

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA  
FACULTAD DE AGRONOMIA  
COMISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO  
DOCTORADO DE CIENCIAS AGRICOLAS

TESIS DOCTORAL

INFLUENCIA DE LA MICROBIOTA ASOCIADA AL MAÍZ (*Zea mays* L.) SOBRE  
LA CALIDAD SANITARIA DE LA SEMILLA Y LA SOSTENIBILIDAD DEL  
SISTEMA DE CERTIFICACION DE SEMILLAS DE ESTE CULTIVO EN  
VENEZUELA

Autor: Ing. Agr. MSc. Neyda Simosa  
Tutores: Dr. Fausto Miranda  
Dra. Miriana Cerovich de  
Miranda (In Memoriam)

Maracay, Diciembre 2015

TESIS DOCTORAL

INFLUENCIA DE LA MICROBIOTA ASOCIADA AL MAÍZ (*Zea mays* L.) SOBRE  
LA CALIDAD SANITARIA DE LA SEMILLA Y LA SOSTENIBILIDAD DEL  
SISTEMA DE CERTIFICACION DE SEMILLAS DE ESTE CULTIVO EN  
VENEZUELA

Autor: Ing. Agr. MSc. Neyda Simosa  
Tutores: Dr. Fausto Miranda  
Dra. Miriana Cerovich de  
Miranda (In Memoriam)

Maracay, Diciembre 2015

Trabajo de Grado como requisito final para optar al título de  
Doctor en Ciencias Agrícolas

COMITÉ ASESOR

Dra. Miriana Cerovich de Miranda  
Tutora In Memoriam

Dr. Fausto Miranda  
Tutor

Dr. Félix San Vicente  
Asesor

Con todo mi amor a mis hijos

## AGRADECIMIENTOS

- Agradezco a la Prof. Miriana Cerovich de Miranda mi tutora In Memoriam, por haberme dado todo su apoyo y comprensión durante la realización de mis estudios de doctorado y especialmente por su valiosa dirección y apoyo durante la realización de esta investigación.
- Agradezco a mi tutor, Prof. Fausto Miranda por su aporte de ideas, sugerencias y conocimientos desde el inicio de esta investigación, por su dedicación y apoyo durante la redacción y presentación de la tesis y especialmente por haber aceptado ser mi tutor en las condiciones y momento tan difícil por el que estaba pasando.
- Al profesor Luis José Subero por su, apoyo y asesoramiento en el desarrollo de esta investigación y por su amistad y valiosos consejos.
- A la Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado, por permitir realizar mis estudios de Postgrado y a la Universidad Central de Venezuela-Doctorado de Ciencias Agrícolas, por su formación académica.
- A las empresas SEHIVECA y SEFLOARCA quienes contribuyeron en la planificación y ejecución de la recolección de información en campo para realizar esta investigación.
- A todos los profesores y personal administrativo y obrero del Laboratorio de Fitopatología del Departamento de Botánica Agrícola y al Departamento de Agronomía en la Facultad de Agronomía de la UCV quienes me dieron su apoyo en todo momento
- A los profesores Rosana Figueroa Ruiz, Lisbeth Díaz y Carlos Parraga por el asesoramiento en el área de estadística.
- A mis amigos y compañeros de trabajo por sus continuas palabras de aliento y apoyo durante los momento difíciles
- A todas aquellas personas e instituciones que contribuyeron a la realización y culminación de esta tesis.

GRACIAS

## **INFLUENCIA DE LA MICROBIOTA DEL MAÍZ (*Zea mays* L.) SOBRE LA CALIDAD SANITARIA DE LA SEMILLA Y LA SOSTENIBILIDAD DEL SISTEMA DE CERTIFICACION DE SEMILLAS EN VENEZUELA**

Numerosos patógenos incluyendo *Fusarium*, *Aspergillus* y *Penicillium* infectan semillas, plántulas y plantas del cultivo de maíz convirtiéndose en un eficiente vehículo de diseminación y transmisión de enfermedades. El objetivo de esta investigación fue evaluar la influencia del inoculo de microbiota transmisible por la semilla de maíz sobre la calidad sanitaria y sostenibilidad del sistema de certificación de semillas de este cultivo en Venezuela. Para ello se seleccionaron dos lotes de producción de semilla híbrida de maíz en las localidades La Cuarta y Valle de Tucutunemo del estado Aragua. La caracterización de la microbiota inicial se realizó sobre muestras aleatorias de suelo y semilla de los parentales. La microbiota en follaje e inflorescencia femenina se evaluó mediante muestreo sistemático entre filas y al azar dentro de las filas, con 25 puntos por parcela, e intervalos de quince y siete días respectivamente. Se analizó la germinación estándar y el vigor de semillas maduras. El control químico de la microbiota fue estudiado con aplicaciones presembrado de dosis comerciales de cinco fungicidas en laboratorio. En campo, se evaluó la eficacia de aplicaciones foliares de dosis comerciales de Benomyl sobre la incidencia de microbiota en semillas maduras. La influencia potencial de la comercialización de semilla híbrida de maíz portadora de microbiota transmisible sobre la sostenibilidad del sistema de certificación de semillas, fue estimada mediante el uso de resultados parciales de esta investigación y una encuesta para los actores del sistema de certificación de maíz. Los resultados demostraron alta incidencia de microbiota en semillas de los parentales e inflorescencias femeninas, con rangos entre 36 y 71% para *Fusarium*, entre 0,2 y 30% para *Penicillium* y entre 6% y 82% para *Aspergillus*. En los lotes de suelo las frecuencias de *Aspergillus* y *Penicillium* fueron superiores a 14% y 22%, respectivamente. En follaje, se registró baja incidencia (3,68%) de *Curvularia*, mientras que durante las etapas reproductivas la infección por microbiota aumentó hasta 34,27% en madurez fisiológica (MAFI), hasta 95,73% a la madurez de cosecha (MACO). La semilla producida en época de lluvias presentó mayor % de microbiota que producida en época de nore verano. Los altos niveles de microbiota natural no afectaron el % de germinación y vigor de la semilla requerido para certificación. El Benomyl en tratamiento presembrado controló la microbiota hasta 3%. Las aplicaciones foliares de Benomyl cada 15 días redujeron en 50% la incidencia de microbiota total en la etapa MAFI. Según los actores consultados, los actuales procedimientos de certificación de semilla de maíz no verifican la calidad sanitaria de la semilla, lo que podría amenazar la sostenibilidad del sistema de producción de semillas y granos de maíz. Las conclusiones fueron: El alto nivel de microbiota en la semilla híbrida de maíz, es consecuencia del inoculo original presente en todos los agentes bióticos que participan en el ciclo de producción de semilla de maíz; se requieren modificaciones tecnológicas y legales que garanticen la producción y comercialización de semilla certificada de maíz con calidad sanitaria sustancialmente superior a la actual.

Palabras Clave: semilla de maíz, microbiota, calidad sanitaria, germinación.

## **INFLUENCE OF MICROBIOTA ASSOCIATED TO MAIZE (*Zea Mays L.*) ON HEALTH QUALITY OF SEEDS AND SUSTAINABILITY OF SEED CERTIFICATION SYSTEM IN THIS CROP IN VENEZUELA**

Many pathogens, including *Fusarium*, *Aspergillus* and *Penicillium* have been reported in crop maize, infecting seeds, seedling and crop plots becoming efficient agents for diseases dissemination and transmission. This research was designed to evaluate the influence of microbiota population transmissible to maize seeds on health quality and sustainability of seed certification system of this crop in Venezuela. For this purpose, two lots for hybrid seed production of maize were selected in La Cuarta and El Valle de Tucutunemo, in Aragua state. To characterize initial microbiota, randomized samplings of soil locations and parental seed were taken. The microbiota screening on foliage and female inflorescence were made by systematic sampling between rows and randomized within rows, at 15 and 7 days intervals respectively, upon 25 sites per plot. Germination and vigor tests of mature seeds were performed. Chemical control of microbiota of dry seed of maize was evaluated by commercial doses of pre sowing treatment of five fungicides, were evaluated in the laboratory. Also, the effect of Benomyl on microbiota infecting harvested seed was studied. To evaluate potential impact of trading seed maize with important levels of microbiota upon sustainability of venezuelan seed certification system of maize, was studied by using partial results of this research and a poll responded by actors of seed certification system. Results proved that parental seeds and female plant inflorescences were heavily infected with *Fusarium* (36% - 71%), *Aspergillus* (0, 6% - 82%) and *Penicillium* (0, 25% - 30%). Soil plots were infected by *Aspergillus* (14, 00%) and *Penicillium* (22,00). On the foliage, incidence of *Curvularia* spot was 3, 68%. Microbiota incidence increased during reproductive stages up to physiological maturity (MAFI) stage with 34, 27%, and the highest level at harvest maturity (MACO) with 95, 73%. Also, fungi infections were higher than during rainy season than in "Norte verano" season. The proven high incidence of natural microbiota had no effect on seed germination and vigor levels. Benomyl preplanting seed treatment made best control seed microbiota (3,00%). Foliar applications of Benomyl diminished *Fusarium* incidence by 50% at MAFI stage. According to consulted actors, current procedures of certification system do not enforce health quality status for trading maize seed, which might become a potential menace for sustainability of seed and grain maize production across the country. The conclusions were; a) The high level of microbiota detected in maize seed is the consequence of original inoculum present in all biological components of hybrid seed production of maize; b) technological and legal modifications applied to the Venezuelan certification system for maize are required to assure the certification and trading of substantially higher health quality maize seed.

Key words: maize seed, microbiota, health quality, germination.

## INDICE

	<b>Pág.</b>
DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
RESUMEN.....	v
ABSTRACT.....	vi
ÍNDICE.....	vii
INDICE DE CUADROS.....	xi
INDICE DE FIGURAS.....	xiv
INDICE DE ANEXOS.....	xv
INTRODUCCIÓN .....	xvi

### **CAPITULO I:**

#### **CARACTERIZACIÓN DE LA MICOBIOTA NATURAL EN SEMILLAS DE MAÍZ, PRODUCIDA EN DOS ÉPOCAS DE SIEMBRA EN EL ESTADO ARAGUA.**

RESUMEN.....	1
I. INTRODUCCIÓN.....	2
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
1. Enfermedades transmitidas por semilla.....	5
2. Enfermedades diseminadas por la semilla.....	8
3. Etapas de desarrollo del maíz.....	8
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	10
1. Micobiota natural en semillas de parentales y progenie de los híbridos de maíz.....	10
2. Micobiota natural en suelos de campos para la producción de semilla certificada en dos localidades de Aragua.....	12
3. Micobiota natural en el follaje de la planta durante el desarrollo de la misma:.....	12
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	14

1. Micobiota natural en semillas de parentales de los tres híbridos de maíz.....	14
2. Micobiota natural en suelos de campos para la producción de semilla certificada en dos localidades de Aragua .....	17
3. Micobiota natural en el follaje de la planta maíz durante el desarrollo de la misma.....	20
4. Micobiota natural en semilla madura de los híbridos de maíz evaluados..	22
V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....	25
VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	26
VII. ANEXOS CAPITULO I.....	32

## **CAPITULO II:**

### **CARACTERIZACION DEL PATRÓN DE INFECCIÓN POR MICOBIOTA DURANTE LA FORMACIÓN, DESARROLLO Y MADURACIÓN DE LA SEMILLA HÍBRIDA DE MAÍZ**

RESUMEN.....	40
I. INTRODUCCION.....	41
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	43
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	46
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	48
V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....	56
VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57

## **CAPITULO III:**

### **INFLUENCIA DE LA MICOBIOTA NATURAL SOBRE LA CALIDAD FISIOLÓGICA DE LA SEMILLA HÍBRIDA DE MAÍZ.**

RESUMEN.....	62
I. INTRODUCCIÓN.....	63
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	64
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	67

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	69
V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....	73
VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74

**CAPITULO IV:**

**EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DE LOS FUNGICIDAS  
SISTEMICO EN EL CONTROL DE LA MICOBIOTA EN  
SEMILLAS HÍBRIDAS DE MAÍZ.**

RESUMEN.....	77
I. INTRODUCCIÓN.....	78
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	79
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	84
1. Experimento de laboratorio.....	84
2. Experimento de campo.....	85
2.1. Incidencia de la micobiota en follaje.....	85
2.2. Incidencia de la micobiota en las semillas en las etapas de madurez fisiológica (MAFI o R6) y madurez de cosecha (MACO).....	85
2.3. Efecto del tratamiento sobre la germinación de las semillas.....	86
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	87
1. Experimento de laboratorio .....	87
2. Experimento de campo .....	89
2.1. Incidencia de la micobiota en follaje.....	89
2.2. Incidencia de la micobiota en las semillas en etapas de madurez fisiológica (MAFI) y madurez de cosecha (MACO).....	91
2.3. Efecto del tratamiento sobre la germinación de las semillas .....	93
V. CONCLUSIONES..Y RECOMENDACIONES .....	95
VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	96

**CAPITULO V:**

**INFLUENCIA POTENCIAL DE LA DISTRIBUCIÓN DE SEMILLA**

**HÍBRIDA DE MAÍZ PORTADORA DE MICOBIOTA  
TRANSMISIBLE, SOBRE LA SOSTENIBILIDAD DEL ACTUAL  
SISTEMA DE CERTIFICACIÓN DE SEMILLAS.**

RESUMEN.....	100
I. INTRODUCCIÓN.....	101
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	103
1. Desarrollo del cultivo y la producción de semilla certificada de maíz en Venezuela.....	103
2. Situación actual y perspectivas del sistema de certificación de semillas de maíz en Venezuela.....	107
3. Calidad sanitaria y sostenibilidad del sistema de certificación de semillas de maíz.....	108
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	111
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	112
V. CONCLUSIONES..Y RECOMENDACIONES .....	124
VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	125
VII. ANEXOS CAPITULO V.....	129
<b>CAPITULO VI</b>	
DISCUSIÓN GENERAL.....	133

## INDICE DE CUADROS

N°		Pág.
<b>CAPITULO I</b>		
1.1	Etapas de desarrollo del maíz según Hanway y Ritchie (1984).....	9
1.2	Promedios de incidencia de micobiota total (MT) e individual (MI) en semilla parental de híbridos sembrados en dos localidades y dos épocas de siembra en el estado Aragua.....	16
1.3	Inóculo potencial (UFC/g)* de micobiota natural en dos lotes de suelo, dos épocas de siembra y dos localidades del estado Aragua.....	18
1.4	Porcentaje de incidencia de micobiota en suelos de dos localidades y épocas de siembra en el estado Aragua.....	19
1.5	Incidencia promedio (%) de <i>Curvularia</i> , <i>Helminthosporium sp.</i> y <i>Physoderma</i> en semillas en desarrollo de tres híbridos sembrados en dos épocas de siembra y dos localidades del estado Aragua.....	22
1.6	Incidencia promedio (%) de micobiota total e individual, durante las etapas de madurez fisiológica (R6) y madurez de cosecha (MACO) de semilla de maíz producida en dos épocas de siembra y dos localidades del estado Aragua. ....	23
 <b>CAPITULO II</b>		
2.1	Prueba de Kruskal-Wallis (Valores de H) para incidencia de micobiota total (MT) e individual (MI) durante etapas de desarrollo reproductivo ( <b>EtapRep</b> ), estructuras reproductivas ( <b>EstruRep</b> ) y ubicación de la semilla en las mazorcas ( <b>Ubsemaz</b> ) de tres híbridos de maíz producidos en dos épocas de siembra y dos localidades del estado Aragua.....	48
2.2	Incidencia promedio de MT y MI en las etapas de desarrollo reproductivo (EtapRep) de semilla HÍBRIDA de maíz producida dos épocas de siembras y dos localidades del estado Aragua. ....	50
2.3	Incidencia promedio (%) de la MT y MI en estructuras reproductivas desde flor a semilla de los híbridos Himeca 3002, DANAC 3273 sembrado en la Cuarta y Valle de Tucutunemo en época de lluvia y Sefloarca 91 sembrado en el Valle de Tucutunemo en norte verano.....	54

### CAPITULO III

3.1	Análisis de varianza (valores de F) para un diseño completamente al azar, de la germinación y el vigor de las semillas de los híbrido Himeca 3002, DANAC 3273 sembrados en época de lluvia en la Cuarta y Valle de tucutunemo respectivamente y Sefloarca 91 sembrado en norte verano en el valle de Tucutunemo.....	69
3.2	Porcentaje promedio de germinación de semilla de los híbridos Himeca 3002, DANAC 3273 producida época de lluvia en la Cuarta y valle de Tucutunemo respectivamente, y Sefloarca 91 sembrado en época de norte verano en el Valle de Tucutunemo. ....	70
3.3	Porcentaje promedio de germinación de semilla de los híbridos Himeca 3002, DANAC 3273 producida época de lluvia en la Cuarta y valle de Tucutunemo respectivamente, y Sefloarca 91 sembrado en época de norte verano en el Valle de Tucutunemo. ....	70

### CAPITULO IV

4.1	Fungicidas y dosis aplicada a semillas de maíz del híbrido Himeca 3002 para el control de la micobiota natural.....	84
4.2	Análisis de varianza (valores de F) para un diseño completamente al azar, del efecto de los fungicidas sobre la incidencia de la MT y MI en semillas del híbrido del maíz Himeca 3002.....	87
4.3	Incidencia promedio (%) de MT y MI en semillas del híbrido de maíz Himeca 3002, tratadas con cinco fungicidas y un control.....	88
4.4	Análisis de varianza (valores de F) para incidencia de <i>Curvularia</i> en follaje de plantas de maíz de parentales del híbrido, DANAC 3273, con y sin aplicación de Benomyl durante tres etapas de desarrollo (ED) en el Valle de Tucutunemo, en época de lluvias.....	90
4.5	Incidencia (%) de <i>Curvularia</i> para la interacción de tratamientos sin y con aplicaciones de Benomyl en las etapas de desarrollo reproductivo (EDR) de parentales del DANAC 3273.....	90
4.6	Análisis de Kruskal-Wallis (Valores de H) para efectos de tratamiento con y sin Benomyl en las etapas MAFI y MACO del híbrido DANAC 3273.....	91
4.7	Incidencia promedio (%)de MT y MI para efecto de tratamiento con y sin Benomyl en las etapas MAFI y MACO del híbrido DANAC 3273 ...	92
4.8	Análisis de varianza (Valores de F) y significancia para efecto de tratamientos con y sin Benomyl sobre el vigor y la germinación de las semillas del híbrido DANAC 3273.....	93

4.9	Respuesta de germinación y vigor de semillas del híbrido DANAC 3273, al tratamiento de Benomyl.....	94
-----	---	----

## **CAPITULO V**

5.1	Perfil de los actores registrados en el Servicio Nacional de Semillas como participantes en la producción de semilla certificada de maíz.....	118
5.2	Percepción de los actores encuestados sobre la calidad sanitaria de la semilla de maíz producida en el país.....	119
5.3	Percepción de los actores encuestados sobre Los requisitos para la certificación de semillas y que opinión tienen sobre el actual programa de certificación.....	122

## **CAPITULO VI**

7.1	Recopilación de las conclusiones y recomendaciones de los capítulos....	139
-----	---	-----

## INDICE DE ANEXOS

Nº		Pág.
<b>CAPITULO I</b>		
1.1	Cronograma de muestreos para el híbrido Himeca 3002 (Abril-Agosto 2007).....	33
1.2	Cronograma de muestreo para el híbrido DANAC 3273 (Abril-Agosto 2007).....	34
1.3	Cronograma de muestreo para el híbrido Sefloarca 91 (Octubre-Febrero 2008).....	35
1.4	Análisis de varianza (valores de F) para incidencia de micobiota total (MT) e individual (MI) en semilla parental de tres híbridos sembrados en dos localidades y dos épocas de siembra del estado Aragua.....	36
1.5	Análisis de Kruskal-Wallis (valores de H) para incidencia de micobiota natural en dos suelos, dos localidades y dos épocas de siembra del estado Aragua.....	37
1.6.	Análisis de varianza (valores de F) y prueba de Kruskal Wallis (valores de H) para la incidencia de la micobiota en el follaje durante las etapas de desarrollo (ED) de tres híbridos producidos en dos épocas de siembra y dos localidades del estado Aragua.....	38
1.7	Prueba de Kruskal-Wallis (valores de H) para la incidencia de micobiota total e individual durante las etapas de madurez fisiológica (MAFI) (R6) y madurez de cosecha (MACO) de semilla HÍBRIDA de maíz producida en dos épocas de siembra y dos localidades del estado Aragua.....	39
<b>CAPITULO V</b>		
5.1	ENCUESTA.....	130

## INTRODUCCIÓN

El maíz es un cultivo estratégico para la dieta del venezolano y la seguridad agroalimentaria del país. Los avances en mejoramiento genético de maíz y la implementación del sistema de certificación de semilla de maíz (SCM) han contribuido al incremento de la productividad del cultivo y al abastecimiento con semilla nacional (Miranda, 1997; Oropeza, *et al.*; 2000, Vielma, 2003).

