosecha para el control de patógenos en aguacate (Ehremberg), teniendo un efecto tóxico similar al de los fungicidas comerciales, además de actuar como antagonista de hongos patógenos (González y Fragoso, 2002; Korsten *et al.*, 1997). También se sabe que el hongo *Trichoderma* spp., es capaz de controlar, a través de la competencia y depredación, a una amplia gama de fitopatógenos incluyendo a *Pythium* spp., *Rhizoctonia solani* (Kohn), *Fusarium* spp., *Botrytis cinerea* (De Bary), *Phytophthora* spp., *Sclerotium rolfsii* (Sacc.), *Sclerotinia homoeocarpa* (Mitkowski) y *Alternaria alternata* (Keissl) (Harman, 2000; Cook y Baker, 1989; Sánchez, 2001).

Respecto a *G. fasciculatum* se sabe que las plantas desarrollan asociaciones micorrízicas que les confieren mayor capacidad para absorber nutrientes del suelo (Miller y Allen, 1992). Una planta con niveles nutricionales satisfactorios produce metabolitos secundarios, los cuales tienen un papel fundamental en los mecanismos de defensa de la planta contra el ataque de patógenos e insectos.

Por otro lado, compuestos sistémicos como el ácido salicílico (AS) también promueven los mecanismos de defensa en las plantas, induciendo la producción de quitinasas, beta-1,3-glucanasas, ácido jasmónico, letucinina, y rishitina, que la protegen contra patógenos e insectos (López, 1984). La aplicación de AS en tomate, protegió a la planta contra el tizón tardío *Phytophthora infestans* (Mont) y la peca bacteriana del tomate *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Van Hall).

Con base en lo anterior, el presente trabajo tuvo por objetivo: Evaluar el efecto controlador de la aplicación de cinco productos fungicidas biorracionales en la disminución de la enfermedad e Identificar a los principales agentes que causan la pudrición de la mazorca del maíz, así como conocer los niveles de aflatoxinas en grano del maíz blanco cultivado en Sinaloa, México.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se realizó en el Campo Experimental Valle del Fuerte (CEVAF) del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) en Juan José Ríos Sinaloa, km 1609 de la carretera México-Nogales, situado en los 25°05' Latitud Norte y 108°38' Longitud Oeste.

## Efecto de biorracionales sobre la incidencia y severidad de agentes que causan la pudrición de la mazorca del maíz

Se probaron 10 tratamientos (Cuadro 1). El trabajo se realizó en primavera-verano de 2009, la preparación del terreno se hizo de acuerdo a la tecnología utilizada por los productores de maíz en la región (INIFAP CEVAF, 2003). Se depositaron 7 semillas de maíz híbrido Bisonte (Asgrow®) por metro lineal, sobre el lomo del surco húmedo, en hilera simple a 80 cm entre surcos, obteniendo una densidad aproximada de 90.000 plantas ha<sup>-1</sup>. Se empleó un diseño de bloques completamente al azar con diez tratamientos y tres repeticiones. Cada una de las 30 unidades experimentales consistió de cuatro surcos de 0,8 x 10 m; la parcela útil fue de dos surcos centrales para evitar el efecto de borde en cada unidad experimental de 7x1,60 m (11,2 m<sup>2</sup>).

Se evaluó incidencia y severidad de la pudrición de mazorcas, se identificó a los agentes causales de la enfermedad y se determinó la concentración de aflatoxinas. En el Cuadro 1 se presentan los tratamientos, dosis y forma de aplicación de los biorracionales en los lotes.

Para determinar la incidencia de los hongos asociados a los granos recién cosechados en las

Cuadro 1. Tratamientos biorracionales probados en maíz (*Zea mays* L.) híbrido Bisonte contra la pudrición de la mazorca, en Juan José Ríos, Sinaloa México, 2009.

