

INFECCIÓN FÚNGICA EN TEJIDOS DE CARIOPSIS DE MAÍZ Y SU INCIDENCIA EN LA CALIDAD SANITARIA¹

MIRIAM INCREMONA², MIRIAM DEL PILAR GONZÁLEZ³, ADRIANA NORMA GHIO²,
ADRIANA RITA SALINAS^{4*}

RESUMEN – Los objetivos del trabajo fueron evaluar la calidad sanitaria en cariopsis de maíz (*Zea mays* L.) infectados por *F. graminearum* provenientes de plantas inoculadas en diferentes momentos de la floración y determinar la ubicación de *F. graminearum* en los tejidos de cariopsis de maíz. Se evaluó la patología de los cariopsis y se determinó la calidad sanitaria de las espigas inoculadas con *F. graminearum* en diferentes momentos de floración en el Campo Experimental de la Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Rosario, Zavalla – Santa Fe, Argentina. Para determinar la ubicación de *F. graminearum* en tejidos del cariopsis de maíz se realizaron cortes histológicos en los cariopsis con probables síntomas de enfermedad mediante técnicas de corte por congelación, diafanización, tinción y técnica de inclusión en parafina y coloración y se utilizó la Técnica de Rayos X para observar el efecto de la colonización por *F. graminearum* en los tejidos seminales. Se observaron diferencias entre híbridos, sin embargo *F. graminearum* afectó de manera similar los cariopsis en los tercios superior, medio e inferior de la espiga de maíz; la incidencia por *F. graminearum* es baja en cariopsis de maíz debido a la mayor agresividad de *F. verticillioides* al ingresar al estigma del maíz con el grano de polen. *F. graminearum* y *F. verticillioides* no penetran al interior del cariopsis, sino que llegan hasta las capas internas del pericarpo y no afectan la capa de aleurona y el embrión del cariopsis de maíz.

Palabras clave: *F. graminearum*. *F. verticillioides*. Colonización fúngica.

INFECCÃO FÚNGICA EM TECIDOS DE CARIOPSES DE MILHO E SUA INCIDÊNCIA NA QUALIDADE SANITÁRIA

RESUMO – Os objetivos deste estudo foram avaliar a qualidade sanitária de cariopses de milho (*Zea mays* L.) infectados por *F. graminearum* de plantas inoculadas em diferentes momentos da floração e determinar a localização de *F. graminearum* em cariopses de milho. Avaliaram-se a patologia dos cariopses e determinaram-se a qualidade sanitária das espigas inoculadas com *F. graminearum* em diferentes momentos da floração no Campo Experimental da Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Nacional de Rosário, Zavalla - Santa Fe, Argentina. Para determinar a localização de *F. graminearum* em cariopses de milho realizaram-se cortes histológicos aos tecidos com prováveis sintomas da doença e utilizaram-se técnicas de cortes por congelamento, diafanização e tintura, embebição em parafina e coloração. A técnica de raios X foi usada para observar o efeito da colonização por *F. graminearum* em tecidos seminais. Foram observadas diferenças entre híbridos, porém *F. graminearum* afeta de maneira similar às cariopses na parte superior, média e inferior da espiga de milho; a incidência de *F. graminearum* em cariopses de milho é baixa devido à maior agressividade de *F. verticillioides* entrando no estigma de milho com o grão de pólen. *F. graminearum* e *F. verticillioides* não penetram nas cariopses, mas atingem a camadas mais internas do pericarpo, da camada de aleurona e embrião nas cariopses de milho.

Palavras-chave: *F. graminearum*. *F. verticillioides*. Colonização fúngica.

*Autor para correspondência

¹Recibido para publicación el 19/04/2013; aceptado el 14/10/2014.

Trabajo de tesis de Maestría del primer autor.

²Cátedra de Fitopatología, Departamento de Producción Vegetal - Área Protección Vegetal. Facultad de Ciencias Agrarias – Universidad Nacional de Rosario (UNR). C.C.14, C.P. ZAA2125 Zavalla, Santa Fe. Argentina, mincremo@unr.edu.ar.

³Consejo de Investigaciones - UNR.

⁴Cátedra de Fisiología Vegetal, Departamento de Biología. Facultad de Ciencias Agrarias – UNR. C.C.14, C.P. ZAA2125 Zavalla, Santa Fe. Argentina, arsalinas@gmail.com.

INTRODUCCIÓN

Las vías de entrada de *F. graminearum* a la espiga son el transporte de las esporas por las corrientes de aire hasta alcanzar los estigmas de maíz y su posterior germinación y desarrollo a través de los mismos hasta llegar al cariopsis y la causada por las heridas de insectos o pájaros (GOSWAMI et al., 2004). En algunos casos estas esporas se desarrollan simultáneamente a la formación de los cariopsis. La infección de los cariopsis a través de los estigmas fue considerada como una vía de acceso más importante que la infección por heridas (LEWANDOWSKI et al., 2006). Por ello, la incorporación de resistencia a nivel de los estigmas surgió como una alternativa de mejoramiento con el objetivo de disminuir los niveles de infección. Sin embargo, esta propuesta por sí misma no parecería suficiente porque las infecciones en los cariopsis pueden ocurrir en etapas más avanzadas del desarrollo de la espiga. A su vez, la resistencia a nivel de formación de los cariopsis tampoco sería suficiente, debido a que la infección a través de los estigmas ocurre en etapas previas al llenado del cariopsis (PRESELLO et al., 1996).

Los cariopsis de maíz pueden ser afectados por varios patógenos, entre ellos pueden citarse: *Fusarium sp*; *Aspergillus spp*, *Penicillium spp*, *Chaetomium sp*, *Nigrospora spp* y otros, los cuales producen podredumbre de la semilla, afectando la germinación (GOVENDER et al., 2008) y la consecuente muerte de la plántula (LESLIE et al., 2006). Esto determina una emergencia desuniforme y una menor población de plantas emergidas; por lo tanto, el deterioro ocasionado por estos patógenos afectan el rendimiento al provocar la reducción de plantas por unidad de área. Los daños causados son la detención del proceso de llenado del cariopsis y la muerte prematura de la planta (PERUZZO et al., 2012). Entre los patógenos mencionados anteriormente citamos por su importancia a *F. graminearum* Schwabe (*Gibberella zeae* Schwabe.) y *F. verticillioides* (Sin.= *Fusarium moniliforme* J. Sheld (*Gibberella fujikuroi* Sawada) (COVARELLI et al., 2012) como agentes causantes de esta podredumbre (BEYER et al., 2005). Los daños causados por estos patógenos en el cariopsis de maíz todavía no están debidamente cuantificados. Por otro lado, todavía no está claramente demostrada la transmisión de los patógenos desde el cariopsis a las plántulas de maíz y el inóculo podría provenir del mismo cariopsis. El establecimiento y desarrollo de una infección dentro de la plántula o planta es el último paso para el proceso de transmisión por el cariopsis una vez completado y establecido el proceso de infección. A través de las pruebas de patogenicidad, se observó la existencia de la transmisión de *F. graminearum* desde el cariopsis infectado a la plántula originada.