La región central del país persiste como la principal zona de producción y comercialización de SCM, pero las investigaciones de Da Silva (2006), Díaz (2006) y Díaz *et al.* (2007) destacan problemas sanitarios y agronómicos asociados con debilidades tecnológicas y operativas de los programas de producción y control de calidad de las empresas productoras y el Servicio Nacional de Semillas (SENASA), respectivamente.

Considerando que la semilla es un medio eficaz de diseminación de patógenos perjudiciales a la sanidad ambiental, y en reconocimiento a la importancia de la sostenibilidad de otras zonas de producción de SCM, es importante correlacionar el inóculo de microbiota natural (MN) presente en los componentes bióticos de la cadena de producción y uso de SCM, para definir estrategias de mejoramiento de la calidad sanitaria, fisiológica y genética de la semilla, para implementar estrategias de manejo que fortalezcan la sostenibilidad del sistema de producción en Venezuela y la seguridad alimentaria nacional.

En este contexto, previa la autorización de la honorable Comisión del Doctorado en Ciencias Agrícolas de la Facultad de Agronomía de la UCV, y del Comité Académico correspondiente, presentamos para la evaluación reglamentaria, la Tesis Doctoral de Neyda Simosa, titulada “INFLUENCIA DE LA MICROBIOTA ASOCIADA AL MAÍZ (*Zea mays* L.) SOBRE LA CALIDAD SANITARIA DE LA SEMILLA Y LA SOSTENIBILIDAD DEL SISTEMA DE CERTIFICACION DE

SEMILLAS DE ESTE CULTIVO EN VENEZUELA.”, cuyo contenido ha sido organizado bajo el modelo de un objetivo general (OG), que define la estrategia y el alcance de la investigación realizada, cinco objetivos específicos (OEs), cuyo contenido responde su planteamientos táctico en correspondencia con el objetivo general.

El objetivo general de esta investigación fue “Evaluar la influencia de las poblaciones de micobiota transmisible por la semilla de maíz sobre los patrones de calidad sanitaria y el sistema de certificación de semillas maíz en Venezuela.”.

Los cinco objetivos específicos, conforman los capítulos del I al V de la presente Tesis Doctoral, cuyos detalles son: el objetivo del Capítulo I fue, “Caracterizar e identificar la micobiota presente en semillas de híbridos de maíz, producida en dos épocas de siembra en el estado Aragua”. Este propósito abarcó la identificación del origen y desarrollo del inóculo potencial de la micobiota natural (MN), discriminada en micobiota total (MT) e individual (MI) en todos los agentes bióticos de la producción de SCM, a saber: semillas de los parentales y de sus progenies Himeca 3002, DANAC 3273 y Sefloarca 91; micobiota en el suelo de los lotes seleccionados para producir la semilla híbrida en dos localidades del estado Aragua; micobiota natural en follaje de las plantas madres durante las etapas de desarrollo vegetativo y reproductivo; semillas en etapas de maduración y cosecha. En el Capítulo II, se identificó la micobiota natural presente en diferentes partes de la inflorescencia femenina durante las etapas de desarrollo del grano hasta madurez de cosecha (MACO) con el objeto de identificar el patrón de infección por micobiota durante las fases de formación, desarrollo y maduración de la semilla de maíz híbrido. El Capítulo III, consistió en evaluar la influencia de la micobiota natural sobre la calidad sanitaria y fisiológica de la semilla híbrida de maíz, definida esta como los porcentajes de germinación y vigor de semillas infectadas con los niveles de MT y MI correspondientes. En el Capítulo IV, se priorizó “evaluar la eficacia del tratamiento con fungicidas para controlar la micobiota en semillas de maíz”, incluido

Benomyl, como tratamiento pre siembra de semillas, y en aplicaciones foliares en campos de producción de SCM. El Capítulo V, estimó mediante un análisis crítico la influencia potencial de la distribución de semilla de híbridos de maíz portadora de microbiota transmisible, sobre la sostenibilidad del actual sistema de certificación de semillas.

Se finaliza con el capítulo VI donde se realiza una discusión general de apoyo a los aspectos relevantes tratados en los capítulos individuales, culminando con las conclusiones relevantes, extraídas de los eventos desarrollados en cada capítulo, así como las recomendaciones para promover el desarrollo de nuevas investigaciones y proyectos para validar o ampliar los resultados de la presente investigación.

## CAPITULO I

### **Caracterización de la micobiota natural en semillas de maíz producida en dos épocas de siembra del estado Aragua.**

El maíz es un cultivo estratégico para la dieta del venezolano y la seguridad agroalimentaria del país. Los avances en mejoramiento genético y la producción sostenida de semilla certificada de maíz (SCM) han contribuido al crecimiento de la productividad y abastecimiento nacional de este cultivo. Aragua persiste como la principal zona de producción y comercialización de SCM, pero sus campos reflejan problemas sanitarios y agronómicos que requieren soluciones, porque la semilla es un medio eficiente de diseminación y transmisión de patógenos. Este contexto destaca la importancia de caracterizar e identificar la micobiota presente en semillas de híbridos de maíz producida en dos épocas de siembra en el estado Aragua, para definir estrategias de control y mejoramiento de la calidad sanitaria de la SCM. Para esto se identificó y cuantificó el porcentaje de incidencia de micobiota total (MT) e individual (MI) en semillas parental de los híbridos Himeca 3002, DANAC 3273 y Sefloarca 91; en los suelos de las localidades y épocas de siembra seleccionadas para producción de SCM; en follaje de plantas del cultivo y semillas en las etapas de desarrollo, maduración y cosecha. Para ello se tomaron muestras al azar de semilla de los parentales a sembrar; 25 muestras sistemáticas entre hileras y al azar dentro de las hileras del cultivo, y 25 mazorcas en las etapas de madurez fisiológica (MAFI) y madurez de cosecha (MACO). La micobiota fue identificada por el método de las placas de Petri con agar (ISTA, 1993). Las muestras de suelo fueron colectadas al azar y procesadas por el método de dilución (Tuite, 1969). Los porcentajes de incidencia de enfermedades se determinaron sobre muestreo quincenal a partir de los 15 días después de la siembra (DDS). Los resultados mostraron que la MT estaba compuesta por *Fusarium* spp., *Penicillium* sp., *Aspergillus flavus*, *A. niger*, patógenos con alto potencial epidémico y riesgo para la salud vegetal, animal y humana, además de *Curvularia* sp., *Acremonium* sp. y *Rhizopus* sp. Esta MT tuvo alta incidencia en la semilla parental de los tres híbridos evaluados y la de sus progenies con porcentajes de incidencia que variaron entre 52 y 98 %. La semilla materna de los tres híbridos presentó los máximos porcentaje de incidencia de MT con valores ligeramente menores en semilla de los tres padres. Para la progenie de los tres híbridos los porcentajes de infección por MT durante la MAFI variaron entre 8 y 71%; pero con máxima incidencia en la etapa de MACO donde la incidencia fue superior al 90 %. Estos resultados confirman que la SCM puede ser un medio eficiente de diseminación y transmisión de patógeno de maíz y recomienda las investigaciones complementarias que caractericen riesgo epidemiológico y ambiental asociado con la distribución y uso de SCM con los perfiles sanitarios encontrados.

Palabras clave: semilla de maíz; patología de semillas; *Fusarium*; *Penicillium*; *Aspergillus*; fuente de inóculo, calidad sanitaria.

## I. INTRODUCCIÓN

El maíz (*Zea mays* L.) junto con el arroz y el trigo son los cereales con mayor importancia en la alimentación mundial. En Venezuela, para el año 2013 el maíz representó el 57 % de la superficie cosechada de cereales, por lo que es uno de los cultivos con mayor demanda de semilla pues cerca del 80% de la siembra se realiza con semilla certificada (FEDEAGRO, 2015).

Internacionalmente, los principales contaminantes de semillas y granos de maíz son especies referibles a los generos *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus* y *Mucor* (McGee, 1988; Khosravi *et al.*, 2007) En Venezuela, los hongos con mayor incidencia comprobada en el cultivo de maíz son *Fusarium*, *Aspergillus* y *Penicillium* (Mazzani y Borges, 1993; Mazzani *et al.*, 2000; Mazzani *et al.*, 2001; Da Silva, 2005 y Rondón *et al.*, 2011). Estos hongos invaden sistémicamente la planta, las semillas en desarrollo y maduras pudiendo producir varios tipos de micotoxinas altamente tóxicas para humanos y animales (Castonguay y Couture, 1983; Malaguti, 2000).

En el ámbito nacional son pocas las referencias científicas sobre sanidad y patología de semilla de maíz, lo cual contrasta con la importancia que esta línea de trabajo tiene para el abastecimiento de SCM y la producción agroindustrial de maíz para consumo de la población. Dado que la semilla infectada es un medio eficiente de diseminación y transmisión de patógenos y esta infección puede iniciarse en el campo, es importante caracterizar la MN como fuente potencial de inóculo durante el ciclo del cultivo, por su influencia en la calidad sanitaria de las semillas producidas en los programas de certificación de semillas de maíz, para definir estrategias de manejo y control como apoyo a la sostenibilidad de este sistema en Venezuela. También es importante conocer si en las épocas de lluvia y norte-verano hay diferencias en la incidencia de patógenos en semillas producidas para determinar la mejor época de producción de semillas sana.

El objetivo general de este capítulo fue caracterizar e identificar la microbiota presente en semillas de híbridos de maíz producidas en dos épocas de siembra en el estado Aragua y los objetivos específicos fueron: (a) Identificar la MN (MT, MI) de las semillas de los parentales e híbridos estudiados, (b) Identificar la MN en suelos de lotes de producción de semilla HÍBRIDA seleccionados en dos localidades de Aragua y (c) Evaluar la incidencia de la MN en el follaje durante el desarrollo de la planta de maíz.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

En Venezuela la incidencia de enfermedades de maíz en las zonas productoras es frecuente, calculándose una reducción del 10 ó 15% del rendimiento potencial (Malaguti, 2000). Algunas de estas enfermedades contaminan la semilla, pero no son transmitidas por ellas. El inóculo potencial puede encontrarse en los residuos de cosechas, el suelo donde se desarrolla el cultivo, en malezas perennes o en hospedantes alternos pudiendo diseminarse por el viento, agua o insectos (Malaguti, 2000). El inóculo interno o dentro de la semilla da origen a la enfermedad en el campo, y el transportado sobre la semilla también es un vehículo efectivo para la diseminación e introducción de las enfermedades en nuevas regiones (Christensen y Kaufmann, 1965; ISTA, 1993).

Del inventario de las enfermedades del maíz registradas en el país, 24 son producidas por hongos (66 %), de las cuales 10 pueden ser transmitidas y seis transportadas por las semillas. Entre las transmisibles por semilla se encuentran la pudrición del tallo y la pudrición de las semillas y plántulas (*Pythium* sp., *Fusarium* sp., *F. verticillioides*, *F. culmorum*, *F. semitectum*, *F. equiseti*), el tizón del sur (*Bipolaris maydis*), la mancha marrón (*Physoderma maydis*), el mildiú lanoso o falsa punta loca (*Sclerophthora macrospora*), la pudrición de las mazorcas (*Stenocarpella maydis*), la pudrición rosada (*F. verticillioides*, *F. subglutinans*, *F. semitectum*), la pudrición roja (*F. graminearum*), granos mohosos o pudrición en almacenamiento (*Aspergillus* spp., *A. flavus*, *A. níger*, *Penicillium* spp.) y antracnosis (*Colletotrichum graminicola*). Las enfermedades transportadas por las semillas son pudrición carbonosa (*Macrophomina phaseolina*), carbón común (*Ustilago maydis*), mancha por *Curvularia* (*Curvularia* sp.), falso carbón (*Ustilaginoidea virens*), pudrición de la mazorca (*Cladosporium* sp.) y pudrición de hojas, tallos y mazorcas (*Rhizoctonia solani*) (McGee, 1988; Malaguti, 2000).

Todos los patógenos citados se han encontrado infectando la semilla de maíz, especialmente durante períodos muy húmedos para la formación de los granos. La presencia de las especies referibles a los géneros *Aspergillus* y *Fusarium* en las mazorcas es de gran significación por la producción de micotoxinas altamente tóxicas para humanos y animales. Entre las micotoxinas identificadas están las aflatoxinas producidas por *Aspergillus flavus* o *A. parasiticus*, y las fumonisinas producidas por *Fusarium verticillioides*, *F. proliferatum* y *F. anthophilum* (Munkvold y Desjardins, 1997; Mazzani, 1998; Chavarri, 2009). *F. verticillioides* es el más perjudicial en nuestras condiciones porque invade sistémicamente la planta y los granos, produciendo varios tipos de fumonisina, mientras que *F. subglutinans* produce poca o ninguna fumonisina (Malaguti, 2000; Mazzani, 2001; Da Silva, 2005).

Antolini y Garcia (1994) en estudios realizados sobre semillas de origen nacional e importadas identificaron los hongos *Aspergillus* sp., *A. flavus*, *A. níger*, *A. giganteus*, *Fusarium* sp., *F. solani*, *F. verticillioides*, *F. oxysporum*, *Penicillium* spp. y *Cladosporium* sp. observaron que la mayor incidencia en las muestras nacionales fue de *F. solani* con un 59% de incidencia, *Fusarium* sp. y *F. oxysporum* con 46%. En las muestras importadas la mayor incidencia en granos de maíz amarillo fueron *Fusarium* sp. (68%), *Penicillium* spp. (39%) y *A. flavus* (37%), mientras que en grano de maíz blanco la mayor incidencia fue *F. verticillioides* (60%). Mazzani *et al.* (2001) encontraron alta incidencia de *F. verticillioides* en granos de maíz, la incidencia entre los híbridos evaluados varió entre 26,0 y 72,0% en el estado Portuguesa y 28,7 a 55,7% en el estado Guárico. Al igual, Malaguti (2000) confirmó que en todas las muestras evaluadas, la fusariosis ocasionaba daños relevantes en la planta y la calidad del grano.

## **1. Enfermedades transmitidas por semilla**

La incidencia y transmisión de las enfermedades que infectan la semilla de maíz en Venezuela varía de acuerdo al patógeno. Dentro del género *Fusarium* hay especies

que causan pudrición de raíz, tallo, mazorca y grano, y marchitamiento en las plántulas (McLean y Berjak, 1987). Este género produce un estriado blanco y pudrición de la semilla afectando su calidad; además los granos y semillas contaminados presentan micotoxinas incluyendo moniliformina, fumonisina, zearalenona y tricotecenos, que son tóxicos para el hombre y los animales, asociadas con cáncer del esófago, infertilidad y desórdenes renales (MacDonald y Chapman, 1997). También se ha comprobado que *F. graminearum* y *F. verticillioides* son transmitidos de la semilla a la plántula (Kabeere *et al.*, 1997; Yates *et al.*, 1997; Da Silva, 2005). Adicionalmente, Lawrence *et al.* (1981) confirmaron la infección de plántulas provenientes de semillas infectadas en suelo estéril. Rheeder y Marasas (1998) encontraron que *F. verticillioides* no sobrevive en el suelo porque no produce clamidosporas, indicando que las fuentes de inóculo son el aire, las semillas o los insectos mientras que Cotten y Munkvold, (1998) demostraron que los residuos de cosecha pueden ser una fuente de inóculo a largo plazo. Munkvold *et al.* (1997) determinaron que la mayor diseminación de *F. verticillioides* es aérea, demostrando que el 75-95% de la infección de granos provino de barbas de maíz inoculadas, mientras la infección a través de la semilla vario entre 0-30%.

Los patógenos *Aspergillus* spp., *A. glaucus*, *A. níger* y *A. flavus* producen granos mohosos y pudriciones en almacenamiento. Las semillas afectadas con estos patógenos se observan decoloradas y arrugadas. Estos hongos son transmitidos por semillas, produciendo pudrición de las raíces en plántulas y puede persistir en el campo en residuos de cosechas. *Aspergillus niger* puede causar infección asintomática y sistémica en plantas de maíz (Palencia, 2012). Por su parte las especies de *Penicillium* producen granos mohosos, pudrición de granos en almacenamiento y decoloración de la semilla, pero el principal problema ocasionado por estos dos hongo es la producción de micotoxinas con efecto carcinogénico (McGee, 1988).

Singh *et al.* (1986), citan que *Bipolaris maydis* (= *Helminthosporium maydis*;

*Drechslera maydis*), afecta hojas, tallos, inflorescencias. En semillas de maíz se ha detectado en pericarpio, endospermo y punta basal, pero raramente en el escutelo y el embrión. La raza T del tizón del sur produce un moho afelpado de color negro sobre la semilla y se ha demostrado su transmisión por estas (Kommedahl y Lang, 1971). No hay evidencias de que la raza O de este patógeno se transmita por semillas, pero sobrevive bien en restos de cosecha (Gates y Bolwyn, 1972). Rao *et al.* (1985) informa que *Sclerophthora macrospora* produce el mildiú lanoso o falsa punta loca. Se ha detectado micelio y oosporas de este hongo en el pericarpio y en menor porcentaje en el embrión de semillas de maíz; también ha sido encontrado en el escutelo. Este patógeno cuando infecta a la planta madre en temprana edad, no permite la producción de semillas porque produce esterilidad de la planta. Se transmite recién cosechada, porque la infección disminuye de 60 a 0,6% en semillas almacenadas a 1°C durante siete semanas. Otras fuentes de inóculo son el suelo, malezas y conidios dispersadas por el viento (McGee, 1988).