Tratamiento	Dosificación	Método de aplicación
<i>Bacillus subtilis</i> <sup>1</sup>	1,0 x 10 <sup>8</sup> ufc/ml	Semilla
<i>Beauveria bassiana</i> <sup>2</sup>	2,99 x 10 <sup>7</sup> ufc/ml	Semilla
<i>B. bassiana</i>	2,99x10 <sup>7</sup> ufc/ml	Follaje a los 20 dds
<i>B. bassiana</i>	2,99x10 <sup>7</sup> ufc/ml	Semilla y follaje
<i>Glomus fasciculatum</i> <sup>3</sup>	30 g/kg de semilla	Semilla
Sales de potasio de formononetina (SPF) <sup>4</sup>	30 g/kg de semilla	Semilla
<i>G. fasciculatum</i> + SPF	30 g/kg de semilla	Semilla
<i>Trichoderma harzianum</i> <sup>5</sup>	30 g /kg de semilla	Semilla
Ácido salicílico	3.0 g/l	Aspersión al follaje a los 20 y 35 dds
Control	-	-

<sup>1</sup> Aislado CINVESTAV 1-Irapuato

<sup>2</sup> Aislado HM-04 CIIDIR-SINALOA

<sup>3</sup> Aislado CINVESTAV-Irapuato (1000 esporas/100g de inoculo)

<sup>4</sup> Inductor de Micorrización Myconate® Plant Health Care

<sup>5</sup> Aislado T-22® (KRL-AG2) Plant Health Care

<sup>6</sup> dds: Días después de la siembra

Se utilizó una solución azucarada de refresco Coca Cola® como adherente en las semillas.

Las aspersiones de *B. bassiana* y del ácido salicílico se dirigieron al cogollo de la planta.

plantas de maíz, se tomó una muestra de 40 semillas de cada uno de los tratamientos del lote experimental de maíz (Cuadro 1).

Las semillas se sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio al 2% por 3 min y se lavaron tres veces con agua destilada estéril, se secaron en condiciones asépticas y se colocaron en cámara húmeda sobre charolas para incubarlas por dos días a temperatura ambiente (32 °C) y propiciar la germinación. A los cinco días se colocaron en un refrigerador a -4 °C durante 24 horas, con el fin de inactivar la germinación del embrión, después las semillas se colocaron a 22 °C bajo luz difusa para activar el desarrollo de los hongos. A los 10 días se observaron e identificaron las colonias de hongos que crecieron en los granos, mediante un estereomicroscopio Marca Leica® (20 y 40X).

La severidad de la pudrición de mazorca se determinó cuando el grano se cosecho, se obtuvo el promedio de mazorcas podridas de la parcela útil, mediante la escala de severidad: 0 = sin daños; 1 = 1-20% de daño; 2 = 21-40% de daño; 3 = 41-60% de daño; 4 = 61-80% de daño y 5 = 81-100% de daño (Briones, 2007).

### **Identificación morfológica y molecular de hongos asociados a granos de maíz.**

Los aislados de *Fusarium* spp. fueron obtenidos de la colecta de mazorcas de maíz en parcela experimental del lugar de estudio, estas se preservaron en arena estéril, las colonias fueron sembradas en cajas Petri con medios de cultivo agar papa dextrosa (PDA). Las placas se mantuvieron a 22 °C durante 20 días para observar el color de la colonia y la formación de clamidosporas típicas del género. Trozos de hojas de clavel ( $\pm 6 \text{ cm}^2$ ) fueron lavados con detergente y agua se deshidrataron en un horno durante 30 min y se envolvieron en papel aluminio para su esterilización en autoclave (120 °C por 15 min). Se elaboró medio base y se vació a 40 °C en las cajas Petri. Se colocaron los trozos de hoja de clavel sobre la superficie del medio semi-gelificado. El inóculo se esparció sobre las placas para inducir el crecimiento del hongo (Leslie, 2006). Se usó también el medio CLA+KCl (Carnation Leaf Agar + Cloruro de Potasio), su preparación fue similar al anterior con la diferencia de la adición de KCl; a los 15 días se cuenta el número de microconidios en cadena. Para la identificación morfológica de todos los aislados, a nivel de género, se utilizó el manual de Barnett y

Hunter (1998), mientras que para la identificación de especies de *Fusarium* se tomaron los criterios de Booth (1971), así como los de Leslie y Summerell (2006). La identificación de *Aspergillus* y *Penicillium* fue como se describió en la parte de obtención de granos cosechados para estudiar la incidencia de los agentes que causan la enfermedad.