RIBICHICH et al. (2000), trabajando con *F. graminearum* en semillas de trigo, determinaron modificaciones histopatológicas, observando un avance

de la enfermedad en el cariopsis y también en las paredes del mesófilo, parénquima y células epidérmicas de las hojas. Sin embargo, existe poca información sobre la incidencia y los daños que la infección por *F. graminearum* causa en el cariopsis de maíz, pudiendo comprometer la germinación y/o emergencia (CHAMPEIL et al., 2004)

Por todo lo expuesto, los objetivos del trabajo fueron evaluar la calidad sanitaria en cariopsis de maíz infectados por *F. graminearum* provenientes de plantas inoculadas en diferentes momentos de la floración y determinar la ubicación de *F. graminearum* en los tejidos de cariopsis de maíz.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los ensayos para determinar la calidad sanitaria de cariopsis de maíz provenientes de espigas inoculadas con *F. graminearum* en distintos momentos de floración se llevaron a cabo en el Campo Experimental de la Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Rosario, Zavalla - Santa Fe, Argentina.

Se evaluó la patología de los cariopsis y se determinó la calidad sanitaria de las espigas inoculadas con *F. graminearum* en diferentes momentos: inoculación previo a la fecundación, en fecundación y con tejidos de estigmas senescentes. Las inoculaciones a campo se realizaron cuando las plantas se encontraban en estado de emergencia de estigmas (R1) según la escala de Ritchie. En la Figura 1 se observa la presencia de cariopsis infectados con *F. graminearum* (flecha roja) y *F. verticillioides* (flecha negra) en el tercio inferior de la espiga de maíz.

En un ensayo preliminar se evaluó la calidad sanitaria de *F. graminearum* en distintos momentos del periodo de fecundación de la espiga. Se utilizaron los híbridos PO1024 y PO1170, sembrados a 0,70 m entre surcos.

Para determinar la calidad sanitaria se evaluó la incidencia de *F. graminearum* como porcentaje de cariopsis infectados por el hongo para cada híbrido y momento de inoculación. Se realizó la patología de los cariopsis de las espigas cosechadas (ISTA, 2014) de cada uno de los momentos de inoculación descritos. Sobre un total de 900 cariopsis por momento de inoculación y por híbrido (100 cariopsis de cada tercio por repetición y momento de inoculación) se evaluó la incidencia de *F. graminearum* como porcentaje de cariopsis infectados por el hongo por momento de inoculación y por híbrido en un diseño completamente aleatorizado. Los datos expresados en porcentaje se transformaron en arcoseno \sqrt{x} . Luego del análisis de la varianza, las medias se compararon a través de la Prueba de Duncan y de la prueba de F al cinco por ciento de probabilidad para detectar las diferencias entre tratamientos e híbridos respectivamente. Se utilizaron el software INFOSTAT

(2006) y STATISTIX 8 (2007).

Los análisis para evaluar patógenos asociados a los cariopsis se realizaron a partir de espigas expuestas a tres momentos de inoculación: estigmas inoculados con *F. graminearum* en espigas previo a

la fecundación, en espigas fecundadas y sobre tejidos de estigmas senescentes inoculados a los diez días. A su vez, a las espigas pertenecientes a cada momento de inoculación e híbrido se las dividió en tercios: superior, medio e inferior (REID et al., 1996)

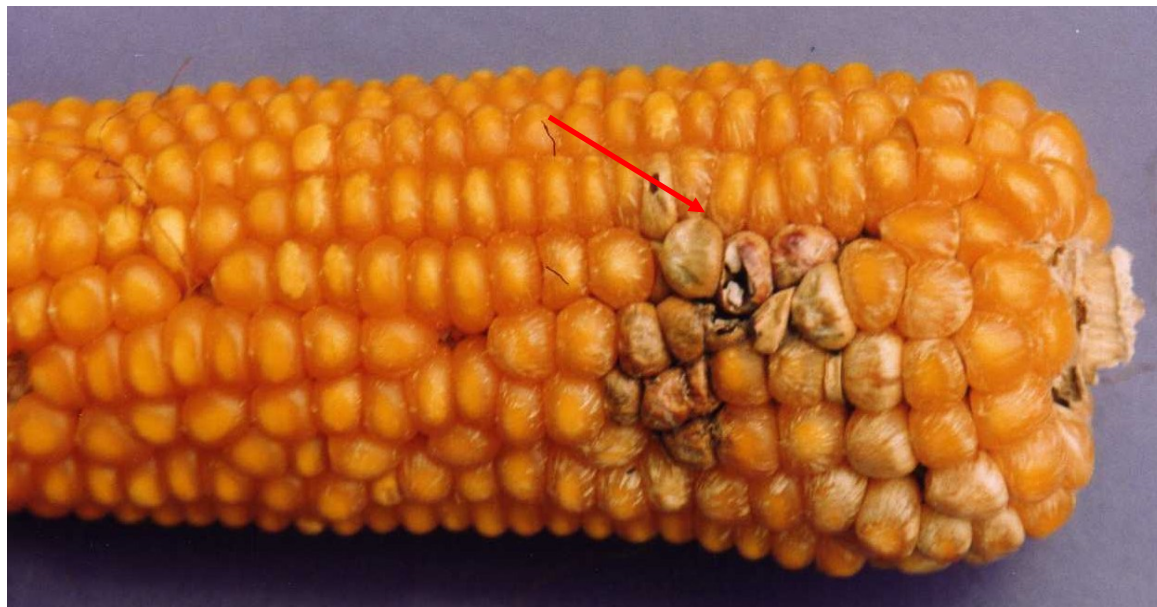


Figura 1. Espiga inoculada, con síntomas de podredumbre por la presencia de *F. graminearum* (flecha color rojo) y *F. verticillioides* (flecha color negro) en el tercio inferior de la espiga.

Se cosecharon separadamente el total de los cariopsis de cada tercio y se formaron muestras compuestas homogéneas con la utilización de un divisor, donde se obtuvo un total de 100 cariopsis de cada tercio, por momento de inoculación e híbrido (ISTA, 2014).