De acuerdo a McGee (1988) *Stenocarpella maydis* (*Diplodia maydis*) afecta a toda la planta incluyendo inflorescencias y semillas, produciendo pudrición del tallo. Las semillas son una importante fuente de inóculo de esta enfermedad. También se ha demostrado la sobrevivencia en semillas y transmisión de este patógeno desde semillas infectadas de maíz al mesocotilo de plántulas y posteriormente infección de la corona y el tallo (McNew, 1937). El patógeno *Colletotrichum graminicola* produce la antracnosis en maíz y ha sido encontrado sobre semillas produciendo estrías oscuras y acérvulos. Este hongo puede sobrevivir en la superficie del suelo y sobre la semilla hasta por dos años y ser transmitido a las plántulas (Warren y Nicholson, 1975).

## **2. Enfermedades diseminadas por la semilla**

Dentro del grupo de patógenos que son transportados pero no transmitidos por la semilla de maíz se ubica *Macrophomina phaseolina*, que produce la pudrición

carbonosa. Éste hongo se ha detectado en muy bajos niveles en medios de cultivo y puede ser observado visualmente ya que produce ennegrecimiento de las semillas. *Ustilago zae* es un acompañante de la semilla en forma de esporas sueltas y produce el carbón común en maíz; las semillas infectadas se transforman en vesículas carbonosas por lo que son una fuente importante de inóculo. *Curvularia sp*, hongo que produce la mancha por *Curvularia* es asociado con la franja blanca sobre la semilla. *Ustilaginoidea virens* productor del falso carbón y ha sido señalado como transmitido por semilla pero no se han encontrado pruebas de ello. *Rhizoctonia solani* asociada con la pudrición de hojas, tallos y mazorcas en maíz, las semillas infectadas son pequeñas y arrugadas. *Physoderma maydis* produce la enfermedad denominada mancha marrón que puede afectar toda la planta de maíz en estado de plántula, desarrollo vegetativo y floración; es importante en áreas con abundantes lluvias y altas temperaturas; también se ha señalado su sobrevivencia en las semillas pero no hay evidencias de que pueda ser transmitido por esta vía (McGee, 1988).

### **3. Etapas de desarrollo del maíz**

Cuando se realizan estudios de las enfermedades de un cultivo es importante conocer la fase de desarrollo en la cual el patógeno incide ya que la susceptibilidad o la resistencia cambia con esta (Kranz, 1994). La edad y el desarrollo de un cultivo se puede registrar como el número de días a partir de la siembra (DDS) o a partir de la emergencia, pero se obtiene mayor información usando las etapas de desarrollo, las cuales son definidas de acuerdo al desarrollo fisiológico y ontogenético de la planta. Una de las clasificaciones utilizadas para identificar las etapas de desarrollo en el maíz es el sistema ideado por Hanway y Ritchie (1984) cuyos detalles se presentan en el Cuadro 1.1. Las etapas de desarrollo se dividen en dos grandes categorías: vegetativa (V) y reproductiva (R).

**Cuadro 1.1:** Etapas de desarrollo del maíz según Hanway y Ritchie (1984)

<b>Etapa</b>	<b>DDS*</b>	<b>Características</b>	<b>Etapa</b>	<b>DDS*</b>	<b>Características</b>
<b>VE</b>	5	Emergencia de plántula	<b>R1</b>	59	Etapa de sedas. Emergencia de estigmas.
<b>V1</b>	9	Visible cuello de la primera hoja.	<b>R2</b>	71	Etapa de ampolla. Granos llenos con líquido claro. Puede verse el embrión.
<b>V2</b>	12	Visible cuello de la segunda hoja.	<b>R3</b>	80	Etapa lechosa. Granos llenos con líquido lechoso.
<b>V3</b>		Visible el cuello de la tercera hoja.	<b>R4</b>	90	Etapa pastosa. Granos llenos con pasta blanca. El embrión tiene aproximadamente la mitad del ancho del grano.
<b>Vn</b>		Visible el cuello de la hoja número “n”.	<b>R5</b>	102	Etapa dentada. Parte superior de granos llena con almidón sólido.
<b>VT</b>	55	Panoja. Visible última rama de la panícula. Espiga en miniatura.	<b>R6</b>	112	Madurez fisiológica. Capa negra visible en la base del grano.

\* DDS: número aproximado de días después de la siembra en tierras bajas tropicales, donde las temperaturas máxima y mínima pueden ser de 33°C y 22°C, respectivamente. En los ambientes más fríos, se amplían estos tiempos.

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

Esta investigación se realizó sobre lotes de producción de semillas certificadas de maíz (SCM) en dos fincas ubicadas en las localidades de La Cuarta (N10° 11' 16.2", W67° 35' 13.5"; 421msnm) y Valle de Tucutunemo (10° 04' 58.1", 67° 23' 3.8"; 600 msnm) en los municipios Libertador y Zamora del estado Aragua, respectivamente.

La caracterización de la MN se hizo por medio del seguimiento de enfermedades en los progenitores de los híbridos: H-3002, sembrado en La Cuarta en época de lluvia; DANAC-3273 y Sefloarca 91 sembrados en el Valle de Tucutunemo en épocas de lluvia marzo-agosto 2007, y norte-verano bajo riego 2007-2008, respectivamente. En cada lote se marcaron parcelas de 2500 m<sup>2</sup> realizando muestreos quincenales y evaluación de enfermedades del follaje desde la siembra hasta madurez fisiológica (MAFI) en la etapa R6, continuándose con muestreo de 25 mazorcas en las etapas R6 y madurez de cosecha (MACO). Detalles del cronograma de muestreo son presentados en los Cuadros anexos 1.1, 1.2 y 1.3. Para caracterizar la MN de la semilla de los híbridos usados se realizaron las siguientes actividades: 1. Identificación de la MN en semillas de los parentales y la progenie de los híbridos de maíz evaluados. 2. Identificación de la MN en suelo de los lotes de producción de semilla seleccionados en las localidades citadas. 3. Evaluación de la incidencia de la MN en el follaje durante el desarrollo de la planta de maíz.

#### **1. Micobiota natural en semillas de parentales y progenie de los tres híbridos de maíz.**

La identificación de la MN de la semilla parental y sus progenies se realizó en el Laboratorio de Fitopatología del Departamento de Botánica Agrícola de la Facultad de Agronomía de la Universidad Central de Venezuela. Se desinfectaron 400 semillas de los parentales de los híbridos mediante inmersión en solución de hipoclorito de

sodio al 2% por tres minutos. Luego fueron enjuagadas en agua estéril, secadas y colocadas sobre el medio de cultivo agar papa dextrosa (PDA), incubándolas por 7 días a 28 °C (ISTA, 1993).

La MN en las semillas se identificó con base a las características morfológicas usando claves micológicas (Booth, 1971; Booth, 1977; CMI, 1964; Ellis, 1971; Sivanesan, 1987 y Leslie y Summerell, 2006). El diseño estadístico usado fue Completamente al Azar con cuatro repeticiones de 100 semillas cada una sembrando cinco semillas por placa. El número de semillas infectadas con uno o más patógenos fue registrado como micobiota total (MT). El número de semillas infectadas con especies de patógenos individuales fue registrado como micobiota individual (MI).

Los resultados de la micobiota presente en los parentales fueron expresados en porcentajes y sometidos a análisis de varianza para diseño completamente al azar. Para calificar la incidencia de la micobiota se utilizó la escala propuesta por Mazzani *et al.* (1999), según la cual la incidencia se califica como baja (0-15%), intermedia (16-30 %) y alta (>30 %). Los promedios fueron comparados mediante la prueba de “t” para dos muestras independientes en cada híbrido por separado utilizando el programa Statistix 8.0.

La identificación y comparación de la MN en semillas de los híbridos utilizados se realizó en la etapa de madurez fisiológica (R6) y madurez de cosecha (MACO). Fueron seleccionadas 25 mazorcas mediante el muestreo sistemático en las hileras maternas y al azar dentro de las hileras. Cada mazorca colectada fue dividida transversalmente en dos porciones (basal y apical) tomándose al azar 10 semillas para un total de 20 semillas por mazorca. Las semillas fueron desinfectadas e incubadas siguiendo idéntico procedimiento al usado para las semillas de sus parentales. Se registraron las variables MT y MI calculándose el porcentaje de semillas infectadas para cada uno de los hongos encontrados. Los resultados fueron analizados

estadísticamente mediante la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis y la correspondiente prueba de medias utilizando el programa Statistix 8.0.

## **2. Micobiota natural en suelos de campos para la producción de semilla certificada en dos localidades de Aragua.**

Para identificar el inóculo potencial de la MN en los lotes de suelo de las localidades seleccionadas, antes de la siembra, se tomaron al azar 20 muestras en los primeros 5 cm de suelo. Las muestras fueron procesadas por el método de dilución de suelo (Tuite, 1969). Se colocaron 10 g de suelo en un Erlenmeyer con 90 ml de agua destilada y estéril, agitándose mecánicamente por 10 minutos y realizando diluciones de la suspensión hasta  $10^{-3}$ . Se tomaron alícuotas de 1 ml de la dilución  $10^{-3}$ , colocándose en las placas de Petri y agregándose 10 ml de PDA acidificado con ácido láctico. Las placas fueron incubadas a temperatura ambiente por tres días, cuando se procedió al conteo e identificación de las colonias de los hongos presentes.

Los resultados de cada localidad fueron analizados estadísticamente mediante la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis y la correspondiente prueba de medias utilizando el programa Statistix 8.0. La frecuencia observada entre los géneros de hongos identificados fue comparada con la frecuencia relativa (FR) mediante la relación:  $FR (\%) = (N^{\circ} \text{ de colonias del género} / N^{\circ} \text{ total de colonias}) \times 100$ .

## **3. Micobiota Natural en el follaje de la planta maíz durante el desarrollo de la misma.**

La evaluación de la incidencia de la MN en el follaje de la planta en las distintas etapas de desarrollo (Hanway y Ritchie, 1984) se realizó mediante muestreos cada 15 días iniciados después de la siembra (DDS) (Anexos 1.1, 1.2, 1.3), seleccionando 25 puntos en las parcelas de 50 hileras en cada uno de los lotes de producción. El muestreo fue sistemático entre las hileras maternas y al azar dentro de

las hileras. Para identificar las enfermedades presentes y el número de plantas afectadas se seleccionaron 10 plantas en cada punto de muestreo registrando la incidencia como porcentaje de individuos afectados por punto (Kranz, 1994).

En los dos primeros muestreos del follaje (Anexos 1.1, 1.2, 1.3) se tomaron 20 plantas al azar, colocándose en bolsas de plástico y trasladadas al laboratorio para realizar el análisis y detectar la posible presencia asintomática de patógenos. Las evaluaciones posteriores fueron realizadas mediante la sintomatología y la caracterización de los patógenos con ayuda de material bibliográfico antes citado.

Para establecer las diferencias en la incidencia de la micobiota en el follaje entre las etapas de desarrollo del cultivo se utilizó el programa Statistix 8.0. Los datos registrados de la incidencia de *Curvularia* en el follaje de los parentales fueron transformados por la raíz cuadrada y sometidos a análisis de varianza y prueba de Tukey; la incidencia de *Bipolaris* y *Physoderma* fueron analizados con la prueba no paramétrica Kruskal Wallis y la correspondiente prueba de medias.

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 1. Micobiota natural en semillas de parentales de los tres híbridos de maíz.

La micobiota total (MT) detectada en semillas parentales de los tres híbridos: Himeca 3002, DANAC 3273 y Sefloarca 91 estuvo representada por las especies *Fusarium* spp., *Penicillium* sp. *Aspergillus* spp. (*A. niger* y *A. flavus*), *Curvularia* sp., *Acremonium* sp. y *Rhizopus* sp., agrupándose los tres últimos en la categoría *Otros* por su baja incidencia. En las semillas parentales de Sefloarca 91, *A. niger* y *A. flavus* fueron analizadas por separado debido al alto porcentaje de incidencia. Todos los géneros encontrados son transportados por las semillas, pero solo *Fusarium* spp., *Penicillium* sp. y *Aspergillus* spp. pueden ser transmitidos por las mismas (McGee, 1988; Malagtti, 2000). Estos resultados coinciden con los géneros identificados por Antolini y Garcia (1994) en semillas nacional y granos importados de maíz; y también con Da Silva (2005) quien halló que *Fusarium verticillioide* es el hongo con la mayor incidencia en semillas de maíz. Adicionalmente, se ha demostrado que *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium* producen infección sistémica en semilla de maíz (McLean y Berjak, 1987; Munkvold *et al.*, 1997) lo que genera plántulas que transmiten la infección a la siguiente generación de semillas (Mycock, 1990). En esta área, Foley (1962), Neergaard (1977), Agarwal y Sinclair (1987) informan que las semillas contaminadas con *F. verticillioides* infectan los tejidos del embrión cuando el eje embrionario se expande y se abre paso durante la germinación para ser transmitida sistémicamente a través de la planta de maíz y las nuevas semillas. Todos estos resultados corroboran el peligro potencial que se presenta al utilizar semillas infectadas con estos hongos.

El Cuadro Anexo 1.4, presenta el Análisis de varianza para la incidencia de micobiota total (MT) e individual (MI) detectadas en la semilla parental de cada uno de los híbridos evaluados. La MT mostró diferencias altamente significativas para los padres de Himeca 3002, DANAC 3273 y Sefloarca 91. En cuanto a MI todos los

híbridos muestran diferencias altas para *Fusarium* y *Penicilium*, pero sin diferencias estadísticas para *A. niger*, *A.flavus* y “Otros” patógenos registrados, mientras que los padres del Sefloarca 91 presentaron máximas diferencias estadísticas para toda la MI excepto para la clase de *Otros*.

Los promedios de incidencia de MT y MI en la semilla parental de los tres híbridos utilizados para producir la semilla certificada de maíz (SCM) en las dos localidades seleccionadas y dos épocas de siembra del estado Aragua se muestran en el cuadro 1.2. Este Cuadro también muestra que la MT está compuesta principalmente por *Fusarium* spp., *Penicillium* sp., *Aspergillus flavus* y *A. niger*, con altos porcentaje de incidencia que varían entre 52 y 98 %, de los cuales las máximas incidencias corresponden a la semilla materna, hecho que facilitaría su alta capacidad de transmisión y transporte de inóculo potencial de enfermedades a otros campos y zonas de producción de semillas y granos de maíz (Christensen y Kaufmann, 1965). Adicionalmente, *Fusarium* spp., *Penicillium* sp. y *Aspergillus* spp. son muy importantes por su riesgo epidemiológico y producción de toxinas que afectan la salud animal y humana (McGee, 1988; MacDonald y Chapman, 1997; Munkvold y Desjardins, 1997; Mazzani, 1998; Mazzani *et al.*, 2000; Malaguti 2000).

Respecto a los niveles de infección por MI el Cuadro 1.2 también indica que *Fusarium* spp. es el principal patógeno de la micobiota identificada, porque su incidencia varía entre 36,50 y 63,75 % en la semilla paternas de los tres híbridos evaluados, y entre 40,25 y 71,50 % para la semilla de las madres, resultados que corroboran los obtenidos por Antolini y Garcia (1994), Malaguti (2000), Mazzani *et al.* (2001) y Da Silva (2005). La incidencia de *Penicillium* sp. varió entre 0,25 y 30 %, siendo notable que dos de las tres madres presentaron infecciones superiores a las registradas para semilla de los padres. Este hallazgo confirma la importancia de la sanidad de la semilla materna en la dispersión o transmisión de inóculo de enfermedades hacia otras áreas de producción de grano o semilla de maíz por la semilla proveniente de madres infectadas.

**Cuadro 1.2.** Promedios de incidencia de micobiota total (MT) e individual (MI) en semilla parental (P) de los híbridos sembrados en dos localidades y dos épocas de siembra en el estado Aragua.

Híbrido	P	Promedio de incidencia (%)					
		MT	MI				
			<i>Fusarium</i>	<i>Penicillium</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. flavus</i>	Otros <sup>(2)</sup>
Himeca 3002	Padre	65,00 a	61,75 b	0,25 a	0,66 <sup>(1)</sup> a	3,10a	
	Madre	71,75 b	45,75 a	30,00 b	1,68 <sup>(1)</sup> a	0,87a	
DANAC 3273	Padre	65,00 a	63,75 a	0,50 a	1,53 <sup>(1)</sup> a	2,50 a	
	Madre	80,25 b	71,50 b	16,50 b	0,72 <sup>(1)</sup> a	6,25 b	
Sefloarca 91	Padre	52,25 a	36,50 a	7,00b	3,25 a	8,25 a	0,98 a
	Madre	98,25 b	40,25 b	1,75 a	21,00 b	82,75 b	0,57 a

Medias con diferente letra difieren significativamente entre si a  $P < 0,05$  según las Pruebas de 't' para dos muestras independientes. <sup>(1)</sup>Promedio de *A. niger* y *A. flavus*. <sup>(2)</sup>*Curvularia*, *Acremonium* y *Rhizopus*.

Para *Aspergillus* spp. no hubo diferencias significativas entre los padres de Himeca 3002 y DANAC 3273, los porcentajes encontrados de las dos especies identificadas (*A. niger* y *A. flavus*) fueron agrupadas para el análisis; en los parentales del híbrido Sefloarca 91 se mantuvieron separadas las dos especies detectándose diferencias significativas, siendo mayor la incidencia en las semillas de las plantas madres. El Cuadro 1.2 sugiere que la alta incidencia de MT y MI comprometería seriamente la calidad sanitaria de la semilla a producir y confirma su papel como potencial trasmisora de enfermedades al cultivo. Tal riesgo es mayor al considerar que la infección de la semilla madre podría desarrollar semillas infectadas facilitando su capacidad de transmisión sistémica de los géneros *Fusarium*, *Penicillium* y *Aspergillus*, tal como señalan los resultados de Mc Lean y Berjak (1987); Bacon y Hinton (1996) y Palencia *et al.* (2010). Adicionalmente, Munkvold y Desjardins (1997) y Kedera *et al.* (1992) confirmaron que *F. moniliforme* (= *F. verticillioides*) puede infectar plantas de maíz y desarrollarse sistémicamente sin causar síntomas y que tales infecciones pueden llegar a las semillas. Basak y Lee (2002) trabajando con transmisión de patógenos de la semilla de maíz a la plántula, encontraron que el mayor porcentaje de transmisión fue *F. moniliforme* y el menor *Penicillium*.

## **2. Micobiota natural en suelos de campos para la producción de semilla certificada en dos localidades de Aragua.**

La mayor incidencia de micobiota registrada en las muestras de suelo tomadas en los tres lotes de producción utilizados correspondió a los géneros de *Aspergillus* y *Penicillium*. Estos resultados confirman que el suelo y las semillas son una fuente de inóculo primario importante para estos géneros, tal como lo informan los trabajos de Diener *et al.* (1987) y Mycock (1990) quienes señalan que conidios y esclerocios de *A. flavus* son aislados frecuentemente del suelo y de la superficie de la semillas.

La baja incidencia de los géneros *Curvularia*, *Trichoderma*, *Cladosporium*, *Rhizopus*, y *Chaetomium* permitió su agrupación en la categoría “*Otros*” junto con hongos no identificados porque no presentaron esporulación.