Para la identificación molecular de los principales hongos asociados a las mazorcas la extracción del material genómico se hizo a partir de micelio, las muestras fueron, GF1S y GF2, Ga3 y Gp3. El DNA obtenido (1  $\mu\text{l}$ ) fue utilizado como molde en una reacción de PCR utilizando los oligonucleótidos ITS1 e ITS4 (White *et al.*, 1990). La mezcla de reacción fue con el primer ITS1 (5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3'); 1pmol de primer ITS4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATG 3'). El tamaño del producto fue de 600-650 pb. Se usó un termociclador (BIORAD MyCycler) para amplificar la reacción.

La clonación de DNA se llevó a cabo usando el kit de fluorescencia Quant-It™ dsDNA HS (Invitrogen, EUA). Las lecturas fueron tomadas en el lector multimodal DTX 880 (Beckman Coulter) a una longitud de onda de 485 nm de excitación y 535 nm de emisión. Una vez clonado el producto de PCR, el DNA plasmídico fue enviado al Laboratorio de Secuenciación del Departamento de Ingeniería Genética del CINVESTAV IPN Unidad Guanajuato. Una vez obtenidas las secuencias, se compararon con la base de datos del GeneBank mediante el programa BLAST del National Center of Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), para corroborar la identidad del organismo.

### **Cuantificación de aflatoxinas en grano**

Para la cuantificación de aflatoxinas se utilizó la técnica AOAC (1900), que revela la estructura cumarínica, las instauraciones y la presencia de grupos cetónicos para la detección de las moléculas por cromatografía, así como la polaridad y la fluorescencia bajo la luz ultravioleta. El proceso consistió de dos etapas: extracción y análisis.

Para la extracción se utilizaron muestras de 1,5 kg de grano de maíz por cada tratamiento, mismas que se molieron hasta grano fino en un molino mecánico (1/3 HP eléctrico). El volumen total de grano en cada muestra se dividió en 15 submuestras de 60 g. A partir de cinco submuestras se pesaron 10

g de cada una y se mezclaron obteniendo una muestra representativa de 50 g. Cada sub muestra se molió hasta que el material pasó por la malla No. 20. El grano molido se colocó en un matraz con 500 ml de cloroformo y se cubrió con papel aluminio para evitar la degradación de las aflatoxinas. La mezcla se agitó por 1 min y se dejó reposar por 30 min; pasado ese tiempo, se procedió a filtrar a través de 2 capas de papel filtro (Whatman No. 4 como base, seguido de No. 32). El filtrado se realizó por medio de una bomba de vacío portátil (marca Equipamiento Escolar®). El producto se concentró en un rotavapor (Marca Rotovap500®) a 50 °C, hasta que la muestra alcanzó un volumen de 10 ml.

Para la cuantificación de las cuatro aflatoxinas [B1 y G1] se utilizó una columna cromatográfica de fase reversa en un cromatógrafo de líquidos HPLC Agilent 1100 HP. Se usó un espectrofotómetro de fluorescencia acoplado a un integrador-graficador. Para purificar el extracto se insertó el extremo con una columna de fase corta C18, hasta obtener 250 µl del extracto purificado. El contenido se calentó a 65 °C durante 10 min en baño dejando enfriar a temperatura ambiente. El derivado se filtró a través de una membrana millipore de 0.45 µm de diámetro de poro y se inyectaron 50 µL en la columna de fase de reversa C18 (150 x 4.6 mm y 5mm de tamaño de partícula (Cupel cosil LC-ABZSupelco) conectado a una precolumna Supel guard fase móvil (metanol fosfato de sodio monobásico 0.1 M) (75:25); Flujo 1.8 ml/min, excitación= 335 nm y emisión= 440 nm.