En el ensayo definitivo se realizó la siembra en la segunda semana de septiembre del año 2007 y se determinó la incidencia de *F. graminearum* en los híbridos PO1024 y PO1170, los cuales se sembraron en hileras separadas 1,50 m con tres repeticiones.

Se realizó la patología de los cariopsis de las espigas cosechadas de cada uno de los momentos de inoculación descriptos. Sobre un total de 900 cariopsis por momento de inoculación y por híbrido (100 cariopsis de cada tercio por repetición y momento de inoculación) se evaluó la incidencia de *F. graminearum* como porcentaje de cariopsis infectados por el hongo. Los datos se analizaron mediante un Análisis de Varianza, se expresaron en porcentaje de infección previa transformación en arcoseno \sqrt{x} para su análisis. Para detectar las diferencias entre tratamientos se utilizó la prueba de Duncan al cinco por ciento de probabilidad. Se utilizó el software Infostat 2006 (STATISTIX 8, 2007).

Para determinar la incidencia de *F. graminearum* en los cariopsis de maíz de ambas campañas se sembraron diez cariopsis en APGA (agar papa glucosado acidulado), por híbrido y momento de inoculación en cajas de petri (ISTA, 2014).

Previo a la incubación se realizó la desinfectación

de los cariopsis, para descartar la presencia de cualquier agente extraño que pudiera encontrarse exteriormente sobre las mismas. Se sumergieron durante un minuto y 30 segundos en hipoclorito de sodio al 1 % con dos gotas de alcohol 70°. Posteriormente, se los oreó sobre papel de filtro. Una vez desinfectados, se sembraron directamente en agar papa glucosado acidulado en forma equidistante en un número de diez cariopsis por placa. La incubación se llevó a cabo a 25 °C durante cinco a siete días y ciclos alternos de 12 horas con luz ultravioleta de onda larga, para estimular la fructificación de las colonias.

La identificación de las colonias, por su macro y micro morfología, se realizó con lupa binocular y las estructuras de las colonias (hifas, conidios, fructificaciones) se realizaron mediante observación microscópica. Se utilizaron los objetivos de 40x e inmersión de 100x para observar la presencia de la infección fúngica.

Para corroborar la presencia de esporas de *F. graminearum* en los granos de polen, como otra fuente de inóculo presente en el ambiente durante el ensayo, se extrajo polen de las espigas de maíz de los híbridos PO1024 y PO1170, con los cuales se fecundaron a las plantas en los distintos momentos de inoculación. A partir de una submuestra de los granos de polen extraídos de las panojas de maíz de los híbridos en estudio, se obtuvo una suspensión 1 gramo: 10 ml. La misma fue sembrada con micro pipetas, distribuyendo 1 ml en cajas de petri con APGA y se incubaron a 25 °C durante cinco días.

Se realizaron cortes histológicos en los cariopsis con probables síntomas de enfermedad y se utilizó la Técnica de Rayos X, para observar el efecto de la colonización por *F. graminearum* en los tejidos seminales (BELIN et al., 2011).

Los síntomas de la enfermedad se manifestaron por la presencia de micelio de color rosado por *F. graminearum* y una coloración rojiza, obtenidos de las pruebas de patología de cariopsis, de las pruebas de frío y evaluación de plántulas para evaluar daños morfológicos.

a) *Técnicas de corte por congelación, diafanización y tinción*: porciones de tejido con síntomas obtenidos de las pruebas de patología de cariopsis, prueba de frío y evaluación de plántulas fueron fijadas en Formol Alcohol Ácido Acético (F.A.A). El material vegetal, sin previo tratamiento, fue endurecido por congelación utilizando CO₂ como agente refrigerante contenido en un tubo a presión. Los cortes se realizaron en forma seriada con micrótopo de congelación. Este micrótopo consta de una platina de congelación que está unida al depósito de CO₂. Dicha platina posee perforaciones que permiten la salida del CO₂ que al expandirse, produce el enfriamiento. La cuchilla está sostenida por una porta-cuchillas que posee dos pinzas de sujeción para realizar los cortes. El material está rodeado por la solución de Hamilton – Frecsing que sirve de soporte al congelarse.

También se utilizó la técnica de diafanización de Dizeo de Strittmatter. El material vegetal fue sometido a un proceso de eliminación de taninos, clorofila y otros elementos constitutivos del cariopsis y un proceso de transparencia con hipoclorito de sodio. Otros cortes fueron coloreados mediante la tinción con safranina - verde rápido que permite diferenciar y detectar los cambios histológicos del material vegetal ocurridos por la presencia del patógeno. Esta tinción colorea de rojo los tejidos con paredes lignificadas y de celeste-verdoso aquellos tejidos con paredes celulósicas. Para la preparación de las placas o portaobjetos se utilizó hidrato cloral para quitar la opacidad. Las observaciones de los materiales seleccionados se realizaron con microscopio óptico con 40 x e inmersión de 100 x y las microfotografías se obtuvieron con un equipo digital.

b) *Técnica de inclusión en parafina y coloración*: Los cariopsis con síntomas fueron fijados en FAA, rotulados y mantenidos a temperatura de laboratorio. Se incluyeron en parafina formándose tacos tallados y adaptados para realizar cortes longitudinales y/o transversales con un micrótopo rotatorio de Minot (Swift). Las cintas de parafina, conteniendo los cortes del material vegetal, fueron pegadas sobre portaobjetos e incubadas en estufa a 37 °C durante 24 h y conservadas en cajas rotuladas. Posteriormente, las cintas fueron desparafinadas y los cortes fueron teñidos con safranina-verde rápido. Luego, se procedió a la observación de los materiales seleccionados

con el uso del microscopio óptico con 40 x e inmersión de 100 x.

c) *Técnica de Rayos X*: Se utilizó el equipo de rayos X SEMAX (INTA – Texel – Fac. Cs. Agrarias - UNR, Argentina) el cual no destruye el cariopsis de maíz (CRAVIOTTO et al., 2004). Los cariopsis fueron sometidos a rayos X con una potencia de 35 Kw., una intensidad de 10mA y un tiempo de exposición de 0,65 segundos. Las imágenes digitalizadas fueron procesadas, manipuladas y almacenadas a través del software VIXWINTM (2000).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con relación a la calidad sanitaria en cariopsis de maíz provenientes de espigas inoculadas con *F. graminearum* en distintos momentos de la floración, la Tabla 1 muestra la incidencia (%) de infección de cariopsis infectados con *F. graminearum* incubados en APGA.