El Cuadro Anexo 1.5 presenta la prueba de Kruskal-Wallis para el efecto de muestreo de suelo y épocas de siembra en dos localidades con diferencias significativas para *Aspergillus* y *Otros* en muestras de suelo de la localidad de La Cuarta, lo que sugiere una distribución desigual del inóculo en el suelo utilizado. *Penicillium* no mostró diferencia entre las muestras. En el valle de Tucutunemo no se encontraron diferencias para el efecto de muestreo de suelo en ninguna de las dos épocas, por lo que se puede decir que hay una distribución más homogénea de la micobiota en los lotes de terreno.

El Cuadro 1.3 indica que la mayor cantidad de unidades de formación de colonias (UFC/g) de la MN registrada en el suelo correspondió a la localidad la Cuarta en época de lluvia, mientras que en el Valle de Tucutunemo, la cantidad de inóculo potencial para la MN allí detectada fue estadísticamente mayor en la época de lluvia comparada con la de norte-verano, lo cual confirma que la mayor capacidad de infección al cultivo de maíz ocurre durante las lluvias en comparación con la época

de norte-verano. Estos resultados coinciden con los citados por Orpurt y Curtis (1957), Wong (1975), Jhonson y Gutierrez-Correa (1985) y Horn (2003), quienes señalan que hay una correlación positiva entre la población de hongos y la humedad del suelo característica de la época de lluvias.

**Cuadro 1.3** Inóculo potencial (UFC/g)<sup>(1)</sup> de micobiota natural en dos lotes de suelo, dos épocas de siembra y dos localidades del estado Aragua.

Localidad	Épocas de siembra	<i>Aspergillus</i>	<i>Penicillium</i>	Otro <sup>(2)</sup>
La Cuarta	Lluvia	2,90 x 10 <sup>3</sup>	2,03 x 10 <sup>3</sup>	3,98 x 10 <sup>3</sup>
Valle de Tucutunemo	Lluvia	1,15 x 10 <sup>3</sup> a	1,85 x 10 <sup>3</sup> a	5,35 x 10 <sup>3</sup> a
	Norte-verano	0,8 x 10 <sup>3</sup> b	1,50 x 10 <sup>3</sup> a	2,55 x 10 <sup>3</sup> b

<sup>(1)</sup>Unidades formadoras de colonias de hongos. <sup>(2)</sup>Micobiota con menor frecuencia y sin esporulación. Medias con diferente letra difieren significativamente entre si a P < 0,05 según las Pruebas de 't' para dos muestras independientes.

El Cuadro 1.4 presenta el porcentaje de incidencia de la micobiota individual registrada en el suelo de las localidades y épocas de siembra evaluadas. Se observa que la mayor incidencia de micobiota en el suelo corresponde a los hongos *Penicillium* y *Aspergillus* resultados que son coincidentes con los de Diener *et al.* (1987), McGee (1988) y Horn (2003) quienes señalan que las mayores fuentes de inóculo de estos hongos son el suelo, residuos de plantas y el aire; las esporas son transportadas a las mazorcas por insectos o el viento donde germinan e infectan los granos de maíz. Y en relación a la incidencia de *Aspergillus*, Bennett (2010) cita que sus esporas se encuentran entre las estructuras fúngicas más abundantes en el aire, dispersándose a cortas y largas distancias; mientras que Wicklow y Wilson (1986) informan que esclerocios *Aspergillus* ubicados en la superficie del suelo germinan ocho días antes de la emisión de los estigmas produciendo conidios que infectan el maíz.

En el Cuadro 1.4 la ausencia de *Fusarium* sugiere que los suelos de las localidades y épocas de siembra referidas no son una fuente de inóculo potencial para

este patógeno. Este resultado coincide con la investigación de Leslie *et al...* (1990) quienes observaron que *F. moniliforme*, *F. proliferatum* y *F. subglutinans*, fueron comunes en tejidos del maíz, pero no en rastrojos de cosecha o muestras de suelo, probablemente porque según Rheeder y Marasas (1998) este hongo no sobrevive porque no produce clamidosporas. Respecto a *Curvularia*, hongo agrupado en la categoría *Otros*, es señalado como patógeno causante de la mancha foliar del maíz (White, 1999) con alta incidencia y daños menores, aun cuando sus esporas pueden ser diseminadas con la semilla según Malaguti (2000). En esta categoría también se incluyen a *Trichoderma*, *Cladosporium*, *Rhizopus*, *Chaetomium* y otros saprofitos que no desarrollaron estructuras que permitieran su identificación; y no han sido señalados como potenciales patógenos de la planta en ninguno de sus estados de desarrollo.

**Cuadro 1.4.** Porcentaje de incidencia de micobiota en suelos de dos localidades y épocas de siembra en el estado Aragua.

MN	La Cuarta	Valle de Tucutunemo	
	Lluvia	Lluvia	Norte-verano
<i>Aspergillus</i>	32,58	14,80	16,36
<i>Penicillium</i>	22,76	23,46	32,28
<i>Otros</i> <sup>(1)</sup>	44,66	61,74	51,36

<sup>(1)</sup> Micobiota menos frecuente y sin esporulación

### 3 Micobiota natural en el follaje de la planta maíz durante el desarrollo de la misma.

Los Cuadros Anexos 1.1, 1.2 y 1.3 detallan los cronogramas de muestreo en campo durante las etapas de desarrollo vegetativo y reproductivo de los tres híbridos utilizados para producir la SCM evaluada en esta investigación. Durante los dos primeros muestreos realizados en plántulas de los parentales de los híbridos sembrados en la Cuarta (LC) y en el Valle de Tucutunemo (VDT) no se detectó presencia de *Fusarium*, *Aspergillus* y *Penicillium*, hongos categorizados como endófitos en maíz según Castonguay y Couture (1983); Malaguti (2000) y Palencia *et*

*al.* (2010). Respecto a la ausencia de la micobiota citada, la autora de este trabajo coincide con la opinión de Oren *et al.* (2003) quien sustenta que en esta etapa solo hay trazas de micelio de *F. verticillioides* en los tejidos de plántulas por encima del suelo, lo que explicaría la presencia o ausencia de micobiota en diferentes estudios.

En las evaluaciones quincenales del follaje de las plantas madres, a partir del tercer muestreo hasta la maduración del cultivo se detectó presencia de micobiota en follaje de plantas en etapas reproductivas. Las plantas madres de los tres híbridos presentaron la mancha por *Curvularia* (*Curvularia* sp.). El tizón del sur (*Bipolaris* sp.) y la mancha parda (*Physoderma* sp.) se presentaron en el follaje de los híbridos Himeca 3002 y Sefloarca 91 respectivamente. Según McGee (1988), *Bipolaris* es un hongo que puede ser transportado en la semilla y transmitido a la nueva plántula, mientras que *Curvularia* y *Physoderma* solo son transportados por la semilla.

La incidencia de *Curvularia* presentó diferencias altamente significativas entre los ED de los híbridos DANAC 3273 y Sefloarca 91, mientras que no hubo diferencias para el Himeca 3002. La incidencia de *Bipolaris* en el Himeca 3002 presentó diferencias significativas, mientras que *Physoderma* en Sefloarca 91 no presentó diferencias (cuadro Anexo 1.6)

El Cuadro 1.5 presenta la comparación de los promedios de incidencia de *Curvularia*, *Bipolaris* y *Physoderma* durante las ED reproductivo de los tres híbridos sembrados en dos localidades y dos épocas de siembra del estado Aragua. Independientemente de la significación estadística para los promedios presentados en este Cuadro 1.5 es notable que la infección por *Curvularia* en el híbrido DANAC 3273 está presente desde la etapa de sedas (R1), al inicio del periodo reproductivo y aumenta su incidencia durante las etapas R2, R3, R4 y R5 que comprenden la formación y maduración de la mazorca y semillas. En las etapas pastoso (R4) y dentado (R5) no se detectan diferencias en la incidencia del hongo siendo mayor que en las otras etapas. *Bipolaris* se presentó en las últimas etapas del desarrollo

reproductivo siendo la incidencia promedio mayor en la etapa de grano dentado (R5). Al analizar la incidencia de la mancha por *Physoderma* no se encontraron diferencias entre las etapas de desarrollo por lo que se puede decir que fue igual durante todo el crecimiento reproductivo de las plantas de maíz.

**Cuadro 1.5:** Incidencia promedio (%) de *Curvularia*, *Helminthosporium* y *Physoderma* en el follaje de plantas en desarrollo de tres híbridos sembrados en dos épocas de siembra y dos localidades del estado Aragua.

Híbrido	Etapa de desarrollo	Promedio de Incidencia de micobiota en follaje de maíz en desarrollo		
		<i>Curvularia</i>	<i>Bipolaris</i>	<i>Physoderma</i>
Himeca 3002	Pastoso (R4)	3,24 a	0.16 b	-
	Dentada (R5)	3,64 a	3.84 a	-
DANAC 3273	Sedas (R1)	3.92 b	-	-
	Ampolla (R2)	4.04 b	-	-
	Lechosa (R3)	3.16 b	-	-
	Pastoso (R4)	6.32 a	-	-
	Dentado (R5)	6.12 a	-	-
Sefloarca 91	Ampolla (R2)	2,60 c	-	1,16 a
	Lechosa (R3)	3,48 a b	-	0,76 a
	Pastoso (R4)	4,00 a	-	1,00 a
	Dentado (R5)	2,92 b c	-	1,00 a

Medias con diferente letra difieren significativamente entre si a  $P < 0,05$

En el follaje de las plantas de los tres híbridos sembrados en las dos localidades y épocas de siembra se observó la mancha por *Curvularia* durante las etapas reproductivas del cultivo, con baja incidencia e intensidad de daño, coincidente con lo expresado por Malaguti (2000). Este hongo también fue encontrado en las muestras de suelo en ambas localidades confirmando lo señalado por McGee (1988) sobre la capacidad de este patógeno para sobrevivir en el suelo y ser transportado en la semilla sin que haya evidencias de su transmisión por las mismas. El patógeno *Bipolaris* sp. señalado por McGee (1988) como transmitido y transportado por semillas, fue identificado en follaje del híbrido Himeca 3002 sembrado en LC en época de lluvia. Mientras que *Physoderma* sp., agente causal de la mancha marrón, señalada por

McGee (1988) como enfermedad transportada, pero no transmitida por la semilla fue aislada del híbrido Sefloarca 91, sembrado en el VDT en época de norte-verano bajo riego. Aun cuando ambas enfermedades se presentaron con muy baja incidencia, estos resultados confirman los obtenidos por McGee (1988) en maíz en cuanto a la importancia de infecciones tempranas.

#### **4 Micobiota natural en semilla madura de los híbridos de maíz evaluados.**

Semillas en estado de madurez fisiológica (R6) y madurez de cosecha (MACO) de los tres híbridos de maíz presentaron muy alta incidencia de infecciones de micobiota debida a *Fusarium verticillioides*, *F. proliferatum*, *Penicillium* sp., *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *Acremonium* sp., *Rhizopus* sp. y varios hongos no identificados por ausencia de estructuras reproductivas. Tales resultados coinciden con los de Antolini y Garcia (1994), Mazzani *et al.* (2000), Mazzani *et al.* (2001), Luzon *et al.* (2003), DaSilva (2005), quienes indicaron que los géneros *Fusarium*, *Aspergillus* y *Penicillium* son frecuentes en semillas y granos de maíz con preponderancia de *Fusarium*, seguido por *Aspergillus* y *Penicillium*.

El Cuadro Anexo 1.7 muestra los resultados de la prueba de Kruskal-Wallis para comparar la incidencia de MT y MI de semillas en etapas R6 y MACO de los tres híbridos producidas en dos localidades y dos épocas de siembra en el estado Aragua. Allí se observa que se encontraron diferencias significativas para incidencia de MT, *Fusarium* y *Penicillium*, pero no hubo diferencias para *Aspergillus* y Otros hongos. Tampoco se encontraron diferencias estadísticas entre la micobiota presente en la parte apical y basal de la mazorca, lo que demuestra que la magnitud de infecciones en semillas o granos de maíz es independiente de su ubicación dentro de la mazorca.

La incidencia promedio para la micobiota en las semillas de los tres híbridos durante las etapas de madurez fisiológica (MAFI o R6) y madurez de cosecha

(MACO) se presenta en el Cuadro 1.6. En la etapa de MAFI las mayores incidencias de MT y MI correspondieron a los híbridos Himeca 3002 seguido por DANAC 3273 ambos sembrados en época de lluvia; mientras que para el Sefloarca 91, sembrado en época de norte verano, la incidencia fue menor. Estos resultados nos indican que las infecciones de las semillas en MAFI es menor en la época de norte verano.

**Cuadro 1.6.** Incidencia promedio (%) de micobiota total e individual, durante las etapas de madurez fisiológica (R6) y madurez de cosecha (MACO) de semilla de maíz producida en dos épocas de siembra y dos localidades del estado Aragua.

		Promedios de incidencia de MT y MI (%)									
Híbrido	ED	MT		MI							
				<i>Fusarium</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Otros</i> <sup>(1)</sup>				
Himeca 3002	R6	71,8	b	67,6	b	4,0	b	2,0	a	5,6	a
	MACO	94,0	a	79,2	a	23,0	a	0,6	a	8,4	a
DANAC 3273	R6	22,6	b	19,4	b	0,4	b	1,2	a	1,4	a
	MACO	98,8	a	85,0	a	28,6	a	0,0	a	3,4	a
Sefloarca 91	R6	8,4	b	6,0	b	0,2	b	0,0	a	3,0	a
	MACO	94,4	a	83,0	a	20,4	a	0,0	a	0,4	a

Medias con diferente letra difieren significativamente a  $P < 0,05$ ; <sup>(1)</sup> *Acremonium*, *Rhizopus* y otros hongos sin esporulación.

En la etapa de MACO la incidencia de MT y MI resultó significativamente mayor que en MAFI, indicando que retardos en la cosecha afecta la calidad sanitaria de la semilla por el importante incremento de la incidencia de micobiota total e individual, lo que confirma los resultados de Siriacha *et al.* (1994) y Bush *et al.* (2004) respecto al aumento de la infección de semillas de maíz al aproximarse la MAFI con incrementos significativos hasta realizar la cosecha efectiva en MACO. Esta situación confirma la recomendación de Cerovich (1997), Cerovich y Miranda (2001) sobre la conveniencia de realizar una cosecha temprana de la semilla madura como una estrategia de control de infecciones por micobiota y preservación de la calidad integral de la semilla producida. Al analizar la incidencia de MT y MI en semilla de los tres híbridos cosechado en la etapa de MACO se observa que fue alta, y sin diferencias significativas entre híbridos, hallazgo que coincide con los resultados

de Da Silva (2005) quien tampoco encontró diferencias en la infección de semillas de maíz producidas en las dos épocas de siembra principales del país.

## V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.

1. La semilla certificada de maíz producida en Aragua presenta una microbiota natural de carácter endémico, alta incidencia y variada composición de hongos, entre los que destacan *Fusarium* sp. *Penicillium* sp. y *Aspergillus* sp. por su alto potencial epidemiológico en plantas y animales.
2. La calidad sanitaria de la SCM comercializada es consecuencia del inóculo endémico de los componentes bióticos participantes en el ciclo de producción, a saber: la semilla genética de los parentales de los híbridos utilizados; suelos, localidades, épocas de siembra y ambientes utilizados, plantas madres infectadas en fases de desarrollo vegetativo y reproductivo, con crecientes niveles de incidencia en semillas maduras hasta su cosecha.
3. Se recomienda el desarrollo de investigaciones complementarias para caracterizar el riesgo epidemiológico y ambiental asociado con la producción, distribución y uso de SCM con los perfiles sanitarios encontrados y explorar nuevas zonas de producción con menor presión de inóculo potencial de microbiota que afecte la calidad sanitaria de las SCM a producir.

## VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGARWAL, V.K. y SINCLAIR, J.B. 1987. Principles of Seed Pathology, Vol 1 and 2, CRC Press, Florida.
- ANTOLINI, J. y C. GARCÍA. 1994. Micoflora en semillas de híbridos nacionales y granos de maíz (*Zea mays* L.) importado. II festival Nacional del maíz Jornada Científica. Guanare. VE
- BACON, C. W. y HINTON, D. M. 1996. Symptomless endophytic colonization of maize by *Fusarium moniliforme*. *Canadian Journal of Botany*, 74(8), 1195-1202.
- BASAK, A. B., y LEE, M. W. 2002. Prevalence and transmission of seed-borne fungi of maize grown in a farm of Korea. *Mycobiology*, 30(1), 47-50.
- BENNETT J.W. 2010. An overview of the genus *Aspergillus*. In: *Aspergillus: Molecular Biology and Genomics*. (Machida M, Gomi K, eds) Caister Academic Press, Portland: 1–17.
- BOOTH, C. 1971. The genus *Fusarium*. Kew, Surrey, England, Commonwealth Mycologicals Institute. 237 p.
- BOOTH, C. 1977. *Fusarium Laboratory Guide to The Identification of the Major Species*. Kew, Surrey, England, Commonwealth Mycologicals Institute. 58 p.
- BUSH, B- J; M. L. CARSON; M. A. CUBETA; W. M. HAGLER y G. A. PAYNE. 2004. Infection and Fumonisin Production by *Fusarium verticillioides* in Developing maize kernels *Phytopathology*; 94: 1(88-93); ProQuest Biology Journals
- CASTONGUAY, Y. y L. COUTURE. 1983. Epidemiologie de la contamination des grains de céréales par les *Fusarium* spp. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 5 (4): 222-228.
- CEROVICH, M. 1997. Estrategias de control de calidad en el sistema de semillas. En Curso de Tecnología de semillas para la competitividad agrícola. XIII Jornadas Agronómicas. Julio 11 y 12. Maracay. Venezuela.
- CEROVICH, M. y F. MIRANDA. 2001. Sanidad de semillas: componente básico de la calidad de semilla. In: Curso de Patología de Semillas. XVII Congreso de Fitopatología de Semillas. Maracay, Ven. Universidad Central. Facultad de Agronomía. 17 pp.