## RESULTADOS

### Efecto de biorracionales sobre la incidencia y severidad de agentes que causan la pudrición de la mazorca del maíz

La incidencia de la pudrición en mazorca en los diferentes tratamientos presento diferencias estadísticas significativas (Tukey,  $\alpha = 0,05$ ).

La menor incidencia se observó en los tratamientos de *B. bassiana* 4,74% y *G. fasciculatum* 6,0% en la aplicación a semilla follaje, los demás no presentaron diferencias con respecto al testigo. Del mismo modo, la severidad de la pudrición de la mazorca en grano cosechado a los 130 dds, presentó diferencias estadísticas significativas entre *G. fasciculatum* 3,60% en aplicación a semilla y *B. bassiana* 3,81% en semilla follaje. Los demás tratamientos no presentaron diferencias, pero fueron menores con respecto al testigo (Cuadro 2).

La incidencia de *F. verticillioides* en granos de maíz fue de 28,3% y de 33,3% en *G. fasciculatum*, estos valores representan una incidencia menor respecto al testigo. Para *P. pinophilum* la menor incidencia 46,7%, se obtuvo con *B. bassiana* en semilla follaje (Tukey,  $\alpha = 0,05$ ), mientras que con *Aspergillus* sp. los tratamientos no mostraron diferencias significativas. Sin embargo, el valor de *G. fasciculatum* + Sales-K formononetina fue el menor de todos los tratamientos (Cuadro 3).

Cuadro 2. Efecto de tratamientos biorracionales en la incidencia y la severidad de la pudrición de la mazorca a los 130 días después de la siembra en maíz (*Zea mays* L.) híbrido Bisonte en Juan José Ríos, Sinaloa México, 2009.

Tratamientos	Método de aplicación	% de incidencia de mazorcas podridas	Severidad de la pudrición (%)
<i>Bacillus subtilis</i>	Semilla	72,98 <sup>a</sup>	14,59 <sup>a</sup>
<i>Beauveria bassiana</i>	Semilla	75,20 <sup>a</sup>	15,04 <sup>a</sup>
<i>B. bassiana</i>	Follaje	80,23 <sup>a</sup>	15,25 <sup>a</sup>
<i>B. bassiana</i>	Semilla-Follaje	4,74 <sup>b</sup>	3,81 <sup>b</sup>
<i>Glomus fasciculatum</i>	Semilla	6,00 <sup>b</sup>	3,60 <sup>b</sup>
Sales de potasio de formononetina (SPF)	Semilla	69,20 <sup>a</sup>	13,84 <sup>a</sup>
<i>G. fasciculatum</i> + SPF	Semilla	75,30 <sup>a</sup>	15,06 <sup>a</sup>
<i>Trichoderma harzianum</i>	Semilla	77,03 <sup>a</sup>	15,41 <sup>a</sup>
Ácido salicílico	Follaje	73,50 <sup>a</sup>	14,70 <sup>a</sup>
Control	-	58,64 <sup>a</sup>	18,39 <sup>a</sup>

Letras iguales en las columnas no presentan diferencias significativas (Tukey,  $\alpha \geq 0,05$ ).

### Identificación morfológica y molecular de hongos asociados a los granos de maíz

Los principales géneros identificados fueron: *Fusarium*, *Penicillium* y *Aspergillus*. Los aislados de *Fusarium* GF1 y GF2 fueron identificados morfológica y molecularmente como *Fusarium verticillioides* (Sacc.) con homologías de 97-100% (Gene Bank) (Cuadro 4). Esta especie produjo microconidios de cadenas largas, ovoides o en forma de maza con la base truncada; su crecimiento en PDA fue con abundante micelio aéreo algodonoso, de color blanco a melocotón o rosa salmón. El color de la colonia en su parte posterior varió de crema a púrpura.