Se evidenció interacción significativa entre híbridos y momentos de inoculación, pero solamente se observaron cariopsis infectados con *F. graminearum* en el híbrido PO1024 en las plantas inoculadas previo a la fecundación. Además de la infección producida por *F. graminearum*, se encontraron cariopsis infectados con *F. verticillioides*. Probablemente, este último patógeno influyó negativamente en la expresión y presencia de *F. graminearum*. Sin embargo, en la inoculación previo a la fecundación, *F. graminearum* se pudo expresar debido al momento en que se realizó la inoculación y por las características del híbrido.

La Tabla 2 muestra el porcentaje de infección de cariopsis con *F. verticillioides* en APGA en los distintos momentos de inoculación con *F. graminearum*, durante la campaña 2004/05.

No hubo interacción significativa entre híbridos y momentos de inoculación. Por otro lado, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre híbridos ni entre momentos de inoculación. Estos resultados evidencian la alta competitividad que existe entre ambos *Fusarium*, siendo *F. verticillioides* el que más se expresa en los distintos momentos de inoculación y en ambos híbridos. La presencia de este patógeno en el cariopsis a pesar de no haber sido inoculado, muestra su alta virulencia ya que se dispersa por el aire.

En la evaluación de la infección de cariopsis por *F. graminearum* se encontraron colonias de *F. verticillioides* en las placas de petri de ambos híbridos. Por tal motivo, la presencia de este último hongo se consideró en la evaluación, ya que el patógeno influenciaría directamente en presencia de *F. graminearum*, por su agresividad e virulencia con respecto al *F. graminearum*.

La Tabla 3 muestra la Incidencia (%) de *F. graminearum* en plantas inoculadas con *F. grami-*

nearum previo a la fecundación, en fecundación y en tejidos de estigmas senescentes.

No se observó interacción significativa entre híbridos y momentos de inoculación. Los híbridos PO1024 y PO1170 mostraron diferencias estadísticamente significativas y el híbrido PO1024 tuvo el mayor porcentaje de cariopsis infectados. Por otro

lado, no hubo diferencias significativas entre los momentos de inoculación.

La Tabla 4 muestra la Incidencia (%) de *F. verticillioides* en plantas inoculadas con *F. graminearum* previo a la fecundación, en plantas fecundadas y en tejidos de estigmas senescentes.

Tabla 1. Incidencia (%) de *F. graminearum* en cariopsis de dos híbridos de maíz provenientes de plantas inoculadas previo a la fecundación, en fecundación y en tejidos de estigmas senescentes en la campaña 2004 - 05.

Híbridos	Momento de Inoculación con <i>F. graminearum</i>			Medias
	Previo a la fecundación	En Fecundación	En estigmas senescentes extraídos al 10° día de la fecundación	
PO1024	9 Aa*	0 Ba	0 Ba	3
PO1170	0 Bb	0 Ba	0 Ba	0
Medias	4,5	0	0	

*Medias seguidas de igual letra minúscula en la columna no difieren entre sí (Prueba de F) y medias seguidas de igual letra mayúscula en la fila, no difieren entre sí al nivel de 5% (Prueba de Duncan).

Tabla 2. Incidencia (%) de *F. verticillioides* en cariopsis de dos híbridos de maíz provenientes de plantas inoculadas con *F. graminearum* previo a la fecundación, en fecundación y en tejidos de estigmas senescentes en la campaña 2004 - 05.

Híbridos	Momento de Inoculación con <i>F. graminearum</i>			Medias
	Previo a la fecundación	En Fecundación	En estigmas senescentes extraídos al 10° día de la fecundación	
PO1024	25	21	23	23 a*
PO1170	30	27	23	26 a
Medias	27 A	24 A	23 A	

*Medias seguidas de igual letra minúscula en la columna no difieren entre sí (Prueba de F) y medias seguidas de igual letra mayúscula en la fila, no difieren entre sí al nivel de 5% (Prueba de Duncan).

Tabla 3. Incidencia (%) de *F. graminearum* en cariopsis de dos híbridos de maíz provenientes de plantas inoculadas previo a la fecundación, en fecundación y en tejidos de estigmas senescentes. Campaña 2005-2006.

Híbridos	Momentos de inoculación con <i>F. graminearum</i>			Medias
	Previo a la fecundación	En Fecundación	En tejidos de estigmas Senescentes	
PO1024	0,3	0,4	0,8	0,5 a*
PO1170	0	0	0,1	0 b
Medias	0,2 A	0,2 A	0,4 A	

*Medias seguidas de igual letra minúscula en la columna no difieren entre sí (Prueba de F) y medias seguidas de igual letra mayúscula en la fila, no difieren entre sí al nivel de 5% (Prueba de Duncan).

Tabla 4. Incidencia (%) de *F. verticillioides* en cariopsis de dos híbridos de maíz provenientes de plantas inoculadas con *F. graminearum* previo a la fecundación, en fecundación y en tejidos de estigmas senescentes. Campaña 2005-2006.

Híbridos	Momentos de Inoculación con <i>F. graminearum</i>			Medias
	Previo a la fecundación	En Fecundación	Tejidos de estigmas Senescentes	
PO1024	11 Ca*	23 Ba	33 Aa	22
PO1170	12 Aa	14 Ab	15 Ab	14
Medias	12	18	24	

* Medias seguidas de igual letra minúscula en la columna no difieren entre sí (Prueba de F) y medias seguidas de igual letra mayúscula en la fila, no difieren entre sí al nivel de 5% (Prueba de Duncan).

Hubo interacción estadísticamente significativa entre híbridos y momentos de inoculación. Los híbridos se comportaron en forma diferencial frente a los distintos momentos de inoculación, mostrando el híbrido PO1024 valores de porcentaje de infección estadísticamente más altos que en el híbrido PO1170. En el híbrido PO1024 los momentos de inoculación se comportaron estadísticamente de manera diferen-

te, y por el contrario, en el híbrido PO1170 los momentos de inoculación se comportaron de manera similar.

En la Tabla 5 se muestra la Incidencia (%) de *F. graminearum* en plantas inoculadas previo a la fecundación, en fecundación y en tejidos de estigmas senescentes, en los tercios superior, medio e inferior de la espiga de dos híbridos de maíz.

Tabla 5. Incidencia (%) de *F. graminearum* en cariopsis inoculados en tres momentos de la floración del maíz en los tercios superior, medio e inferior de espigas de dos híbridos de maíz. Campaña 2005- 2006.