- CHAVARRI, M.; C. MAZZANI. O. LUZÓN; C. GONZÁLEZ; J. ALEZONES y M. J. GARRIDO. 2009. Mohos toxigénicos y micotoxinas en maíz de grano blanco cosechado bajo riego en los estados Yaracauy y Portuguesa, Venezuela. *Fitopatol. Venez.* 22: 2– 7.
- CHRISTENSEN, C. y H. KAUFMANN. 1965. Deterioration of stores grains by fungi. *Annual Review of Phytopathology* 3: 69 – 84.
- COMMONWEALTH MYCOLOGICAL INSTITUTE (CMI). 1964. *Gibberella fujikuroi*. Descriptions of pathogenic fungi and bacteria. Set. 3 No 22 Kew, Surrey, England
- COTTEN, T. K., y MUNKVOLD, G. P. 1998. Survival of *Fusarium moniliforme*, *F. proliferatum*, and *F. subglutinans* in maize stalk residue. *Phytopathology* 88:550-555.
- DA SILVA, L. 2005. Detección, identificación, ubicación y transmisión de especies de *Fusarium* en semillas de maíz (*Zea mays* L.) Tesis Magíster Scientiarum en Agronomía. UCV- Maracay. VE. 94 p.
- DIENER, U. L., R. J. COLE, T. H. SANDERS, G. A. PAYNE, L. S. LEE, y M. A. KLICH. 1987. Epidemiology of aflatoxin formation by *Aspergillus flavus*. *Annu. Rev. Phytopathol.* 25:249-270.
- ELLIS, M.B. 1971. *Dematiaceous Hyphomycetes*, Commonwealth Mycological Institute. Kew, Surrey, England,
- FOLEY, D.C. 1962. Systemic infection of corn by *Fusarium moniliforme*. *Phytopathology*, 52: 870 - 872.
- FEDEAGRO. 2015. Estadísticas Agropecuarias (en línea: [www.fedeagro.org.ve](http://www.fedeagro.org.ve)).
- GATES L.F. y B. BOLWYN. 1972. Southern leaf blight of corn in southwestern Ontario in 1971. *Can. Plant Dis. Surv.* 52(2):64-69
- HANWAY, J. J. y S.W. RITCHIE. 1984. How a corn plant develops: Special report N° 48. Iowa State University
- HORN, B. W. 2003. Ecology and population biology of aflatoxigenic fungi in soil. *Toxin Reviews*, 22(2-3), 351-379.
- INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION (ISTA). 1993. International Rules for Seed Testing. Seed science and Tecnology. Supplement 21. 288 p.

- JHONCON, J., y GUTIERREZ-CORREA, M. 1985. Ecología de *Penicillium* en los suelos de las lomas de Lachay (Perú). 2. Distribucion.
- KABEERE, F.; J. G. HAMPTON y M. J. HILL. 1997. Transmission of *Fusarium graminearum* (Schwabe) from maize seeds to seedling. *Seed Sci. AND Technol.*, 25: 245-252.
- KEDERA, C. J.; LESLIE, J.F. y CLAFLIN, L. E. 1992. Systemic infection of corn by *Fusarium moniliforme* (Abstr). *Phytopathology* 82: 1138
- KHOSRAVI, A. R.; M. MANSOURI; A. R. BAHONAR y H. SHOKRI. 2007. Mycoflora of maize harvested from Iran and imported maize. *Pakistan journal of biological sciences: PJBS*, 10(24), 4432-4437.
- KRANZ, J. 1994. Técnicas adecuadas de monitoreo. In: Krantz, J; Theunissen, J.; Beckeraterink, S (Comp.). *Vigilancia y pronósticos en la protección vegetal*. Deutsche Stiftung Für Internationale Entwicklung (DSE). Zentralstelle Für Ernährung und Landwirtschaft (ZEL). Dr. Bruno Schuler. República Federal de Alemania.
- KOMMEDAHL, T y D. S. LANG. 1971. Seedling wilt of corn from kernels naturally infected with *Helminthosporium maydis* in Minnesota. *Plant Disease Reporter*, 55: 371-373.
- LAWRENCE, E. B., P. E. NELSON y J. E. AYERS. 1981. Histopathology of sweet corn seed and plants infected with *Fusarium moniliforme* and *F. oxysporum*. *Phytopathology* 71:379-386.
- LESLIE, J.F; C.A.S. PEARSON; P.E. NELSON y T.A. TOUSSOUN. 1990. *Fusarium* spp. from corn, sorghum, and soybean fields in the central and eastern United States. *Phytopathology* 80: 343-350
- LESLIE, J.F. y SUMMERELL, B.A. 2006. *The Fusarium laboratory manual*. Sydney. Blackwell, 388 p.
- LUZÓN, O., MARTÍNEZ, A., MAZZANI, C., BARRIENTOS, V. y FIGUEROA, R. 2003. Comportamiento de genotipos de maíz de grano amarillo ante *Fusarium moniliforme* y las fumonisinas en dos localidades de Venezuela. *Fitopatología Venezolana* 16: 17-21.
- MACDONALD, M. V. y R. CHAPMAN. 1997. The incidence of *Fusarium moniliforme* on maize from Central America, Africa and Asia during 1992-1995. *Plant Pathology* 46(1):112-125

- MALAGUTI, G. 2000. Enfermedades del maíz en Venezuela. In: El maíz en Venezuela. H. Fontana y C. González (Compiladores). Fundación Polar. p 363-405
- MAZZANI, C. 1998. Incidencia de *Aspergillus flavus*, *Fusarium moniliforme*, aflatoxinas y fumonisinas en los granos de híbridos de maíz (*Zea mays* L.) en Venezuela. Tesis Doctoral. Maracay, Venezuela. Universidad Central de Venezuela. 121 pp.
- MAZZANI, C. y O. BORGES. 1993. *Fusarium moniliforme*, importante especie de hongo en granos de maíz (*Zea mays* L.) en Venezuela. Memoria XIII Congreso Venezolano de Fitopatología
- MAZZANI, C.; O. BORGES; O. LUZÓN; V. BARRIENTOS y P. QUIJADA. 1999. Incidencia de *Aspergillus flavus*, *Fusarium moniliforme*, aflatoxinas y fumonisinas en ensayos de híbridos de maíz en Venezuela. Fitopatol. Venez. 12: 9-13.
- MAZZANI, C.; O. BORGES; O. LUZÓN; V. BARRIENTOS y P. QUIJADA. 2000. *Fusarium moniliforme*, fumonisinas y *Aspergillus flavus* en granos de híbridos de maíz en el estado Guárico, Venezuela. Rev. Fac. Agron. 17: 185-195
- MAZZANI, C.; O. BORGES; O. LUZÓN; V. BARRIENTOS y P. QUIJADA. 2001. Occurrence of *fusarium moniliforme* and fumonisins in kernels of maize hybrids in Venezuela. Brazilian Journal of Microbiology 32:345-349
- MCGEE, D.C. 1988. Maize diseases. A reference source for seed technologists. St. Paul, Minnesota, US. P. 149.
- MCLEAN, M. y P. BERJAK. 1987. Maize grains and their associated mycoflora – a micro- ecological consideration. Seed Sci and Technology 15(3):831-850.
- MCNEW, G. L. 1937. Crown infection of corn by *Diplodia zae*. Iowa Agriculture Experimental Station Research Bulletin.
- MUNKVOLD, G. P., y A. E. DESJARDINS. 1997. Fumonisins in Maize Can we reduce their occurrence? Plant Disease, 81 (6): 556-565.
- MUNKVOLD, G. P.; D. C. MCGEE y W. M. CARLTON. 1997. Importance of different pathways for maize kernel infection by *Fusarium moniliforme*. Phytopathology. 87: 209-217.
- MYCOCK, D. J. 1990. A study of some of the inter-relationships between maize and the seed storage fungi as typified by *Aspergillus flavus* var. *columnaris*. University of Natal. 482 páginas

- NEERGAARD, P. 1977. Seed Pathology Vol 1 and 2. MacMillan Press, London.
- ORPURT, P. A., y J. T. CURTIS. 1957. Soil microfungi in relation to the prairie continuum in Wisconsin. *Ecology*, 628-637.
- OREN, L; EZRATI, S; COHEN, D; y SHARON, A. 2003. Early events in the *Fusarium verticillioides*-maize interaction characterized by using a green fluorescent protein-expressing transgenic isolate. *Applied and environmental microbiology* 69 (3):1695-1701
- PALENCIA, E. R.; D. M. HINTON y C. W. BACON. 2010. The black *Aspergillus* species of maize and peanuts and their potential for mycotoxin production. *Toxins* 2:399-416
- PALENCIA, E. R. 2012. *Endophytic Associations of Species in the Aspergillus Section Nigri with Maize (Zea Mays) and Peanut (Arachis Hypogea) Hosts, and Their Mycotoxins*. Tesis Doctoral. University of Georgia.
- RAO, B; H. S. MURALIDHARA; H. S. PRAKASH; SHETTY y K. M. SAFEEULLA. 1985. Downy mildew inoculum in maize seeds: techniques to detect seed-borne inoculum of *Peronosclerospora sorghi* in maize. *Seed Sci AND Technol.*, 13: 593-600.
- RHEEDER J.P. y W.F.O. MARASAS. 1998. *Fusarium* species from plant debris associated with soils from maize production areas in the Transkei region of South Africa *Mycopathologia* 143: 113–119.
- RONDON, M., M. CHAVARRI, A. CAPOBIANCO y C. MAZZANI. 2011. Mohos asociados al maíz blanco (*Zea mays*) de cosecha procedente del estados Guárico. Sociedad Venezolana de fitopatología. XXII congreso venezolano de fitopatología. Trujillo, 08 al 11 de noviembre de 2011. Resúmenes. *Fitopatol. Venez.* 24 (2): 65
- SINGH, K, T.; D. SINGH; K. SINGH; T. SINGH; SINGH y D. SINGH. 1986. Histopathology of *Drechslera maydis* infected maize kernels from tribal areas of Rajasthan. *Indian Phytopathology*, 39: 432-434.
- SIRIACHA, P.; P. TONBOONEK; A. WONGURAI; y S. KOSITCHAROENKUL. 1994. Preharvest contamination of maize by *Aspergillus flavus* In: Highley, E.; Wright, E.J.; Banks, H.J.; Champ, B.R. (Eds.), *Stored Product Protection, Proceedings of the 6th International Working Conference on Stored-Product Protection, 17-23 April 1994, Canberra, Australia*. CAB International, Wallingford, United Kingdom. <http://spiru.cgahr.ksu.edu/proj/iwcp/6.html>

- SIVANESAN, A. 1987. Graminicolous species of bipolaris, curvularia, drechslera, exserohilum and their Teleomorphs. Mycological Papers, No 158. C.A.B. International Mycological Institute. 261 p.
- TUITE, J. 1969. Plant pathological methods fungi and bacteria. Miss. Burgess Public.Co. Minneapolis, Minnesota. 239 p.
- WARREN, H. L. y R. L. NICHOLSON. 1975. Kernel infection, seedling blight and wilt of maize caused by *Colletotrichum graminicola*. Phytopathology 65: 620-623.
- WHITE, D. G. 1999. Compendium of Corn Diseases 3<sup>rd</sup> Edition. D. G. White ed. APS Press. St. Paul, MN.
- WICKLOW D.T. y D.M. WILSON. 1986. Germination of *Aspergillus flavus* sclerotia in a Georgia maize field. Trans Br. Mycol Soc. 87: 651-653. (En línea: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0007153686801103>)
- WONG, M. H. 1975. Some edaphic factors influencing the distribution of the soil fungi. *Int J Ecol Environ Sci*.
- YATES, I. E., C. W. BACON y D. M. HINTON. 1997. Effects of endophytic infection by *Fusarium moniliforme* on corn growth and cellular morphology. Plant Disease. 81: 723-728.

## **VII. ANEXOS CAPITULO I**

**Cuadro Anexo 1.1.** Cronograma de muestreos para el híbrido Himeca 3002 (Abril - Agosto 2007)

Muestreos	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Etapas de desarrollo	VE	VE	VE	VE	VT	R1	R2	R3	R4	R5	R6	MACO
Días Después de Siembra (DDS)	0	14	28	42	56	70	77	84	91	98	105	126
Días Después de la Aparición del estigma (DDAE)						0	7	14	21	28	35	64
Muestreo suelo		11/04										
Siembra de hembra	28/03											
Siembra de macho	04/04											
Follaje de Planta		11/04	25/04	9/05	23/5	06/06	13/06	20/06	27/06	04/07	11/07	
Espiga en Miniatura					23/5							
Salida de los Estigmas y Fecundación						06/06						
Emisión de Polen						06/06						
Estado de Ampolla							13/06					
Grano Lechoso								20/06				
Grano pastoso-dentado									27/06	04/07		
Madurez Fisiológica											11/07	
Cosecha												01/08

**Cuadro Anexo 1.2.** Cronograma de muestreo para el híbrido DANAC 3273 (Abril-Agosto 2007)

Muestreos	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Etapas de desarrollo	VE	VE	VE	VE	VT	R1	R2	R3	R4	R5	R6	MACO
Días Después de Siembra (DDS)	0	19	33	47	61	68	75	82	89	96	105	161
Días Después de la Aparición del estigma (DDAE)						0	7	14	21	28	35	91
Muestreo suelo		21/04										
Siembra de hembra	03/04											
Siembra de macho	04/04											
Follaje de Planta		21/04	05/05	19/05	02/06	09/06	16/06	23/06	30/06	7/07	14/07	
Espiga en Miniatura					02/06							
Salida de los Estigmas y Fecundación						09/06						
Emisión de Polen						09/06						
Grano en Estado de Ampolla							16/06					
Grano Lechoso								23/06				
Grano pastoso-dentado									30/06	7/07		
Madurez Fisiológica											14/07	
Cosecha												08/09

**Cuadro Anexo 1.3** Cronograma de muestreo para el híbrido Sefloarca 91 (Octubre-Febrero 2008)

Muestreos	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Etapas de desarrollo	VE	VE	VE	VE	VT	R1	R2	R3	R4	R5	R6	MACO
Días Después de Siembra (DDS)	0	10	24	38	52	59	66	73	80	87	94	122
Días Después de la Aparición del estigma (DDAE)						0	7	14	21	28	35	63
Muestreo suelo		21/10										
Siembra de hembra	11/10											
Siembra de macho	12/10											
Follaje de Planta		21/10	04/11	18/11	02/12	09/12	16/12	23/12	30/12	06/01	13/01	
Espiga en Miniatura					02/12							
Salida de los Estigmas y Fecundación						09/12						
Emisión de Polen						09/12						
Grano en Estado de Ampolla							16/12					
Grano Lechoso								23/12				
Grano pastoso-dentado									30/12	06/01		
Madurez Fisiológica											13/01	
Cosecha												10/02

**Cuadro Anexo 1.4.** Análisis de varianza (valores de F) para incidencia de micobiota total (MT) e individual (MI) en semilla parental de tres híbridos sembrados en dos localidades y dos épocas de siembra del estado Aragua.

Hibrido	Fuentes de variación	Valores de F					
		MT	MI				
			<i>Fusarium</i>	<i>Penicillium</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. flavus</i>	Otros <sup>(1)</sup>
Himeca 3002	Parentales	10,4**	55,40**	988,00**	2,41 <sup>ns</sup>	2,19 <sup>ns</sup>	
	CV %	4,34	5,66	8,85	76,59	104,21	
DANAC 3273	Parentales	219,0**	18,10**	512,00**	1,03 <sup>ns</sup>	6,13*	
	CV %	2,01	3,81	11,76	100,66	43,52	
Sefloarca 91	Parentales	1181,0**	21,80**	120,00**	2,97**	19029**	0,17 <sup>ns</sup>
	CV %	2,52	2,96	15,47	12,02	1,68	28,18

CV: Coeficiente de variación; <sup>ns</sup> (P > 0,05); \* (P < 0,05); \*\* (P < 0,01); <sup>(1)</sup> *Curvularia*, *Acremonium* y *Rhizopus*.

**Cuadro Anexo 1.5.** Análisis de Kruskal-Wallis (valores de H) para incidencia de micobiota natural en los suelos en cada una de las localidades, y dos épocas de siembra del estado Aragua.

Localidad	Fuente de Variación	Valores de H		
		<i>Aspergillus</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Otros</i> <sup>(1)</sup>
La cuarta	Muestras	4,57**	0,93 <sup>ns</sup>	3,74**
Valle de	Muestras	1,11 <sup>ns</sup>	0,66 <sup>ns</sup>	1,00 <sup>ns</sup>
Tucutunemo	Época	4,28*	0,67 <sup>ns</sup>	16,7**

<sup>ns</sup>(P>0,05); \*(P<0,05); \*\*(P<0,01). <sup>(1)</sup> Micobiota menos frecuente y la que no esporulo

**Cuadro Anexo 1.6.** Análisis de varianza (valores de F) y prueba de Kruskal Wallis (valores de H) para la incidencia de la micobiota en el follaje durante las etapas de desarrollo (ED) de tres híbridos producidos en dos épocas de siembra y dos localidades del estado Aragua.

Hibrido	Fuente de variación	Valores de F			Valores de H		
		<i>Curvularia</i> <sup>(1)</sup>	<i>Bipolaris</i>	<i>Physoderma</i>			
Himeca	ED	1,47 <sup>ns</sup>	181**	-			
3002	CV (%)	18,73					
DANAC	ED	26,4**	-	-			
3273	CV (%)	14,88					
Sefloarca	ED	5,80**	-	0,91 <sup>ns</sup>			
91	CV (%)	19,46					

<sup>ns</sup>(P>0,05); \*(P<0,05); \*\*(P<0,01); <sup>(1)</sup> Transformación  $\sqrt{\quad}$  de los valores de incidencia.

**Cuadro Anexo 1.7.** Prueba de Kruskal-Wallis (valores de H) para la incidencia de micobiota total e individual durante las etapas de madurez fisiológica (MAFI o R6) y madurez de cosecha (MACO) de semilla HÍBRIDA de maíz producida en dos épocas de siembra y dos localidades del estado Aragua.

Hibrido	Fuente de variación	Valores de H				
		MI				
		MT	<i>Fusarium</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Aspergillus</i>	Otros <sup>(1)</sup>
Himeca	Madurez	30.0**	4.42*	31.3**	2.69 <sup>ns</sup>	4.59 <sup>ns</sup>
3002	Ubicación	0.36 <sup>ns</sup>	2.98 <sup>ns</sup>	1.46 <sup>ns</sup>	0.14 <sup>ns</sup>	0.08 <sup>ns</sup>
DANAC	Madurez	454**	156**	65.6**	5.44 <sup>ns</sup>	2.84 <sup>ns</sup>
3273	Ubicación	0.00 <sup>ns</sup>	0.00 <sup>ns</sup>	0.41 <sup>ns</sup>	1.92 <sup>ns</sup>	0.29 <sup>ns</sup>
Sefloarca	Madurez	407**	334**	30.3**	0.00 <sup>ns</sup>	7,28 <sup>ns</sup>
91	Ubicación	0,03 <sup>ns</sup>	0,01 <sup>ns</sup>	0,18 <sup>ns</sup>	0.00 <sup>ns</sup>	0,50 <sup>ns</sup>

<sup>ns</sup> (P > 0,05); \* (P < 0,05); \*\* (P < 0,01); <sup>(1)</sup> *Acremonium*, *Rhizopus* y hongos que no esporularon

## CAPITULO II

### IDENTIFICACION DEL PATRÓN DE INFECCIÓN POR MICOBIOTA DURANTE LA FORMACIÓN, DESARROLLO Y MADURACIÓN DE LA SEMILLA HÍBRIDA DE MAÍZ

La semilla es un medio muy eficiente e importante en el transporte y transmisión de patógenos a cultivos y zonas de producción, por lo que es importante conocer las vías de penetración de la micobiota a la semilla y su relación con las fases de crecimiento y desarrollo de la planta. El objetivo de esta investigación fue identificar el patrón de infección por micobiota durante las fases de formación, desarrollo y maduración de la semilla de maíz híbrido. Para alcanzar este objetivo se tomaron muestras semanales de inflorescencia femenina desde la etapa de panoja (VT) hasta madurez fisiológica (MAFI o R6) y posteriormente en madurez de cosecha (MACO). Durante el periodo de floración se tomaron muestras de flores, tusas y pedúnculos. De la inflorescencia se tomaron muestras de ovarios, estilos, y estigmas individuales, para desinfectarlos y sembrarlos sobre PDA. En las etapas R6 y MACO se muestrearon 10 semillas por mazorca, seccionadas, desinfectadas y colocadas en PDA. En la etapa de panoja (VT) el polen fue muestreado y sembrado sobre PDA para detectar la micobiota patogénica. La micobiota individual (MI) estuvo constituida por *Fusarium*, *Aspergillus* y *Penicillium*. La micobiota comenzó a observarse en la etapa R1. La infección se incrementó con la madurez del grano encontrándose la mayor incidencia en la etapa R6 y posteriormente en MACO. En las partes de la mazorca la mayor incidencia de MT fue en los estigmas confirmándolos como la principal vía de penetración de los fitopatógenos encontrados. *Fusarium* y *Aspergillus* se presentaron en todas las estructuras estudiadas. No se encontraron diferencias entre la parte apical y la parte basal de la mazorca por lo que se deduce que la infección de las semillas no está influenciada por la ubicación dentro de la mazorca. No se detectó micobiota en los granos de polen muestreados. La máxima incidencia de la MT, *Fusarium* y *Penicillium* ocurrió en la etapa de MACO, lo que nos indica que en el periodo de maduración en campo la infección de la semilla aumenta considerablemente, lo cual valida el patrón de infecciones expuesto en el capítulo 1 de esta investigación. El híbrido con mayor incidencia de MT fue Himeca 3002 seguido por DANAC 3273, ambos sembrados en época de lluvia. Sefloarca 91, sembrado en época de norte verano, mostró la menor incidencia. Se recomienda sembrar en la época de norte verano y cosechar tempranamente como estrategia para controlar la contaminación por micobiota.