De igual manera, los aislados de *Aspergillus* spp. se identificaron con base a sus características morfológicas (Barnett y Hunter, 1998); su color fue amarillo verdoso o marrón y el aspecto de la colonia fue aterciopelado, el reverso de la placa fue dorado a marrón-rojizo. Los conidióforos de longitud variable y rugosa con fiálides uniseriadas o biseriadas que cubrieron completamente la vesícula. En el caso específico del aislado Ga3, este se identificó molecularmente como *Aspergillus* sp. (Cuadro 4).

En los aislados de *Penicillium* sp. los conidióforos fueron simples o ramificados y los racimos de fiálides en forma de botella (Barnett y Hunter, 1998). Las esporas o conidios en cadenas y las fiálides fueron de color verde. El aislado Gp3 se identificó molecularmente como *P. pinophilum* (Cuadro 4).

### Cuantificación de aflatoxinas en grano de maíz

En la cuantificación de aflatoxinas (B1 y G1) en grano no se detectaron diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos (Cuadro 5).

### DISCUSIÓN

La incidencia más alta de *F. verticillioides* en las muestras de mazorcas analizadas fue de 76,6 % en comparación con la menor incidencia de *Aspergillus* sp. (16,7%) y *P. pinophilum* (78,3 %); estos hongos en conjunto fueron los agentes asociados con mayor frecuencia a la pudrición de las mazorcas. Estos resultados coinciden con los encontrados por Gallardo Reyes *et al.*, (2006) y Quintero Benítez y Apodaca Sánchez (2008). Al respecto, es ampliamente conocido por los productores que en los casos esporádicos donde la incidencia del grano

Cuadro 3. Efecto de tratamientos biorracionales sobre la incidencia de hongos asociados a granos de maíz (*Zea mays* L.) híbrido Bisonte en Juan José Ríos, Sinaloa México, 2009.

Tratamientos	Método de aplicación	<i>Fusarium verticillioides</i>	<i>Penicillium pinophilum</i>	<i>Aspergillus</i> sp.
<i>Bacillus subtilis</i>	Semilla	76,7 <sup>a</sup>	78,3 <sup>ab</sup>	10,8 <sup>a</sup>
<i>Beauveria bassiana</i>	Semilla	65,8 <sup>ab</sup>	62,5 <sup>ab</sup>	16,7 <sup>a</sup>
<i>B. bassiana</i>	Follaje	62,5 <sup>ab</sup>	77,5 <sup>ab</sup>	15,0 <sup>a</sup>
<i>B. bassiana</i>	Semilla y follaje	28,3 <sup>b</sup>	46,7 <sup>b</sup>	30,8 <sup>a</sup>
<i>Glomus fasciculatum</i>	Semilla	33,3 <sup>b</sup>	51,7 <sup>ab</sup>	15,0 <sup>a</sup>
Sales de potasio de formononetina (SPF)	Semilla	63,3 <sup>ab</sup>	70,0 <sup>ab</sup>	10,0 <sup>a</sup>
<i>G. fasciculatum</i> + SPF	Semilla	59,2 <sup>ab</sup>	75,8 <sup>ab</sup>	2,5 <sup>a</sup>
<i>Trichoderma harzianum</i>	Semilla	50,8 <sup>ab</sup>	69,2 <sup>ab</sup>	10,8 <sup>a</sup>
Ácido salicílico	Follaje	55,8 <sup>ab</sup>	70,0 <sup>ab</sup>	12,5 <sup>a</sup>
Control	-	89,2 <sup>a</sup>	94,2 <sup>a</sup>	16,8 <sup>a</sup>

Letras iguales en las columnas no presentan diferencias significativas (Tukey,  $\alpha \geq 0,05$ ).

Cuadro 4. Caracterización molecular de aislados de *Fusarium*, *Aspergillus* y *Penicillium*, asociados a granos de maíz (*Zea mays* L.) híbrido Bisonte en Juan José Ríos, Sinaloa México, 2009.