Híbridos	Plantas Inoculadas previo a la fecundación			Medias
	Tercio Superior	Tercio Medio	Tercio inferior	
PO1024	0,7	0	0,3	0,3 a
PO1170	0	0	0	0 a
Medias	0,35 A	0 A	0,2 A	
Híbridos	Plantas Inoculadas en Fecundación			Medias
	Tercio Superior	Tercio Medio	Tercio inferior	
PO1024	0,7	0,3	0,3	0,4 a
PO1170	0	0	0	0 a
Medias	0,35 A	0,2 A	0,2 A	
Híbridos	Plantas inoculadas en tejidos de estigmas senescentes			Medias
	Tercio Superior	Tercio Medio	Tercio inferior	
PO1024	0	1,6	0,7	0,7 a
PO1170	0	0,3	0	0,1 a
Medias	0 A	0,9 A	0,35 A	

*Medias seguidas de igual letra minúscula en la columna no difieren entre sí (Prueba de F) y medias seguidas de igual letra mayúscula en la fila, no difieren entre sí al nivel de 5% (Prueba de Duncan).

No se observó interacción significativa entre los híbridos y los momentos de inoculación. Los híbridos PO1024 y PO1170 se comportaron en forma similar en todos los momentos de inoculación. No hubo diferencias estadísticamente significativas entre los tercios superior, medio e inferior de la espiga en los diferentes momentos de inoculación.

En la Tabla 6 se muestra la Incidencia (%) de *F. verticillioides* en plantas inoculadas con *F. graminearum* previo a la fecundación, plantas fecundadas y tejidos de estigmas senescentes, en los tercios superior, medio e inferior de la espiga de dos híbridos de maíz.

No se observó interacción significativa entre los híbridos y los tercios de la espiga en los diferentes momentos de inoculación. Los híbridos PO1024 y PO1170 se comportaron en forma diferencial en plantas inoculadas en fecundación y en tejidos de estigmas senescentes, siendo esas diferencias estadísticamente significativas, mientras que el momento de inoculación previo a la fecundación, los híbridos tuvieron un comportamiento similar. El nivel de infección en los diferentes tercios de la espiga fue similar, excepto en el momento de inoculación de plantas previo a la fecundación donde los tercios superior y medio presentaron valores más elevados de infección de cariopsis que en el tercio inferior.

En aquellos cariopsis que comenzaron a desarrollar colonias de *F. graminearum* también se observó el ataque por *F. verticillioides*. En la Figura 2a se

observa la presencia de ambos patógenos, donde *F. graminearum* se ubica a la izquierda y *F. verticillioides* a la derecha en cada caja de petri. En la Fig. 2b se observa un avance de las hifas de color claro de *F. verticillioides* sobre el micelio de *F. graminearum* que presenta un color fucsia. Si bien no se crea un halo de inhibición por parte de *F. verticillioides*, se observó una ventaja del mismo sobre la colonia de *F. graminearum*.

Se observó un comportamiento diferencial de los híbridos PO1024 y PO1170 al estudiar la capacidad y el momento de infección de los estigmas inoculados por *F. graminearum*. El híbrido PO1024 mostró mayor susceptibilidad a la infección por *F. graminearum* en los tres momentos de inoculación que el híbrido PO1170. También, este híbrido fue más susceptible al ataque por *F. verticillioides* cuando las plantas se inocularon en fecundación y con tejidos de estigmas senescentes. El ingreso de *F. verticillioides* a través del grano de polen, confirmado a través de su incubación en APGA en este trabajo, demuestra su interferencia en el crecimiento de *F. graminearum* en los estigmas fecundados, reduciendo los niveles de infección de este último patógeno. *F. verticillioides* es un patógeno más agresivo, avanza rápidamente sobre *F. graminearum* en los estigmas fecundados y compite con ventaja frente a este último patógeno en el interior del estigma, logrando un avance más rápido (STEWART et al., 2002). Por tal motivo, los estigmas de plantas fecundadas pre-

sentan una menor incidencia con respecto a plantas inoculadas previo a la fecundación y en tejidos de estigmas senescentes.

Así mismo, la participación del grano de polen estaría implicada en la medida que estos serían acompañados por esporas de otros patógenos, como

F. verticillioides y *Aspergillus* spp, que penetrarían en los estigmas cuando estos son fecundados. Sin embargo, la competitividad y agresividad de estos patógenos sería mayor que la de *F. graminearum*, ejerciendo asociaciones negativas con este último patógeno (MUNKVOLD, 2003).

Tabla 6. Incidencia (%) promedio de *F. verticillioides* en cariopsis inoculados en tres momentos de la floración del maíz con *F. graminearum* en los tercios superior, medio e inferior de espigas de dos híbridos de maíz. Campaña 2005- 2006.

Plantas Inoculadas previo a la fecundación				
Híbridos	Tercio Superior	Tercio Medio	Tercio inferior	Medias
PO1024	16	9	7	11 a
PO1170	16	16	4	12 a
Medias	16 A	13 A	6 B	
Plantas Inoculadas en fecundación				
Híbridos	Tercio Superior	Tercio Medio	Tercio inferior	Medias
PO1024	27	22	19	23 a
PO1170	15	15	12	14 b
Medias	21 A	19 A	16 A	
Plantas inoculadas en tejidos de estigmas senescentes				
Híbridos	Tercio Superior	Tercio Medio	Tercio inferior	Medias
PO1024	33	37	28	33 a
PO1170	20	14	11	15 b
Medias	26 A	25 A	20 A	

*Medias seguidas de igual letra minúscula en la columna no difieren entre sí (Prueba de F) y medias seguidas de igual letra mayúscula en la fila, no difieren entre sí al nivel de 5% (Prueba de Duncan).