Palabras clave: semilla de maíz; patología de semillas; calidad sanitaria de semillas, *Fusarium*; *Penicillium*; *Aspergillus*.

## I. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades de las plantas constituyen un problema importante que limita la producción de semillas resultando en considerables pérdidas, principalmente aquellas producidas por patógenos transmitidos por semilla (Maude, 1996; Neergaard, 1979). Estos patógenos generalmente invaden la semilla antes de la cosecha y son transmitidos de un ciclo a otro reduciendo la calidad y el rendimiento de las mismas (Oerke, 2006). La efectividad del transporte de la micobiota y la transmisión de las enfermedades está en función de una serie de factores como la ubicación del inóculo dentro de la semilla, el estado de desarrollo de la semilla cuando ocurre la infección, las vías de infección y el tipo de micobiota involucrado (Neergaard, 1979).

En Venezuela de los 16 hongos reportados en maíz como transportados por semillas, 10 pueden ser transmitidos y los de mayor incidencia son *Fusarium*, *Aspergillus* y *Penicillium*, (Mazzani y Borges, 1993; Mazzani *et al.*, 2000; Mazzani *et al.*, 2001; Da Silva, 2005 y Rondón *et al.*, 2011). Éstos patógenos invaden la planta de manera sistémica infectando semillas en etapas de desarrollo hasta su maduración y produciendo varios tipos de micotoxinas (Castonguay y Couture, 1983; Malaguti, 2000).

Considerando la importancia del maíz para la alimentación en nuestro país, que la semilla es un medio eficiente de diseminación y transmisión de patógenos y que esta es iniciada en el campo es prioritario caracterizar las vías de penetración de la micobiota y establecer el momento de infección de la semilla y su relación con las etapas de crecimiento de la planta. Esto permitirá valorar el efecto de la micobiota en la calidad sanitaria de la semilla y definir estrategias de control para fortalecer la sostenibilidad del sistema de producción de semillas en Venezuela.

El objetivo de esta investigación fue identificar el patrón de infección por microbiota durante las fases de formación, desarrollo y maduración de la semilla de maíz híbrido

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

El momento en que ocurre la infección de la semilla es importante y está relacionado con la ontogenia y estructura de la misma. Baker (1972) señala que conocer el momento en que se inicia la infección permite determinar la extensión del daño y las partes afectadas de la semilla. Así mismo, el grado de infección puede estar relacionado con el momento de infección y el estado de crecimiento del huésped, lo que puede facilitar la determinación de los métodos más efectivos de control de las enfermedades (Neergaard, 1979).

Las vías por la cual penetran los patógenos a la semilla son diferentes. Puede ser invasión sistémica vía planta madre o vía estigma, como es el caso de *Fusarium verticillioides*, *F. equiseti* y *F. oxysporum* que invaden sistémicamente la semilla por el xilema de la planta madre (Munkuold *et al.*, 1997). Las aberturas naturales incluyendo el funículo y el micrópilo son otras vías de penetración directa del cariósido así como por aberturas producidas por daños mecánicos (Maude, 1996).

La infección de la semilla puede producirse en cualquiera de las fases fisiológicas de su desarrollo, durante la prefloración o antesis, la cual cubre el período desde la iniciación del primordio floral hasta la fecundación; durante el desarrollo de la semilla hasta la maduración fisiológica o maduración de cosecha, cuando la semilla pierde humedad hasta que puede ser cosechada. Cada fase tiene características únicas con respecto a la epidemiología y el manejo de las enfermedades en semilla (Cerovich y Miranda, 2001; Subero, 2001).

La penetración del inóculo durante antesis es importante porque en esta fase es fácil que ocurra la infección del embrión y los tejidos internos de la semilla. Al inocular las barbas de maíz con esporas de *F. verticillioide* el periodo óptimo para la infección de los granos ocurre cuando éstas están comenzando la senescencia (Subero 2001). También se ha determinado que las inflorescencias masculinas y femeninas

del maíz son efectivas en la captura y transmisión de esporas de *Fusarium* hasta los granos de la mazorca (Pineda, 2001), siendo ésta la vía más eficaz para la transmisión por semillas y la infección sistémica (Munkvold *et al.*, 1997; Miller *et al.*, 2007).

Bush *et al.* (2004) detectaron que *F. verticillioides* infectaba los granos de maíz en estado lechoso (4 a 5 semanas después de la polinización) y ésta infección incrementaba rápidamente al acercarse a la madurez fisiológica y para el momento de la cosecha.

Windham y Williams (2007) determinaron que la infección sistémica de *A. parasiticus* en el tallo de maíz es una vía de infección de la semilla pero menos importante que la infección por los estilos. En el caso de la infección de *A. flavus* en maíz se ha demostrado que la penetración del hongo en las mazorcas del maíz ocurre cuando los estigmas están en un estado fisiológico posterior a la polinización, con color amarillo-marrón, especialmente cerca de los granos de polen pero la infección interna de granos no aparece hasta la etapa temprana de grano dentado (Marsh y Payne, 1984a; Marsh y Payne, 1984b). Otra vía de diseminación la constituyen los insectos cuando se alimentan de la mazorca de maíz (Windham, *et al.* 1999).

Hongos como *Botrytis*, *Fusarium*, *Alternaria* y *Cladosporium* que infestan comúnmente suelos y restos de cosecha bajo prolongados períodos de humedad durante la maduración pueden invadir la semilla, causar decoloración y pérdida de la viabilidad. Esta condición puede ser particularmente severa cuando se retarda la cosecha por condiciones de alta humedad en el campo. Las condiciones ambientales durante el periodo de floración y desarrollo de la semilla influyen significativamente en el proceso de infección. Lluvias continuas y temperaturas cálidas después de la anthesis conllevan a un incremento de la contaminación con mohos de las cariósides de los granos de sorgo (Maude, 1996).

Otros hongos señalados en el país como causantes de enfermedades del maíz que pueden ser transmitidas por la semilla son: *Bipolaris maydis* (= *Helminthosporium maydis*) que produce el tizón del sur; *Sclerophthora macrospora* agente causante de la falsa punta loca y cuando infecta a la planta madre en temprana edad, impide la producción de semillas porque produce esterilidad de la misma. Se transmite cuando la semilla proviene de plantas infectadas y cuando están recién cosechadas porque la infección disminuye desde 60 a 0,6% cuando las semillas son almacenadas a 1°C por siete semanas (Jones *et al.*, 1972).

*Stenocarpella maydis* (*Diplodia maydis*) afecta a toda la planta incluyendo inflorescencias y semillas produciendo pudrición del tallo. (McGee, 1988). Este hongo inicialmente infecta el embrión de semillas de maíz, luego el endospermo y finalmente el pericarpio; penetra por la base de la mazorca y se extiende al resto de la misma (Bensch, 1995). *Penicillium* spp. se presenta sobre y entre los granos de las mazorcas usualmente cerca de la punta. La enfermedad ocurre comúnmente en asociación con daños mecánicos o de insectos (McGee, 1988, White, 1999). Sukno *et al.* (2008) encontraron que *Colletotrichum graminicola* puede producir la colonización sistémica de la raíz, por lo que puede invadir en el sistema vascular y extenderse a la parte aérea de la planta sin causar síntomas generalizados de la enfermedad.

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

Con la finalidad de identificar el patrón de infección por micobiota durante la fase de formación, desarrollo y maduración de la semilla híbrida de maíz se utilizaron las mismas localidades, épocas e híbridos señalados en el Capítulo I. El cronograma de muestreo está detallado en los Cuadros Anexos 1.1, 1.2 y 1.3. El muestreo fue sistemático entre los hilos de las hembras y al azar dentro del hilo, seleccionando cinco puntos por hilo para obtener un total de 25 muestras por semana. Se tomaron muestras de las inflorescencias femeninas en las etapas del desarrollo reproductivo descritas por Hanway y Ritchie (1984). El primer muestreo fue realizado a los 56, 61 y 52 días después de la emergencia de la planta (DDE), en la etapa de panoja (VT), continuando en las etapas de sedas y emergencia de los estigmas (R1), ampolla (R2), lechosa (R3), pastosa (R4), dentada (R5), capa negra (R6) que para efectos de esta investigación será denominada madurez fisiológica (MAFI) en lo sucesivo y el muestreo final en la etapa de la madurez de cosecha (MACO).

Las inflorescencias femeninas muestreadas en cada etapa reproductiva fueron llevadas al laboratorio; se eliminaron las brácteas y dividieron transversalmente en sus partes basal y distal tomándose tres flores al azar de cada parte. Los estigmas, estilos y ovarios de flores individuales fueron separados, desinfectados con hipoclorito de sodio al 1% por un minuto, cortados en trozos de 1 mm y sembrados en medio de cultivo PDA. Las muestras tomadas de la parte central de la tusa de la mazorca y en la parte media del pedúnculo fueron desinfectadas según el método descrito, seccionados en tres partes de 1 mm, sembrados en medio de cultivo PDA, e incubados a 28° C por cinco días. La micobiota patogénica fue identificada por sus características morfológicas utilizando las claves micológicas pertinentes (Booth, 1971; Booth, 1977; CMI, 1964; Ellis, 1971; Sivanesan, 1987 y Leslie y Summerell, 2006). En la etapa de MAFI y MACO, las mazorcas fueron muestreadas y procesadas tal como se describió en la sección de Materiales y Métodos del Capítulo 1.

Para evaluar la incidencia de MT y MI en la inflorescencia masculina se tomaron muestras de polen mediante la preselección sistemática de cinco hileras de plantas padres en el campo y cuatro plantas dentro del hilo para un total de 20 muestras. Las panojas fueron cortadas, introducidas en bolsas de papel y llevadas al laboratorio para la recolección del polen. Con ayuda de una lupa estereoscópica se tomaron 100 granos de polen de cada muestra que fueron colocados sobre PDA e incubados a 28° C por cinco días para registrar la micobiota patogénica.

La incidencia promedio (%) de la micobiota total e individual (MT y MI) presente en cada una de las etapas de desarrollo reproductivo (EtRep) y estructuras reproductivas de la semilla (EsRep) fue analizada mediante la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis y la correspondiente prueba de medias, utilizando el programa Statistix 8.0. La incidencia de la micobiota fue calificada utilizando la escala propuesta por Mazzani *et al.* (1999), según la cual la incidencia se califica como baja (0-15%), intermedia (16-30 %) y alta (30 %).

#### IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El Cuadro 2.1, presenta el Análisis de Kruskal-Wallis para la incidencia de micobiota total (MT) e individual (MI), durante las etapas de desarrollo reproductivo (EtapRep), estructuras reproductivas (EstruRep) y ubicación de la semilla en las mazorcas (UbseMaz) de los tres híbridos de maíz sembrados para producir SCM en dos épocas de siembra y dos localidades del estado Aragua.

**Cuadro 2.1.** Prueba de Kruskal-Wallis (Valores de H) para incidencia de micobiota total (MT) e individual (MI) durante etapas de desarrollo reproductivo (**EtapRep**), estructuras reproductivas (**EstruRep**) y ubicación de la semilla en las mazorcas (**Ubsemaz**) de tres híbridos de maíz producidos en dos épocas de siembra y dos localidades del estado Aragua.

Hibrido	Fuentes de variación	Valores de H				
		MT	MI			
			<i>Fusarium</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Penicillium</i>	Otros <sup>(1)</sup>
Himeca 3002	EtapRep	493**	483**	3,65 <sup>ns</sup>	88.8*	38,6*
	EstruRep	31.6**	8.58**	0.93 <sup>ns</sup>	1.40 <sup>ns</sup>	55,2 <sup>ns</sup>
	Ubsemaz	15.9 <sup>ns</sup>	7.75 <sup>ns</sup>	0.87 <sup>ns</sup>	1,35 <sup>ns</sup>	14,5 <sup>ns</sup>
DANAC 3273	EtapRep	551**	514*	2.65 <sup>ns</sup>	222*	61.7**
	EstruRep	33.2**	5.67 <sup>ns</sup>	8.79 <sup>ns</sup>	5.71 <sup>ns</sup>	89.4*
	Ubsemaz	2.14 <sup>ns</sup>	1.41 <sup>ns</sup>	11.5 <sup>ns</sup>	0.78 <sup>ns</sup>	5.69 <sup>ns</sup>
Sefloarca 91	EtapRep	1129**	1207**	1.45 <sup>ns</sup>	142**	9,48 <sup>ns</sup>
	EstruRep	10.4 <sup>ns</sup>	4.74 <sup>ns</sup>	2.11 <sup>ns</sup>	2.77 <sup>ns</sup>	25.0 <sup>ns</sup>
	Ubsemaz	3.98 <sup>ns</sup>	1.58 <sup>ns</sup>	2.61 <sup>ns</sup>	3.65 <sup>ns</sup>	2.91 <sup>ns</sup>

<sup>ns</sup> (P > 0,05); \* (P < 0,05); \*\* (P < 0,01); <sup>(1)</sup> *Acremonium*, *Rhizopus* y hongos sin esporulación

Respecto a la incidencia de MT, los tres híbridos presentaron diferencias altamente significativas en las EtapRep, igual nivel de significación para EstruRep de Himeca 3002 y DANAC 3273, y ninguna significación en las EstruRep de Sefloarca 91 y UbseMaz en los tres híbridos evaluados.

En cuanto a incidencia de micobiota individual (MI), el Cuadro 2.1 indica que hubo diferencias significativas para *Fusarium* en las EtapRep de los tres híbridos y EstruRep de Himeca 3002; lo cual fue contrastante en *Aspergillus*, porque no hubo diferencias estadísticas en ninguna de las fuentes de variación para los tres híbridos. Respecto a *Penicillium* hubo diferencias significativas solamente para las EtapRep de los tres híbridos, mientras que en la categoría “Otros” hongos las diferencias significativas fueron para las EtapRep del Himeca 3002 y DANAC 3273 y EstruRep en DANAC 3273.

En el Cuadro 2.2, se presentan los promedios de incidencia de MT y MI durante las EtapRep comprendidas entre la aparición de la panoja (VT) y MACO de semilla híbrida de maíz producida en dos épocas de siembra y dos localidades del estado Aragua, que es la principal zona de producción de SCM del país (Cabrera y Garcia 1999; Oropeza *et al.*, 2000 y Diaz, 2006). Los promedios de incidencia de MT reflejados en este Cuadro muestran un inédito patrón de infecciones por MT durante las etapas reproductivas de la semilla. La menor incidencia de MT ocurre en la etapa VT de todos los híbridos, crece sostenidamente entre R1 y R5 y aumenta significativamente en MAFI. Esta última etapa es la indicadora de máxima calidad de la semilla de maíz, soya y otros cultivos, porque presenta los máximos valores de peso seco, germinación y vigor, a pesar de variable incidencia de MT (Miranda, 1977 y 1981; Cerovich, 1997 y Miranda y Cerovich, 2004). En la siguiente etapa, identificada como madurez de cosecha (MACO), al igual que lo encontrado en el Capítulo I precedente, los tres híbridos registran máximos porcentaje de incidencia de MT con incidencia significativamente mayor que la MAFI, hecho que confirma los resultados de Siriacha *et al.* (1994) y Bush *et al.* (2004) en semilla de maíz, y Miranda (1977 y 1981) en semilla de soya.

**Cuadro 2.2.** Incidencia promedio de MT y MI en las etapas de desarrollo reproductivo (EtapRep) de semilla híbrida de maíz producida dos épocas de siembras y dos localidades del estado Aragua.

Hibrido	Etap Rep <sup>(1)</sup>	Promedios de incidencia de micobiota (%)						
		MT	MI					Otros <sup>(2)</sup>
			<i>Fusarium</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Penicillium</i>			
Himeca 3002	VT	0,80 f	0,00 e	0,40 a	0,00 b	0,60 b		
	R1	27,60 d	4,20 e	3,20 a	1,6 b	20,40 a		
	R2	11,67 ef	4,33 e	0,50 a	0,00 b	10,67 ab		
	R3	4,00 f	1,33 e	1,33 a	0,00 b	2,50 b		
	R4	19,33 de	15,00 d	1,17 a	3,00 b	1,50 b		
	R5	47,65 c	44,71 c	1,29 a	3,06 b	3,65 b		
	MAFI	71,80 b	67,60 b	2,00 a	4,00 b	5,60 b		
	MACO	94,00 a	79,20 a	0,6 a	23,00 a	8,40 ab		
DANAC 3273	VT	2,80 d	0,40 c	2,00 a	0,00 b	0,20 b		
	R1	25,00 b	9,00 bc	1,40 a	0,00 b	23,00 a		
	R2	6,00 cd	1,50 c	0,67 a	0,17 b	4,17 b		
	R3	3,00 d	0,50 c	0,33 a	0,00 b	2,33 b		
	R4	16,33 bc	13,83 b	0,50 a	0,00 b	2,50 b		
	R5	14,94 bc	12,71 b	0,70 a	0,35 b	1,29 b		
	MAFI	22,60 b	19,40 b	1,20 a	0,40 b	1,40 b		
	MACO	98,80 a	85,00 a	0,00 a	28,60 a	3,40 b		
Sefloarca 91	VT	0,00 b	0,00 b	0,00 a	0,00 b	0,00 a		
	R1	4,40 b	0,20 b	0,20 a	0,00 b	4,20 a		
	R2	6,60 b	0,40 b	0,00 a	0,20 b	6,20 a		
	R3	5,67 b	3,17 b	0,00 a	0,00 b	2,50 a		
	R4	2,67 b	1,17 b	0,33 a	0,00 b	1,17 a		
	R5	5,29 b	3,65 b	0,00 a	0,12 b	2,00 a		
	MAFI	8,40 b	6,00 b	0,00 a	0,20 b	3,00 a		
	MACO	94,40 a	83,00 a	0,00 a	20,4 a	0,40 a		

<sup>(1)</sup> Etapas de desarrollo del maíz según Hanway (1984): panoja, (VT), Sedas (R1), ampolla (R2), lechosa (R3), pastoso (R4), dentado (R5). <sup>(2)</sup> *Acremonium*, *Rhizopus* y hongo sin esporulación. Medias con diferente letra difieren entre si a P <0,05.