Aislado	Clave de Acceso	Homología (%)	Especie
GF1 Semilla (Grano)	GU982311.1	97	<i>F. verticillioides</i>
GF2 Semilla(Grano)	GU982311.1	100	<i>F. verticillioides</i>
Ga3(Grano)	FJ827622.1	98	<i>Aspergillus</i> sp.
Gp3(Grano)	GQ422445.1	99	<i>P. pinophilum</i>

podrido llega a ser del 50% en predios afectados por *F. verticillioides* la cosecha ha llegado a ser rechazada por los industriales.

Estos resultados son importantes en la región respecto a los agentes que causan la enfermedad y su control con productos fungicidas biorracionales, así como en la relación de estos hongos con la concentración de aflatoxinas en grano, por lo que se consideran una contribución a la etiología de la pudrición de la mazorca de maíz en la región de estudio.

Respecto al efecto de los biorracionales, la menor incidencia de la pudrición de mazorcas se encontró en el tratamiento con *B. bassiana* en la aplicación a semilla-follaje (4,74%) y *G. fasciculatum* (6,0%), respecto al testigo (58,64%). En concordancia con lo anterior, la severidad de la pudrición de la mazorca fue estadísticamente menor en *G. fasciculatum* (3,60%) y *B. bassiana* (3,81%) aplicados en semilla-follaje, respecto al testigo (18,4%). *B. bassiana* es un hongo entomopatógeno que actúa matando larvas de *S. frugiperda*, *H. zea* y *Euxesta. Stigmatias* (Loew), lo que probablemente provocó una disminución en la incidencia y severidad de la pudrición en las mazorcas, propiciada por los residuos de la alimentación y desechos de estos insectos, facilitando la entrada de los patógenos que provocan esta enfermedad. En este sentido, Paliwal *et al.*, (2001) señalaron que realizando el control de los barrenadores y de los gusanos de la mazorca, se disminuye la pudrición de las mismas. Otros posible mecanismos involucrado en el control de la pudrición de la mazorca con *G. fasciculatum* y *B. bassiana* es que estos podrían actuar como hongos endofíticos.

En el análisis de 150 muestras de grano de maíz analizada solo 90 fueron positivas para aflatoxinas B1 y G1, lo que se debe a la presencia de *Aspergillus* sp. Estos resultados coinciden con lo reportado por Viquez *et al.*, (1994), ellos encontraron que el maíz es un buen sustrato para la producción de estas micotoxinas debido a su alto contenido de carbohidratos y bajo contenido de nitrógeno. No obstante, ninguna de las muestras sobrepasó los niveles de tolerancia de 20 µg/kg de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana (NOM-188-SSA1-2002). Los niveles de aflatoxinas obtenidos concuerdan con el trabajo de Presello *et al.* (2007), quienes determinaron 7,2 µg/kg de aflatoxinas en maíz, señalando que es posible que en cultivos comerciales mal manejados las concentraciones de aflatoxinas sobrepasen los niveles permitidos.

## CONCLUSIONES

Los hongos asociados con mayor frecuencia a la pudrición de la mazorca fueron *F. verticillioides*, *Aspergillus* spp. y *P. pinophilum*, destacando la incidencia de *F. verticillioides* en mazorca.

La menor incidencia de la enfermedad en mazorcas causada por estos hongos se observó en los tratamientos con *B. bassiana* en aplicaciones a grano-follaje 4,74% y *G. fasciculatum* 6,0%, por lo que estos tratamientos se consideran los mejores productos biorracionales para disminuir la incidencia y severidad de la enfermedad.

Los niveles de aflatoxinas detectados en el grano procedente de las plantas expuestas a los diferentes tratamientos biorracionales se ubicaron

Cuadro 5. Efecto de la aplicación de biorracionales en la concentración de aflatoxinas B1 y G1 en granos de maíz (*Zea mays* L.) híbrido Bisonte en Juan José Ríos, Sinaloa México, 2009.