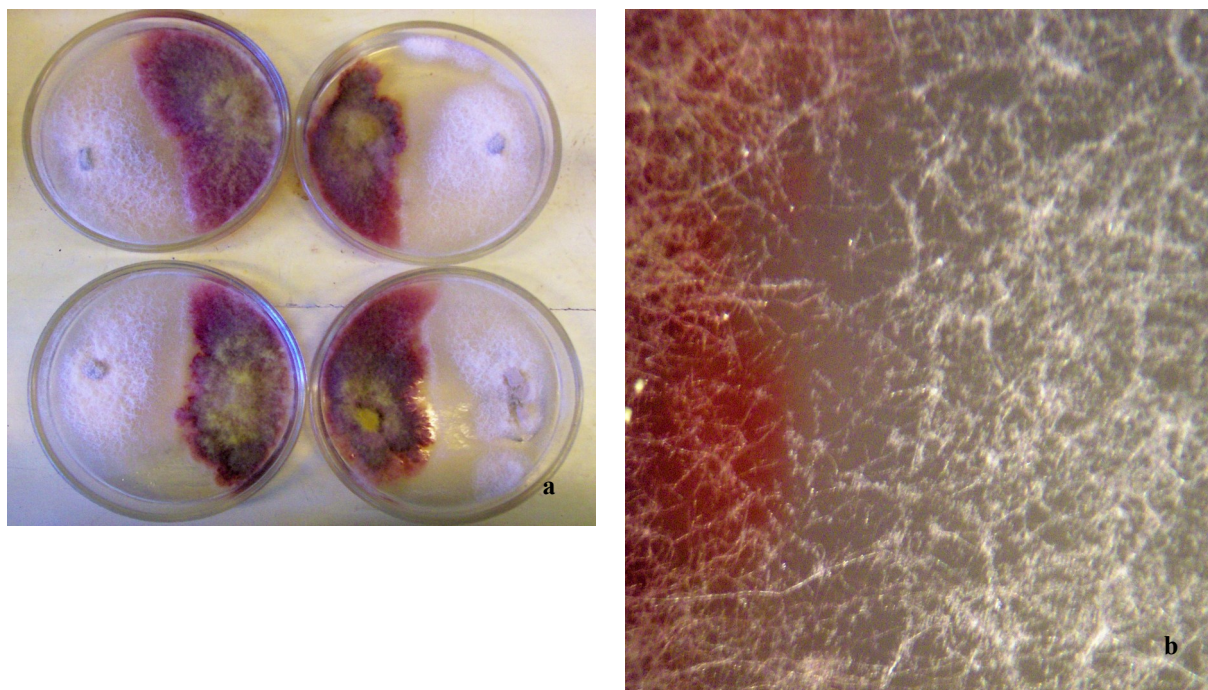


Figura 2. Crecimiento de colonias de *F. graminearum* y *F. verticillioides* provenientes de cariopsis de maíz incubados en APGA.

a: colonias de *F. graminearum* (fucsia) y *F. verticillioides* (blanco) enfrentadas; b: enfrentamiento de hifas de *F. graminearum* (izquierda) y *F. verticillioides* (derecha) (40x).

La mayor presencia de colonias de *F. verticillioides* que de *F. graminearum*, obtenidas de la incubación en APGA de los cariopsis inoculados con *F. graminearum* en ambas campañas, podría deberse a que el polen jugaría un rol importante en el traslado de esporas de *F. verticillioides*, las cuales se desarrollarían en los estigmas y avanzarían con una velocidad más rápida que *F. graminearum* y esta competitividad fue corroborada también por MUNKVOLD et al. (2003) y STEWART et al. (2002). Además, *F. verticillioides* podría actuar competitivamente con *F. graminearum*. STEWART et al. (2002) observaron una tasa de crecimiento de *F. graminearum* más lenta que la de *F. verticillioides*, indicando una cierta interferencia por parte de este último patógeno frente a la presencia de *F. graminearum*. REID et al. (1999) observaron que *F. verticillioides* suprime el crecimiento de otros hongos incluyendo *F. graminearum* y *Aspergillus flavus*. La infección inicial del cariopsis por *F. verticillioides* serviría como prevención a la infección de los cariopsis por otros patógenos incluido *F. graminearum* en muestras de maíz infectadas por *F. verticillioides*, donde observaron un bajo porcentaje de cariopsis infectados por *F. graminearum*. Es probable que las hifas de *F. verticillioides* lleguen más rápidamente al cariopsis y avancen en sus tejidos en una forma más agresiva que *F. graminearum*. Por otro lado, hay evidencias que muestran que *F. verticillioides* es un patógeno ubicuo y de infección endofítica.

Cabe destacar que en la campaña 2005 - 06 las condiciones ambientales fueron subóptimas para

F. graminearum y favorecieron a *F. verticillioides*. Por lo tanto, pudo influir en la baja incidencia de *F. graminearum* en los estigmas fecundados. Por otra parte, estos estigmas fueron inoculados cuando se encontraban en un 50 % expuestos y en el momento del corte se hallaban en un 100 % expuestos (BROWN et al., 2011). La sintomatología rojiza asociada solamente a la presencia de *F. graminearum* de acuerdo a antecedentes previos, no pudo ser verificada en este trabajo, ya que se encontraron ambos patógenos. La ausencia de coloración rojiza en los cariopsis podría deberse al avance más rápido de *F. verticillioides* con respecto a *F. graminearum*. En forma similar, se observó durante el período de antesis en maíz, una infección natural y la colonización por parte de *F. verticillioides*, sin aparentes síntomas de podredumbre por lo que la sintomatología de color rojiza se debería a la presencia de ambos patógenos y no solamente de *F. graminearum*.

Al evaluar la incubación de los granos de polen, la presencia de *F. graminearum* no fue detectada mediante la incubación de una suspensión de granos de polen en APGA. No obstante, en el estudio realizado se obtuvieron colonias de *F. verticillioides* en los granos de polen de maíz de ambos híbridos. En el marco de la información disponible sobre el tema, los resultados de este trabajo confirman la entrada de *F. verticillioides* a través del grano de polen, siendo una importante vía de acceso y colonización de los estigmas de maíz.

En este estudio, el nivel de ataque de *F. graminearum* fue similar en los distintos tercios de la

espiga y en los tres momentos de inoculación. La predominancia de *F. verticillioides* sobre *F. graminearum* se verificó por la mayor presencia de colonias de este patógeno a diferencia de las colonias de *F. graminearum*. Ambos patógenos se ubican en el pericarpo del cariopsis y existe una competencia entre ellos, la cual se verifica por un mayor nivel de infección por *F. verticillioides* al colocar en APGA ambos patógenos. Estos resultados fueron similares a los obtenidos por REID et al. (1999) quienes informaron sobre la supresión del crecimiento de *F. graminearum* ante la presencia de *F. verticillioides*, ya que el mismo presenta una gran capacidad de crecimiento en un amplio rango de condiciones ambientales.

Existen antecedentes que determinaron que la infección de los cariopsis por *F. verticillioides* puede ser la resultante de una infección sistémica de plantas

y cariopsis. Sin embargo, la infección a través de los estigmas sería el camino más importante hacia los cariopsis más que la infección sistémica, según los resultados obtenidos en este trabajo.

Con relación a la ubicación de *F. graminearum* en tejidos del cariopsis de maíz, en las muestras extraídas de la prueba de patología de cariopsis, prueba de frío y germinación estándar, se observaron en los cariopsis una sintomatología de manchas de color rojizo (Figura 3). Estos cariopsis mostraron la mencionada coloración cuando se inició el proceso de germinación. Se realizaron cortes histológicos cuando se los incluyó en parafina y también se observó la presencia de hifas de *F. graminearum* y *F. verticillioides* que invadieron las capas del pericarpo en toda su extensión, pero no avanzaron hacia la capa de aleurona.