El impacto de las infecciones por MT y MI sobre semillas maduras en las etapas de MAFI y MACO ha sido identificado como el “proceso de deterioro pre-cosecha” (DEPRECO) de la calidad de la semilla, caracterizado en semillas de maíz por Díaz (2006), Bush *et al.* (2004), Siriacha *et al.* (1994), y en semillas de soya por Miranda (1977, 1981). Este escenario destaca las recomendaciones de Cerovich (1997), Miranda y Cerovich (2001) y Miranda, (2013) sobre la importancia de desarrollar investigaciones para caracterizar los factores genéticos, sanitarios y fisiológicos asociados con el DEPRECO de semillas, que faciliten la implementación de estrategias de control y mejoramiento de la calidad de semillas de maíz y otros cultivos en Venezuela.

En relación a la MI, la mayor incidencia correspondió a *Fusarium spp.* En la etapa VT la incidencia fue mínima. 0 % para Himeca 3002 y Sefloarca 91, y 0,4 % para DANAC 3273. Resultado esperado ya que Según Hanway y Ritchiel (1984), en VT no han emergido los estigmas y estilos que representan la vía predominante para la infección de las semillas de maíz (Munkvold y Carlton, 1997). Adicionalmente, el Cuadro 2.2 muestra que la incidencia de *Fusarium* sigue el patrón descrito para MT en Himeca 3002 y DANAC 3273, pero no para Sefloarca 91, porque desde R1 los porcentajes aumentan al avanzar las etapas de desarrollo y maduración de la semilla con picos máximos y significativos en MAFI y MACO, lo cual amplía los resultados de Díaz (2006), Díaz *et al.* (2007), Bush *et al.* (2004) y Munkvold y Carlton (1997).

La incidencia de *Aspergillus* fue sustancialmente inferior a la de *Fusarium* y no se encontraron diferencias significativas entre los porcentajes de infección para las EtapRep desde VT hasta MAFI y MACO en los tres híbridos. En este sentido, las investigaciones de Marsh y Payne (1984b) determinaron que cuando la invasión de *A. flavus* ocurría en etapa de emergencia de los estigmas florales (R1), el número de semillas infectadas aumentaba, pero la infección interna aparecía al inicio de la etapa R5. Estos resultados sugieren que, independiente de la ausencia de diferencias estadísticas, la incidencia de *Aspergillus* comprende suficiente inóculo potencial para

iniciar los procesos de invasión e infección de semillas en desarrollo que serían transmitidas o transportadas en semillas de maíz como lo reporta McGee (1988).

La incidencia de *Penicillium* fue sostenidamente baja durante todas las etapas de desarrollo de la semilla, excepto en MACO cuando presentó incrementos estadísticamente significativos (23, 28,6 y 20,4 % para los híbridos Himeca 3002, DANAC 3273 y Sefloarca 91, respectivamente).

El patrón de incidencia “*Otros*” patógenos, fue distinto al resto de la MI, presumiblemente debido a que es una categoría conformada por *Acremonium*, *Rhizopus* y hongos no identificados sin esporular. Fue muy notable que las máximas incidencias para este grupo no ocurrieron en las etapas MACO, como era lo esperado, sino en R1 y R2 para los tres híbridos.

El Cuadro 2.3 presenta el patrón de incidencia de MT y MI en ovarios, estilos, estigmas, tusa y pedúnculo de mazorcas (desde VT hasta R5) de los tres híbridos sembrados en dos localidades y épocas de siembra del estado Aragua. La incidencia de MT revela importantes porcentajes de inóculo potencial en todas las estructuras reproductivas evaluadas, hecho que valida los resultados de incidencia de MT y MI mostrados en el Cuadro 2.2 de este mismo Capítulo II, así como las opiniones de los investigadores citados en la discusión correspondiente.

La comparación de MT entre híbridos indica que el Himeca 3002 presentó una incidencia intermedia en ovario, estigmas, y pedúnculo. El estilo mostró baja incidencia, significativamente menor que el grupo anterior. En el híbrido DANAC 3273 la incidencia general de las estructuras reproductivas fue estadísticamente superior para estigma, pedúnculo y tusa, respecto a las infecciones en ovario y estilo tuvieron incidencia significativa inferior con valor absoluto de importancia patológica. Para el híbrido Sefloarca 91 en todas sus estructuras reproductivas presentó porcentajes de incidencia sustancialmente inferiores a las encontradas para

Himeca 3002 y DANAC 3273. Los porcentajes de incidencia de MT registrados variaron entre 9,25 %; 3,83 %; 3,75 %; 1,33 % y 0 % en estigma, ovario, estilo pedúnculo y tusa demostrando que la ausencia de diferencias estadísticas entre estas fuentes de inóculo potencial de MT, pierden sentido ante el riesgo epidemiológico de su presencia comprobada en las estructuras reproductivas invadidas.

La magnitud y variación de la MT detectada en las etapas de desarrollo vegetativo y reproductivo asociadas con la formación, desarrollo y maduración de la semilla confirma la consistencia de la metodología introducida por Miranda (1977), para relativa influencia de micobiota sobre la calidad de semilla de soya en Mississippi, EE.UU. Adicionalmente, los resultados de los Cuadros 2:2 y 2.3 de esta Capítulo, valida la de Miranda (1977) sobre la imposibilidad de producir semillas de soya u otros cultivos libres de enfermedades en presencia de inóculo natural de micobiota, presentes en órganos florales durante las fases de pre y pos formación de la semilla.

Los resultados de incidencia de MI en las EstruRep del Cuadro 2.3 muestran la presencia de inóculo potencial de *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium* y *Otros* patógenos en todas ellas, lo que facilita los procesos de penetración y transporte a la semilla desde estilos y estigmas, según lo descrito por Koehler (1942), Munkuold *et al.* (1997), Marsh y Payne (1984b), Mycock (1990) y Windham y Williams (2007). Estos resultados sugieren que en los tres híbridos el patógeno *Fusarium* sp. tuvo los mayores promedios absolutos de incidencia en ovarios, estilo, estigma, tusa y pedúnculo. También se observa que los mayores promedios de incidencia de *Fusarium* correspondieron al híbrido Himeca 3002, seguidos por DANAC 3273 y Sefloarca 91, respectivamente.

**Cuadro 2.3.** Incidencia promedio (%) de la MT y MI en estructuras reproductivas (EstruRep), desde flor a semilla, de los híbridos Himeca 3002, DANAC 3273 sembrado en la Cuarta y valle de Tucutunemo en época de lluvia y Sefloarca 91 sembrado en el Valle de Tucutunemo en norte verano.

Hibrido	EstruRep	Promedios de incidencia (%)									
		MT		MI							
				<i>Fusarium</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Otros</i> <sup>(1)</sup>				
Himeca 3002	Ovario	26,84	a	24,69	a	1,11	a	1,76	a	2,15	b
	Estilo	13,41	b	6,27	b	0,94	a	0,94	a	7,28	b
	Estigma	29,52	a	6,35	b	0,63	a	1,27	a	25,08	a
	Tusa	13,92	ab	9,49	b	3,16	a	1,90	a	0,63	b
	Pedúnculo	19,62	ab	11,39	b	5,70	a	2,53	a	1,90	b
DANAC 3273	Ovario	8,97	b	7,55	a	0,64	a	0,13	a	0,71	b
	Estilo	9,02	b	4,78	a	0,34	a	0,00	a	4,51	b
	Estigma	29,21	a	9,84	a	2,22	a	0,00	a	28,25	a
	Tusa	15,33	ab	8,67	a	4,00	a	1,33	a	3,33	b
	Pedúnculo	20,00	ab	12,00	a	2,67	a	0,00	a	6,00	b
Sefloarca 91	Ovario	3,83	a	2,72	a	0,00	a	0,07	a	1,32	a
	Estilo	3,75	a	1,42	a	0,15	a	0,00	a	2,25	a
	Estigma	9,25	a	0,21	a	0,00	a	0,00	a	9,03	a
	Tusa	0,00	a	0,00	a	0,00	a	0,00	a	0,00	a
	Pedúnculo	1,33	a	0,67	a	0,67	a	0,67	a	0,00	a

<sup>(1)</sup> *Acremonium*, *Rhizopus* y hongos que no esporularon.  
Medias con diferente letra difieren entre si a P <0,05.

Sobre las posibles vías de penetración de *Fusarium* en la planta, Koehler (1942) sustentaba que el hongo penetraba desde las barbas hacia la planta madre, mientras que Munkvold *et al.* (1997); Miller *et al.* (2007) indicaron que el pedúnculo facilita la penetración a la planta madre. Miler *et al.* (2007) observaron que *Fusarium* puede penetrar en el ovario directamente a través del punto de unión del estigma, o atravesando los estigmas y crecer sobre otras semillas o en espacios entre semillas, o invadir la tusa y penetrar a través del pedicelo.

En cuanto a *Aspergillus* y *Penicillium* los tres híbridos mostraron incidencias de menor magnitud que para *Fusarium*, y sin diferencias significativas para la incidencia

de las EstrRep evaluadas. Al comparar los híbridos, la menor incidencia de *Aspergillus* correspondió a Sefloarca 91 presentando mayor porcentaje en el pedúnculo y tusa. Otros hongos tuvieron mayor incidencia en el estigma y menor para las otras estructuras reproductivas. Sobre las rutas de infección de *A. flavus* a la semilla de maíz Windham y Williams (2007), señalan la infección desde el tallo como otra vía de penetración e infección a la semilla. Siriacha *et al.* (1994) informaron que *A. flavus* fue recuperado en las sedas o barbas desde su emergencia (VT), en la tusa y en las semillas

En el estudio de la inflorescencia masculina, no se detectó micobiota en los granos de polen muestreados, lo que indica que la MI detectada en las mazorcas no son transportados por el polen. Estos resultados discrepan con los obtenidos por Pineda (2001) quien sugería que los granos de maíz pueden infectarse a partir de polen proveniente de espigas infectadas con *Fusarium*. Naik and Busch (1978) determinaron que el polen estimula la germinación de las conidios de *Fusarium* pero no señalan la transmisión por granos de polen.

## V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

1. La metodología utilizada fue eficaz y condujo a resultados innovadores para estudios de patología, calidad sanitaria y tecnología de producción de semilla certificada de maíz y otros cultivos.
2. Los hongos pertenecientes al género *Fusarium* presentaron los mayores porcentajes de incidencia en todas las etapas de desarrollo y maduración de la semilla híbrida de maíz, aumentando en la época de lluvia y disminuyendo en la época de norte verano.
3. El alto nivel de inóculo del MT en los estigmas indican que son la principal vía de infección de la semilla, mientras que la ausencia de micobiota en los granos de polen sugiere que no son fuente de infección para la semilla de maíz
4. La infección de la semilla de maíz aumenta en las etapas de desarrollo y maduración fisiológica y alcanza el máximo a la maduración de cosecha (MACO).
5. La menor incidencia de inóculo en la SCM producida durante norte - verano recomienda su producción en esta época para mejorar la calidad sanitaria de la SCM.

## VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAKER, K. F. 1972. Seed Pathology. In: T. Kozsłowski. Ed. Seed Biology, vol. 2. Academic Press. New York. pp. 317-416.
- BENSCH, M. J. 1995. An evaluation of inoculation techniques inducing *Stenocarpella maydis* ear rot on Maize. South African J. of Plant and Soil, 12: 172-174.
- BOOTH, C. 1971. The genus *Fusarium*. Kew, Surrey, England, Commonwealth Mycological Institute. 237 p.
- BOOTH, C. 1977. *Fusarium* Laboratory Guide to The Identification of the Major Species. Kew, Surrey, England, Commonwealth Mycological Institute. 58 p.
- BUSH B J; M L CARSON; M A CUBETA; W M HAGLER y G A PAYNE. 2004. Infection and Fumonisin Production by *Fusarium verticillioides* in Developing maize kernels *Phytopathology*; 94: 88-93
- CABRERA, S.R., y P. GARCÍA. 1999. El Cultivo de Maíz en Venezuela. Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuarias (FONAIAP), Centro de Investigaciones Agropecuarias del Estado Portuguesa (CIAEP). 15 p.
- CASTONGUAY, Y. y L. COUTURE. 1983. Epidemiologie de la contamination des grains de céréales par les *Fusarium* spp. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 5 (4): 222-228.
- CEROVICH, M. 1997. Estrategias de control de calidad en el sistema de semillas. En Curso de Tecnología de semillas para la competitividad agrícola. XIII Jornadas Agronómicas. Julio 11 y 12. Maracay. Venezuela.
- CEROVICH, M. y F. MIRANDA. 2001. Sanidad de semillas. Componente básico de la calidad. In: Subero, LJ. Patología de semillas XVII congreso Venezolano de Fitopatología. Maracay
- COMMONWEALTH MYCOLOGICAL INSTITUTE (CMI). 1964. *Gibberella fujikuroi*. Descriptions of pathogenic fungi and bacteria. Set. 3 No 22 Kew, Surrey, England
- DA SILVA, L. 2005. Detección, identificación, ubicación y transmisión de especies de *Fusarium* en semillas de maíz (*Zea mays* L.) Tesis Magíster Scientiarum en Agronomía. UCV- Maracay. VE. 94 p.

- DIAZ, J. 2006. Características dimensionales y colorimétricas de cultivares comerciales de maíz con fines de procesamiento agroindustrial. Tesis de Maestría. Universidad Central de Venezuela, Facultad de Agronomía, 145 pp.
- DIAZ, J.; F. MIRANDA; M. CEROVICH y R. FIGUEROA. 2007. Incidencia de *Fusarium verticillioides* en semillas certificadas de maíz producidas en la región central de Venezuela. XX Congreso Nacional de Fitopatología. Maracay, agosto 2007
- ELLIS, M.B. 1971. Dematiaceous Hyphomycetes, Commonwealth Mycological Institute. Kew, Surrey, England,
- HANWAY, J.J. y S.W. RITCHIE. 1984. How a corn plant develops: Special report N° 48. Iowa State University
- KOEHLER, B. 1942. Natural mode of entrance of fungi into Corn ears and some symptoms that indicate infection. Journal of Agricultural Research 64 (8):421-442
- JONES, B.L., J.C. LEEPER y R. A. FREDERIKSEN. 1972. Sclerospora sorghi in corn: its location in carpellate flowers and mature seeds. Phytopathol. 62: 817-819.
- LESLIE, J.F. y B.A. SUMMERELL. 2006. The *Fusarium* laboratory manual. Sydney. Blackwell, 388 p.
- MALAGUTI, G. 2000. Enfermedades del maíz en Venezuela. In: El maíz en Venezuela. H. Fontana y C. Gonzalez (Compiladores). Fundación Polar. p 363-405
- MARSH, S.F. y G.A.PAYNE. 1984a Scanning EM studies on the colonization of dent corn by *Aspergillus flavus*. Phytopathology 74:557-561
- MARSH, S.F. y G.A. PAYNE. 1984b Preharvest infection of corn silks and kernels by *Aspergillus flavus*. Phytopathology 74:1284-1289
- MAUDE, R. B. 1996. Seedborne diseases and their control: principles and practice. CAB International. Oxon. pp 280
- MAZZANI, C. y O. BORGES. 1993. *Fusarium moniliforme*, importante especie de hongo en granos de maíz (*Zea mays* L.) en Venezuela. Memoria XIII Congreso Venezolano de Fitopatología
- MAZZANI, C.; O. BORGES; O. LUZÓN; V. BARRIENTOS y P. QUIJADA. 1999. Incidencia de *Aspergillus flavus*, *Fusarium moniliforme*, aflatoxinas y

- fumonisinias en ensayos de híbridos de maíz en Venezuela. *Fitopatol. Venez.* 12: 9-13.
- MAZZANI, C., O. BORGES; O. LUZÓN; V. BARRIENTOS y P. QUIJADA. 2000. *Fusarium moniliforme*, fumonisinias y *Aspergillus flavus* en granos de híbridos de maíz en el estado Guárico, Venezuela. *Rev. Fac. Agron.* 17: 185-195
- MAZZANI, C.; O. BORGES; O. LUZÓN; V. BARRIENTOS y P. QUIJADA. 2001. Occurrence of *Fusarium moniliforme* and fumonisins in kernels of maize hybrids in Venezuela. *Brazilian Journal of Microbiology* 32:345-349
- MCGEE, D.C. 1988. Maize diseases. A reference source for seed technologists. St. Paul, Minnesota, US. P. 149.
- MILLER, S. S.; L. M. REID y L. J. HARRIS. 2007. Colonization of maize silks by *Fusarium graminearum*, the causative organism of gibberella ear rot. *Canadian Journal of Botany*, 85:(4): 369-376
- MIRANDA, F. 1977. The influence of some seed borne pathogens on soybean seed quality. M.S. Thesis. Mississippi State University. Mississippi State. MS.39762.
- MIRANDA, F. 1981. Chemical and biological protection of soybean seed quality. Ph.D. Dissertation. Mississippi State University. Mississippi State. MS.39762
- MIRANDA, F. 2013. Bases técnicas y legales para la producción de semilla de arroz en el SIABSEM de Venezuela. En: Diplomado de producción de arroz bajo riego. Octubre 2013. Araure, Portuguesa.
- MIRANDA, F. y M. CEROVICH. 2001. Patología de Semillas. En: Curso de Patología de semillas XVII Congreso de Fitopatología de Semillas. Maracay, Venezuela. Universidad Central Facultad de Agronomía. 17pp.
- MIRANDA, F. y M. CEROVICH. 2004. Bases legales y técnicas para la certificación de semillas de arroz en Venezuela. En el Curso- Taller sobre producción de semilla de arroz, libres de arroz rojo organizado por FAO, Facultad de Agronomía de la UCV e INIA- Portuguesa. Araure, Portuguesa. Septiembre 2004. 22pp.
- MUNKVOLD, G. P., y W. M. CARLTON. 1997. Influence of inoculation method on systemic *Fusarium moniliforme* infection of maize plantsrown from infected seeds. *Plant Dis.* 81:211-216.
- MUNKVOLD, G. P., D. V. MCGEE y W. M. CARLTON. 1997. Importance of different pathways for maize kernel infection by *Fusarium moniliforme*. *Phytopathology.* 87: 209-217.