Tratamientos	Método de aplicación	Aflatoxina B1 (µg/kg)	Aflatoxina G1 (µg/kg)
<i>Bacillus subtilis</i>	Semilla	2,6 <sup>a</sup>	19,2 <sup>a</sup>
<i>Beauveria bassiana</i>	Semilla	15,6 <sup>a</sup>	23,5 <sup>a</sup>
<i>B. bassiana</i>	Follaje	16,1 <sup>a</sup>	20,8 <sup>a</sup>
<i>B. bassiana</i>	Semilla y follaje	15,9 <sup>a</sup>	14,8 <sup>a</sup>
<i>Glomus fasciculatum</i>	Semilla	1,3 <sup>a</sup>	5,1 <sup>a</sup>
Sales de potasio de formononetina (SPF)	Semilla	0,1 <sup>a</sup>	5,2 <sup>a</sup>
<i>G. fasciculatum</i> + SPF	Semilla	17,4 <sup>a</sup>	6,5 <sup>a</sup>
<i>Trichoderma harzianum</i>	Semilla	10,8 <sup>a</sup>	18,4 <sup>a</sup>
Ácido salicílico	Follaje	16,1 <sup>a</sup>	11,3 <sup>a</sup>
Control	-	6,0 <sup>a</sup>	12,7 <sup>a</sup>

Letras iguales en las columnas no presentan diferencias significativas (Tukey,  $\alpha \geq 0,05$ ).

dentro de los niveles permitidos por la legislación mexicana (NOM-188-SSA1-2002).

Estos resultados son una contribución a la etiología de la pudrición de la mazorca del maíz en la región de estudio.

### LITERATURA CITADA

- AOAC. 1990. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemist (AOAC). 15<sup>th</sup> Edición. Sección 49. AOAC Method 973.37.
- Barnett, H. L. and B. B. Hunter. 1998. Illustrated genera of imperfect fungi. 4<sup>th</sup> ed. The American Phytopathological Society. Saint Paul, Minnesota, United States of America. 172 p.
- Booth, C. 1971. The genus *Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute. CAB International. Kew, Surrey, England. 237 p. disponible en: <http://maizedoctor.cimmyt.org/> consultado: Octubre 2010.
- Briones, D. 2007. Resistencia a pudrición de mazorca en poblaciones de maíz bajo mejoramiento participativo en el Altiplano de México. Tesis de Maestría. Colegio de Posgraduados Montecillo, Estado de México. 57 p.
- Cook, R. J. and K. F. Baker. 1989. The nature and practice of biological control of plant pathogens. The American Phytopathological Society. Saint Paul, Minnesota, United States of America. 539 p.
- Gallardo Reyes, E. D.; G. M. Ibarra Moreno, R. I. Sánchez Mariñez, G. Cuamea Cruz, D. Molina Gil, N. V. Parra Guevara, E. C. Rosas Burgos y M. O. Cortez Rocha. 2006. Microbiota de maíz (*Zea mays* L.) recién cosechado y producción de fumonicinas B1 por cepas de *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenb. Revista Mexicana de Fitopatología 24:27-34.
- García Gutiérrez, C.; R. L. Gómez Peraza, C. E. López Aguilar y A. León Valdez. 2012. Insecticidas biorracionales para el control de mosquitos y moscas negras en Sinaloa. Ra Ximahi 8 (3): 47-55.
- González, V. y S. Fragoso. 2002. *Bacillus subtilis*. Disponible en <http://www2.cbm.uam.es/microali/pdfs/Bsubtilis.pdf>. Consultado: noviembre 2010.
- Harman, G. 2000. *Trichoderma* spp. including *T. harzianum*, *T. viride*, *T. koningii*, *T. hamatum* and other spp. Deuteromycetes, Moniliales (asexual classification system). Disponible en <http://www.nysaes.cornell.edu/ent/biocontrol/pathogens/trichoderma.html>. Consultado: octubre 2010.
- Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP)/Campo Experimental Valle del Fuerte (CEVAF). 2003 Guía para la asistencia técnica para el área de influencia del Campo Experimental Valle del Fuerte. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Agenda Técnica. 2da. Edición. Juan José Ríos, Sinaloa. 97 p.
- International Agency for Research on Cancer (IARC). 1982. Environmental carcinogens selected methods of analysis. In: H. Egan, L. Stoloff, and I. K. O'Neill (Eds). IARC Publications 44. Lyon, France.
- Korsten, L.; E. E. Villiers, R. C. Wehner and J. M. Kotzet. 1997. Field spray of *Bacillus subtilis* and fungicides for control of preharvest fruit disease of avocado in South Africa. Plant Disease 81:455-459.
- Leslie, J. F.; B. A. Summerell and S. Bullock. 2006. The *Fusarium* laboratory manual. Wiley Blackwell, Publishing. Ames, Iowa, United States of America. 388 p.
- López, B. M. C. 1984. Reguladores del crecimiento V: Estudio de aspersiones de ácido salicílico, saligenina y cinetina en la producción de trigo. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México, México. Dostrito Federal. p. 32-36.
- Palmgren, M. S. and A. W. Hayes. 1987. Aflatoxins in food. In: Mycotoxins in food. P. Krogh (Ed.), Chapter IV. Academic Press. London, United Kingdom. p. 65-95.
- Macías, C. J. y M. S. Peraza. 2000. Enfermedades del maíz en el Norte de Sinaloa. Agronet. Portal Agrícola Mexicano. Disponible en: <http://www.agronet.com.mx/cgi/articles.cgi?Action=Viewhistory&Article=3&Type=A&Datemin=2000-12-01%2000:00:00&Datemax=2000-12-31%2023:59:59>. Consultado: octubre 2010.
- Miller, S. L. and E. B. Allen. 1992. Mycorrhizal functioning. M. F. Allen (Ed). Chapman and Hall. New York, United States of America. 534 p.