Figura 3. Cariopsis de maíz extraídos de las pruebas de vigor y germinación estándar con síntomas de *F. graminearum* y *F. verticillioides*.

Por la coloración safranina - verde rápido, los tejidos celulósicos se tiñen de color verde azulado y los tejidos lignificados de color rojo oscuro. En la Figura 4 se observa la capa del pericarpo y la capa de aleurona con sus gránulos de almidón. Estas capas se tiñen de una coloración rojiza y verde azulado respectivamente y los gránulos de almidón se presentan

como puntuaciones oscuras. Se pueden observar las hifas de *F. graminearum* entrando y recorriendo las células del pericarpo en toda su extensión. Estas se detienen en la capa aleuronífera sin llegar a penetrarla y los gránulos de almidón permanecen intactos; se observan las hifas de *F. graminearum* de color azul atravesando las capas del pericarpo.

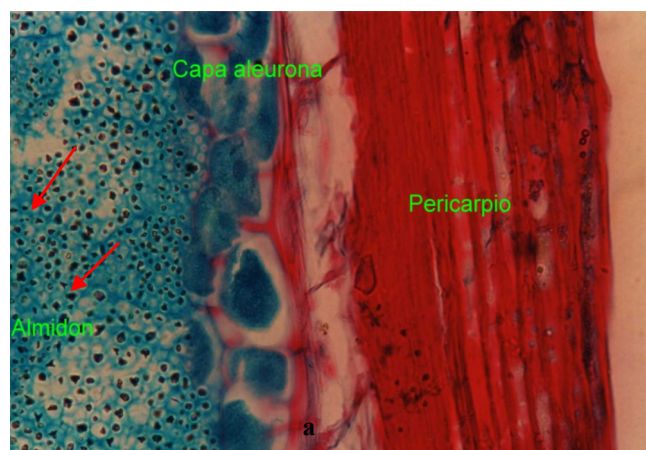


Figura 4. Corte histológico de los cariopsis de maíz con hifas de *F. graminearum* constituido por la capa de pericarpo, capa de aleurona y sus gránulos de almidón, se observa la presencia de hifas (flechas rojas) en la capa del pericarpo

La Figura 5a muestra las clamidosporas o formas de resistencia de *F. graminearum* en la capa del pericarpo y en la Figura 5b la hifas de *F. graminearum* con una coloración azul invadieron y coloni-

zaron las distintas capas del pericarpo y van recorriendo las distintas células que conforman esta capa sin llegar a dañar la capa de aleurona, quedando los gránulos de almidón intactos.

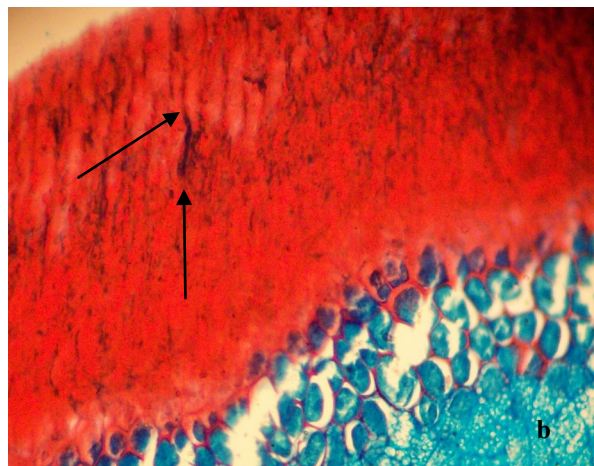


Figura 5. Presencia de hifas *F. graminearum* en el pericarpo de cariopsis de maíz. a: clamidospora de *F. graminearum*; b: hifas atravesando el pericarpo del cariopsis de maíz (color rojizo), capa aleuroni-fera intacta (color azul) (100x); b: hifas de *F. graminearum* (indicadas con flecha negra) en el pericarpo del cariopsis de maíz.

Por el método de inclusión en parafina, se observó la presencia de hifas de *F. verticillioides* en el pericarpo de los cariopsis de maíz, con macroconidios largos, usualmente con tres o cinco septas y microconidios unidos en cadena de monofialides. Se evidencia la presencia de hifas con conidióforos cortos (10 µm). En la capa del pericarpo se encontraron hifas de *F. graminearum* mezcladas con hifas de *F. verticillioides*.

prueba de frío y germinación estándar y se observaron manchas de color rojizo, evidenciando la presencia de *F. graminearum* y *F. verticillioides* (CRAVIOTTO et al., 2004) (VIXWIN™, 2000). Se confirmó la presencia de ambos patógenos fúngicos en los tejidos del cariopsis del maíz (Figura 6a). La Figura 6b muestra en el híbrido PO1024 una sintomatología de bandas claras (*starburst*) que recorren el pericarpo del cariopsis de maíz, estas bandas se la asocia a la presencia de *F. verticillioides*.

Se aplicó la Técnica de rayos X en las muestras de cariopsis extraídos de la prueba de patología,

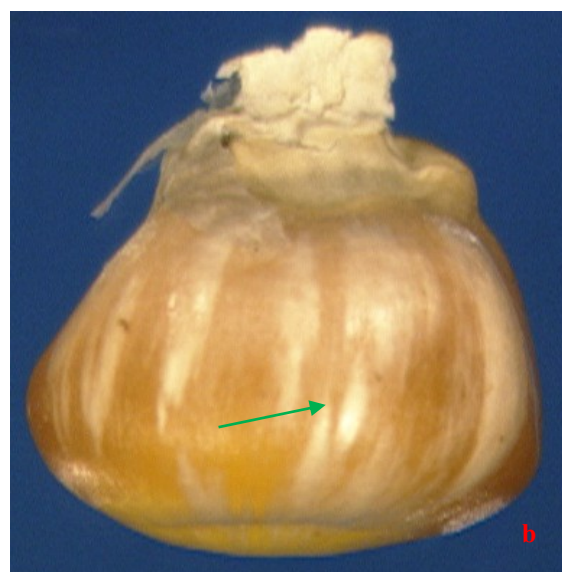
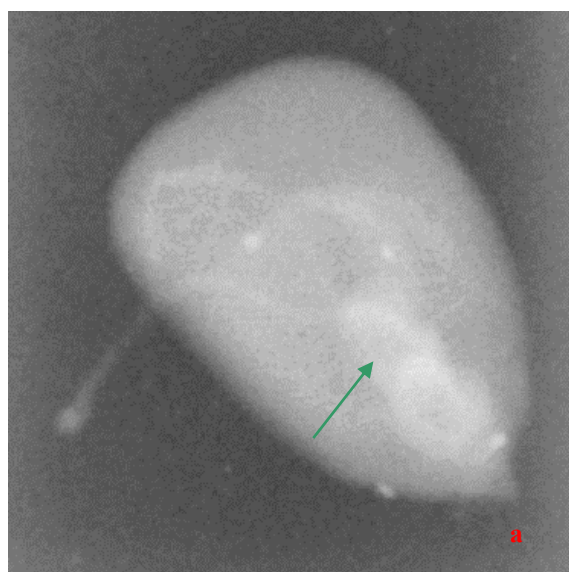


Figura 6. Imagen radiográfica digital de cariopsis de maíz con y sin sintomatología de manchas de color rojizo y de bandas claras (*starburst*). a: híbrido PO1024 con presencia del micelio en el interior del cariopsis (flecha); b: cariopsis de maíz con *F. verticillioides* indicados con una sintomatología de bandas claras en el híbrido PO1024.