- Norma Oficial Mexicana (NOM-188-SSA1). 2002. Productos y Servicios. Control de aflatoxinas en cereales para consumo humano y animal. Especificaciones sanitarias. Disponible en: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/188ssa12.html>. Consultado: noviembre 2010.
- Paliwal, R. L.; G. Granados, H. R. Lafitte y A. D. Violic. 2001. El maíz en los trópicos, mejoramiento y producción. Colección FAO: Producción y Protección Vegetal. Roma, Italia 28: 68-74.
- Presello, D.; J. Iglesias, M. Fernández, C. Fanguel, G. Guillermo Exhéabide y R. Lorea. 2009. Agrolluvia.com portal informativo para el productor reacción de cultivos a hongos productores de micotoxinas en maíz. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Est. Experimental agropecuaria pergamino, cc31, Pergamino 2700. Buenos Aires, Argentina. 12 p.
- Quintero Benítez, J. A. y M. A. Apodaca Sánchez. 2008. Las pudriciones de tallos en el maíz y su manejo en Sinaloa. I Curso sobre Manejo Sustentable del Maíz; Resultados de Investigación en el Norte de Sinaloa. Universidad Autónoma de Sinaloa. Escuela Superior de Agricultura del Valle del Fuerte. Juan José Ríos, Sinaloa. México. 16 p.
- Sánchez, R. M. 2001. Registro de la biosfera del maíz. Disponible en: [http://www.redescolar.ilce.edu.mx/redescolar/publicaciones/publi\\_biosfera/flora/maíz/maiz1.htm](http://www.redescolar.ilce.edu.mx/redescolar/publicaciones/publi_biosfera/flora/maíz/maiz1.htm). Consultado: julio 2010.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP)/Secretaría de Agricultura, Ganadería Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). 2009. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Disponible en: <http://www.sagarpa.gob.mx>. Consultado: noviembre 2010.
- Viquez, O. M.; M. A. Castell Pérez, R. A. Shelby and G. Brown. 1994. Aflatoxin contamination in samples due to environmental conditions, aflatoxin – producing strains and nutrients in grain grown in Costa Rica. *J. Agric. Food Chem.* 42:2551-2555.
- White T. J.; T. Bruns, S. Lee and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *In: PCR protocols: A guide to methods and applications.* M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Shinsky and T. J. White (Eds). Academic Press, San Diego. California, United States of America. P. 305-322.