Los estudios histológicos de tinción realizados en los cariopsis de maíz permitieron la observación de las hifas de *F. graminearum* y *F. verticillioides*. También la prueba de rayos X permitió observar ambos patógenos en los cariopsis infectados (BELIN et al., 2011). Las hifas de ambos patógenos invadieron las capas externas del pericarpo sin llegar a dañar la capa de aleurona o los tejidos internos. Así también, la tinción con safranina - verde rápido permitió la diferenciación de las distintas capas y/o tejidos que conforman el cariopsis de maíz y la colonización del cariopsis por la invasión fúngica.

CONCLUSIONES

El híbrido PO1024 es más susceptible al ataque de *F. graminearum* que el híbrido PO1170.

F. graminearum afecta de manera similar los cariopsis en los tercios superior, medio e inferior de la espiga de maíz.

La incidencia por *F. graminearum* es baja en cariopsis de maíz debido a la mayor agresividad de *F. verticillioides* al ingresar al estigma del maíz con el grano de polen.

F. graminearum y *F. verticillioides* no penetran al interior del cariopsis, sino que llegan hasta las capas internas del pericarpo y no afectan la capa de aleurona y el embrión del cariopsis de maíz. La presencia de *F. graminearum* y de *F. verticillioides* se manifiesta a través de la presencia de coloración rojiza en los cariopsis de maíz.

REFERENCIAS

BELIN, E. et al. Rate-distortion tradeoff to optimize high-throughput phenotyping systems. Application to X-ray images of seeds. **Computers and Electronics in Agriculture**, Linn, v. 77, n. 2, p. 188–194, 2011.

BEYER, M. et al. Effect of relative humidity on germination of ascospores and macroconidia of *Gibberella zeae* and deoxynivalenol production. **International journal of Food Microbiology**, v. 98, p. 233–240, 2005.

BROWN, N. A. et al. The infection biology of *Fusarium graminearum*: Defining the pathways of spikelet to spikelet colonization in wheat ears. **Fungal Biology**, Philadelphia, v. 114, n. 7, p. 555–571, 2010.

CHAMPEIL, A.; DORE, T.; FOURBET, J. *Fusarium* head blight: epidemiological origin of the effects of cultural practices on head blight attacks and the production of mycotoxins by *Fusarium* in wheat grains. **Plant Science**, v. 166, p. 1389–1415, 2004.

COVARELLI, L. et al. Characterization of *Fusarium verticillioides* strains isolated from maize in Italy: fumonisin production, pathogenicity and genetic variability. **Food microbiology**, v. 31, p. 17–24, 2012.

CRAVIOTTO, R. et al. A Device for Automated Digital X-Ray Imaging for Seed Analysis. **Seed Science & Technology**, v. 32, n. 3, p. 867–871, 2004.

GOSWAMI, R. S.; KISTLER, H. C. Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crops. **Molecular Plant Pathology**, v. 5, p. 515–25, 2004.

GOVENDER, V.; AVELING, T. A. S.; KRITZINGER, Q. The effect of traditional storage methods on germination and vigour of maize (*Zea mays* L.) from northern KwaZulu-Natal and southern Mozambique. **South Africa Journal of Botany**, Heidelberg, v. 74, p. 190–196, 2008.

INFOSTAT. Datos de ejemplos. Publicado en Internet. Software statistical. Version 2006. Disponible em: < <http://www.infostat.com.ar>>. Acceso em: 08 set. 2013.

INTERNACIONAL SEED TESTING ASSOCIATION. **ISTA. Rules for Seed Testing**. Supplement. Zurich: ISTA, 2014. 364 p.

LESLIE, J. F. et al. **The *Fusarium* laboratory manual**. Blackwell Publishing, 2006. 388 p.

LEWANDOWSKI, S. M., BUSHNELL, W. R., EVANS, C. K. Distribution of mycelial colonies and lesions in field-grown barley inoculated with *Fusarium graminearum*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 96, n. 6, p. 567–581, 2006.

MUNKVOLD, G. Epidemiology of *Fusarium* diseases and their mycotoxins in maize ears. Department of Plant Pathology, Iowa State University. **Journal Plant Pathology**, v. 109, p. 705–713, 2003.

PERUZZO, A. et al. Relación entre infección de *Fusarium graminearum* y transmisión de toxinas a las semillas y harinas de trigo y soja. In: CONGRESO SOCIEDAD DE BIOLOGIA DE ROSARIO, 14. 2012. p. 166. Versión digital

PRESELLO, D. A. et al. Stability of maize resistance to the ear rots caused by *Fusarium graminearum* and *F. verticillioides* in Argentinian and Canadian environments. **Euphytica**, v. 147, p. 403–407, 2006.

REID, L.M. et al. Screening Maize for Resistance to *Gibberella* Ear Rot. **Agriculture and Agri-Food Canada Technical Bulletin 1996-5E**– Canada, On-

tario, 1996. 37 p.

REID, L. et al. Interaction of *Fusarium graminearum* and *F. moniliforme* in maize ears: disease progress, fungal biomass, and mycotoxin accumulation. **Pytopathology**, v. 89, p. 1028–1037, 1999.

RIBICHICH, K. et al. Histopathological spikelet changes produced by *Fusarium graminearum* in susceptible and resistant wheat cultivars. **Plant Disease**, v. 84, p. 794–802, 2000.

STATISTIX 8. **User's Manual**. Analytical Software. Chapter 8, Association test, p. 396, 2007.

STEWART, D. et al. A Mathematical simulation of growth of *Fusarium* in Maize ears after artificial inoculation. **Phytopathology**, v. 92, p. 534–541, 2002.

VIX VixWin™. **Digital Imaging Software**. Operator Manual. Ed. Dentsply International Gendex Dental X-ray Division, p. 80, 2000.