- MYCOCK, D. J. 1990. A study of some of the inter-relationships between maize and the seed storage fungi as typified by *Aspergillus flavus* var. *columnaris*. University of Natal. 482 páginas
- NAIK, D.M. y L.V. BUSCH. 1978. Stimulation of *Fusarium graminearum* by maize pollen. *Cqn. J. Bt.* 56: 1113-1117.
- NEERGAARD, P. 1979. Seed Pathology. Ed. Rev. The McMillan Press. LTD. London. 839p.
- OERKE, E. C. 2006. Centenary Review: Crop losses to pests. *The Journal of Agricultural Science* 144(1): 31-43
- OROPEZA, H., C. MÁRQUEZ y D. NÚÑEZ T. 2000. Tecnología de la producción de semillas. *In: El maíz en Venezuela*. H. Fontana y C. González (Compiladores). Fundación Polar
- PINEDA, J. 2001. Papel de las inflorescencias del maíz en la captura de esporas de *Fusarium moniliforme* y su efecto en la infección de mazorcas y granos. Informe final CDCHT. UCLA Barquisimeto, VE.
- RONDON, M., M. CHAVARRI; A. CAPOBIANCO y C. MAZZANI. 2011. Mohos asociados al maíz blanco (*Zea mays*) de cosecha procedente del estado Guárico. Sociedad Venezolana de fitopatología. XXII congreso venezolano de fitopatología. Trujillo, 08 al 11 de noviembre de 2011. Resúmenes. *Fitopatol. Venez.* 24 (2): 65
- SIRIACHA, P.; P. TONBOONEK; A. WONGURAI y S. KOSITCHAROENKUL. 1994. Preharvest contamination of maize by *Aspergillus flavus* In: Highley, E.; Wright, E.J.; Banks, H.J.; Champ, B.R. (Eds.), *Stored Product Protection, Proceedings of the 6th International Working Conference on Stored-Product Protection, 17-23 April 1994, Canberra, Australia*. CAB International, Wallingford, United Kingdom. <http://spiru.cgahr.ksu.edu/proj/iwcspp/iwcspp6.html>
- SIVANESAN, A. 1987. Graminicolous species of *bipolares*, *curvularia*, *drechslera*, *exserohilum* and their Teleomorphs. *Mycological Papers*, No 158. C.A.B. International Mycological Institute. 261 p.
- SUBERO L. J. 2001. Patología de Semillas XVII Congreso Venezolano de Fitopatología. Maracay.

- SUKNO, S.A; V.M. GARCÍA; B.D. SHAW y M.R. THON. 2008. Root infection and systemic colonization of maize by *Colletotrichum graminicola*. *Applied and Environmental Microbiology* 74: 823-832
- WINDHAM, G.L. y W.P. WILLIAMS. 2007. Systemic infection of stalks and ears of corn hybrids by *Aspergillus parasiticus*. *Mycopathologia* 164:249-254
- WINDHAM G.L., W.P. WILLIAMS y F.M. DAVIS. 1999. Effects of the southwestern corn borer on *Aspergillus flavus* kernel infection and aflatoxin accumulation in maize hybrids *Plant Disease* 83 (6), 535-540
- WHITE, D. G. 1999. *Compendium of Corn Diseases*. 3rd ed. APS Press, St. Paul, Minnesota.

### CAPITULO III

#### INFLUENCIA DE LA MICROBIOTA NATURAL SOBRE LA CALIDAD SANITARIA Y FISIOLÓGICA DE LA SEMILLA HÍBRIDA DE MAÍZ.

La microbiota presente en la semilla puede afectar la calidad fisiológica al disminuir el porcentaje de germinación y el vigor de las mismas. Además es un vehículo de diseminación de plagas y enfermedades en nuevas áreas de cultivo. Con el objetivo de evaluar la influencia de la microbiota natural sobre la calidad sanitaria y fisiológica de la semilla de maíz se tomaron muestras de semillas colectadas en madurez de cosecha (MACO) de tres híbridos sembrados en dos localidades y dos épocas de siembra. La germinación fue evaluada según los protocolos de la International Seed Testing Association (ISTA, 1993). El vigor de las semillas fue estimado por el porcentaje de plántulas normales germinadas a los cuatro días. Una segunda evaluación de la germinación fue realizada cuando se determinó la microbiota presente en la etapa MACO, tomando la emergencia de radícula como indicador de germinación. Los resultados fueron analizados para establecer el efecto de la microbiota sobre la germinación. En la prueba estándar de germinación realizada, los porcentajes estuvieron por encima de 88%, valor mínimo establecido en las normas de certificación (MAC-FONAIAP, 1977), por lo que se considera que los lotes de semilla de los tres híbridos presentan una buena germinación. Los porcentajes de germinación a los cuatro días fueron altos indicando que las semillas presentan un buen vigor. Al hacer el análisis de la microbiota presente en las semillas de los híbridos de maíz en estado de MACO se encontraron los hongos *Fusarium* spp., *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp. (*A. niger* y *A. flavus*) *Acremonium* y *Rhizopus*. Se relacionó la germinación de las semillas a los siete días con la microbiota total (MT) y la microbiota individual (MI) y no se encontró efecto de la microbiota sobre la germinación.

Palabras Claves: Germinación, vigor, maíz, *Fusarium* sp., *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp., *Acremonium* sp. y *Rhizopus*.

## I. INTRODUCCIÓN

La siembra de semillas de óptima calidad es el punto de partida para lograr un buen cultivo. Para determinar la calidad de la semilla se consideran los componentes genético, físico, fisiológico y sanitario (Cerovich y Miranda, 2001). Cumplir con todos ellos es prioritario para garantizar un alto estándar de calidad de la semilla, por lo que durante todo el proceso de producción se debe mantener un manejo adecuado para evitar cualquier efecto que vaya en detrimento del producto final.

La calidad fisiológica se determina por el porcentaje de germinación y el vigor de las semillas, que representan la cantidad de plántulas con condiciones de establecerse en el campo en condiciones favorables. La micobiota presente en la semilla puede afectar la calidad fisiológica ya que además de constituir un eficiente vehículo de diseminación de plagas y enfermedades en nuevas áreas de cultivo, puede causar disminución de la densidad de plantas por pudrición de la semilla o muerte de plántulas durante la emergencia (McDonald, 1994).

En el maíz, entre el grupo de hongos que reducen la germinación y emergencia en campo se encuentran *Aspergillus* (*A. glaucus*, y *A. níger*), *Penicillium*, *Colletotrichum graminícola*, *Stenocarpella maydis* y *Fusarium*. (Warren y Nicholson, 1975; Nwigwe, 1974; McGee, 1988). En cuanto a este último existen controversias respecto a su efecto sobre la germinación (Munkvold *et al.*, 1997; Styer y Cantliffe, 1984; Yates *et al.*, 1997; Naik *et al.*, 1982).

Con el objetivo de contribuir en el conocimiento del efecto de la micobiota en el sistema de producción y certificación de semillas se evaluó la influencia de la micobiota natural sobre la calidad sanitaria y fisiológica de la semilla híbrida de maíz.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

Las semillas constituyen un elemento muy importante en la producción agrícola de un país, ya que son las portadoras del potencial genético para lograr cosechas de altos rendimientos y de buena calidad; en general son la unidad de supervivencia y propagación de cualquier especie vegetal.

La calidad de la semilla es un concepto que comprende diversos factores agrupados en cuatro componentes; uno genético referido a la identidad genética; un componente físico que se refiere a la pureza física de la semilla; uno fisiológico que corresponde al potencial de germinación y vigor de la semilla y por último el sanitario relacionado con la presencia de plagas y enfermedades transmisibles por semilla (MAC, 1961, Popinigis, 1977).

En la producción de semillas de alta calidad el vigor junto con el porcentaje de germinación juega un papel importante dentro de los componentes de la calidad fisiológica (Hampton y Coolbear, 1990). El vigor de germinación es definido como todas las propiedades de la semilla que determinan el potencial para una emergencia rápida y uniforme y el desarrollo de plántulas normales bajo un amplio rango de condiciones de campo. La base biológica para el concepto y pruebas de vigor de la semilla lo constituye el proceso de deterioro que conduce a la reducción de la calidad de la misma. Entre los factores que promueven el deterioro de la semilla se encuentran los ambientales y los biológicos, considerándose dentro de estos últimos la microbiota patogénica transportada en la semilla (McDonald 1998).

Los patógenos pueden reducir el vigor de la semilla directamente afectando la germinación, o indirectamente por limitar la habilidad de la misma en la producción de una plántula con desarrollo normal. Igualmente, de semillas con diferentes niveles de infección pueden resultar una gran proporción de plántulas con crecimiento anormal que puede persistir después de la emergencia, reduciendo la capacidad de

crecimiento del cultivo (Neergaard, 1979). Así mismo, la calidad de la semilla frecuentemente afecta el tamaño de plántulas después de la emergencia y esta diferencia puede permanecer hasta la cosecha afectando al cultivo (Finch-Savage, 1995).

Una planta enferma se ve afectada indirectamente desde el punto de vista fisiológico en su desarrollo y en la maduración de sus semillas, dando lugar a semillas arrugadas o malformadas cuyo potencial de germinación puede reducirse o perderse completamente; cuando el efecto es directo, la semilla está enferma, por lo que se puede ver afectada su viabilidad y apariencia; adicionalmente, el patógeno puede ser transmitido por la semilla (Neergaard, 1979).

Munkvold *et al.* (1997) y Styer y Cantliffe (1984) señalan que *F. verticillioides* afecta la germinación y crecimiento de plántulas de maíz encontrando que semillas con alta incidencia de este patógeno pueden dar lugar a baja germinación o a plántulas seriamente afectadas. En cambio Yates *et al.* (1997), Naik *et al.* (1982) encontraron poca influencia de éste sobre la germinación. Rheeder *et al.* (1990) señalan que *Fusarium* spp. tiene poca influencia sobre la germinación. Galli *et al.* (2005) encontraron que *F. graminearum* no afectó la germinación ni el vigor de las semillas de maíz. Moraes *et al.* (2003) demostraron que *F. verticillioides* no afecta la calidad fisiológica de las semillas.

Los *Aspergillus* (*A. glaucus*, y *A. níger*), reducen la germinación por invasión del embrión y ocasionan semillas decoloradas y arrugadas. El género *Penicillium* produce granos mohosos, pudrición en almacenamiento y decoloración de la semilla. Estos patógenos producen micotoxinas que causan marchitez de plántulas (McGee, 1988). Peixoto *et al.* (1998) demostraron que *Fusarium*, *Aspergillus* y *Penicillium* no afectan el vigor ni la germinación de las semillas de maíz.

*Colletotrichum graminicola* reduce la germinación y emergencia en campo (Warren y Nicholson, 1975). Respecto a *Macrophomina phaseolina*, *Curvularia* sp., *Ustilagoideia virens*, *Cladosporium* sp. y *Rhizoctonia solani*, no se han registrado efecto sobre la germinación de las semillas. La raza T de *Bipolaris maydis* reduce la germinación de la semilla (Kommedahl y Lang, 1971), mientras la raza O no produce ningún efecto sobre la calidad de la semilla y no hay evidencias de su transmisión. En el caso del mildiú lanoso o falsa punta loca, producido por *Sclerophthora macrospora*, no se ha observado efecto sobre la calidad de la semilla. (Rao *et al.*, 1985), *Stenocarpella maydis* (*Diplodia maydis*) reduce la germinación y causa marchitamiento en plántulas (Nwigwe, 1974).

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

Para evaluar la influencia de la micobiota natural sobre la calidad fisiológica de la semilla se colectaron muestras en la etapa de MACO (Anexos 1.1, 1.2, 1.3) de tres híbridos: Himeca 3002 en La Cuarta, en época de lluvia, DANAC-3273 y Sefloarca 91, en el Valle de Tucutunemo en época de lluvia y norte-verano, respectivamente.

Las muestras colectadas se dividieron en submuestras que fueron llevadas al Laboratorio de semilla del Departamento de Agronomía en la Facultad de Agronomía de la UCV, para realizar las pruebas de germinación y vigor utilizando el protocolo de la ISTA (1993). Cuatrocientas semillas muestreadas al azar, fueron divididas en cuatro repeticiones de 100 semillas, para cada híbrido y época de siembra. Se utilizaron cuatro bandejas, con cuatro capas de papel Sutil blanco humedecido con agua destilada y cubiertas con dos capas adicionales del mismo tipo de papel. Las bandejas, se incubaron en el cuarto de germinación a temperatura promedio de  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$  y humedad relativa entre 70 y 80% por siete días. Se realizaron dos conteos: el primero a los cuatro días después de sembrado (DDS) contabilizando plántulas normales y un segundo contaje a los siete DDS, acorde a lo establecido en ISTA, (1993).

El vigor de las semillas se determinó utilizando el porcentaje de plántulas normales del primer conteo de la prueba de germinación estándar (cuatro DDS), según el protocolo de McDonald (1994). Este valor representa la población de semillas con rápida germinación (AOSA, 2002). Las pruebas de germinación y vigor fueron realizadas bajo un diseño completamente al azar con cuatro repeticiones de 100 semillas cada una. Los datos de germinación y vigor fueron sometidos a análisis de varianza y prueba de Tukey utilizando el programa Statistix 8.0.

Una segunda evaluación de la germinación fue realizada cuando se determinó la micobiota presente en la semilla en MACO. Para ello se utilizó la emergencia de la

radícula como indicador de germinación. Se recolectaron 25 mazorcas en campo mediante un muestreo sistemático entre hileras y al azar dentro de las hileras. De cada mazorca se tomaron al azar 20 semillas. Las semillas fueron desinfectadas sumergiéndolas en una solución de hipoclorito de sodio al 2% por tres minutos. Luego se colocaron sobre el medio de PDA incubándolas por un periodo de 7 días a 28 °C, en concordancia con el método de la placa de agar, ISTA (1993). Se registró la MT, MI y emergencia de radícula

Los resultados fueron analizados mediante la prueba de chi-cuadrado utilizando el programa Statistix 8.0 para establecer el efecto de la MT y de la MI sobre la germinación.

#### IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en la prueba de germinación estándar fueron sometidos a un análisis de varianza (Cuadro 3.1) encontrándose que no hay diferencias significativas en la germinación entre los híbridos, sin embargo si hay diferencias para el vigor de las semillas.

**Cuadro 3.1.** Análisis de varianza (valores de F) para un diseño completamente al azar, de la germinación y el vigor de las semillas de los híbridos Himeca 3002, DANAC 3273 sembrados en época de lluvia en la Cuarta y Valle de Tucutunemo respectivamente y Sefloarca 91 sembrado en norte verano en el valle de Tucutunemo.

Fuentes de variación	Valores de F	
	Germinación	Vigor
Hibrido	3,70 <sup>ns</sup>	11,6**
CV %	2,08	4,35

<sup>ns</sup> (p > 0,05); \* (p < 0,05); \*\* (p < 0,01). CV: Coeficiente de variación

El Cuadro 3.2 presenta el porcentaje promedio de germinación de las semillas de los tres híbridos. Los porcentajes fueron superiores al 88%, valor mínimo de germinación establecido en las normas de certificación (MAC-FONAIAP, 1977). La germinación a los 4 días como índice de vigor muestra que el híbrido Himeca 3002 presentó menor vigor que los híbridos DANAC 3273 y Sefloarca 91. Los altos valores en todos los casos indican que la MN encontrada no afectó la germinación ni el vigor de las semillas evaluadas. Estos resultados coinciden con lo obtenido por Peixoto *et al.* (1998) quienes encontraron que *Fusarium*, *Aspergillus* y *Penicillium* no afectan el vigor ni la germinación de las semillas de maíz.

El Cuadro 3.3 presenta los valores de chi-cuadrado para la relación entre la germinación con la MT y MI encontrado en las semillas de maíz en MACO. Los hongos encontrados fueron *Fusarium* spp., *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp. (*A. niger* y *A. flavus*) y *Acremonium*. La relación entre la germinación de las semillas con la MT y MI a los siete días no mostró efecto en los híbridos.

**Cuadro 3.2.** Porcentaje promedio de germinación y vigor de semilla de los híbridos Himeca 3002, DANAC 3273 producida época de lluvia en la Cuarta y valle de Tucutunemo respectivamente, y Sefloarca 91 sembrado en época de norte verano en el Valle de Tucutunemo.

Hibrido	Germinación	Vigor
Himeca 3002	95.25 a	83.25 b
DANAC 3273	94.00 a	92.75 a
Sefloarca 91	97.75 a	96.25 a

Germinación (% de germinación a los 7 días), Vigor (% germinación a los 4 días)  
Medias con diferente letra difieren significativamente entre si a  $P < 0,05$ .

**Cuadro 3.3.** Valores de  $X^2$  (chi cuadrado) para la relación de la germinación de los híbridos Himeca 3002, DANAC 3273 y Sefloarca 91 con la incidencia de micobiota total (MT) y micobiota individual (MI).

Hibrido	MT	MI				
		<i>Fusarium</i>	<i>Penicillium</i>	<i>A. flavus</i>	<i>A. niger</i>	<i>Acremonium</i>
Himeca 3002	0,9 <sup>ns</sup>	1,63 <sup>ns</sup>	0,62 <sup>ns</sup>	0,03 <sup>ns</sup>	0,06 <sup>ns</sup>	1,32 <sup>ns</sup>
DANAC 3273	3,45 <sup>ns</sup>	1,05 <sup>ns</sup>	6,82 <sup>**</sup>	-	-	0,12 <sup>ns</sup>
Sefloarca 91	0,06 <sup>ns</sup>	0,21 <sup>ns</sup>	0,26 <sup>ns</sup>	-	-	-

<sup>ns</sup> ( $P > 0,05$ ); \* ( $p < 0,05$ ); \*\* ( $p < 0,01$ )

Al analizar los resultados obtenidos en el Cuadro 3.3, se puede ver que el género *Fusarium* no afectó la germinación de las semillas tal como ha sido señalado por numerosos investigadores entre los cuales se encuentran Yates *et al.* (1997), Naik *et al.* (1982), Moraes *et al.* (2003) quienes demostraron que *F. verticillioides* no afecta la calidad fisiológica de las semillas de maíz. Investigadores como Rheeder *et al.* (1990) indicaron que *Fusarium* spp. no afecta la germinación; Galli *et al.* (2005) determinaron que *F. graminearum* tampoco afecto la germinación ni el vigor de las

semillas de maíz. Otros investigadores han indicado efectos contrarios sobre la germinación tales como Munkvold *et al.* (1997) y Styer y Cantliffe (1984) señalando que *F. verticillioides* afecta la germinación y crecimiento de plántulas de maíz, encontrando que semillas con alta incidencia de este patógeno pueden dar lugar a baja germinación o a plántulas seriamente afectadas.

Los otros géneros encontrados no afectaron el vigor ni la germinación de las semillas de maíz, tal como fue citado por Peixoto *et al.* (1998), los que difieren de McGee (1988) y Mycock (1990) quienes señalan que *Aspergillus* y *Penicillium* reducen la germinación y el vigor de las semillas, mientras que *Acremonium* no la afecta.

Qasen y Christensen (1958) señalaron que *Aspergillus* disminuye la germinación de las semillas maíz en almacenamiento. Keromnes y Thouvenot (1985) afirman que *Penicillium* spp. inhibe la germinación de maíz. Cantone *et al.* (1983) determinaron que la germinación de las semillas inoculadas con *Aspergillus* y *Penicillium* se mantuvo alta y que hay pérdida significativa de la germinación cuando son almacenadas en condiciones favorables para el crecimiento del hongo, esta pérdida es causada por la invasión de la semilla. Estos mismos autores señalan que *A. glaucus* y *Penicillium* no causan una rápida disminución de la germinación cuando la penetración y la invasión del embrión es insignificante. Lo señalado por Cantone *et al.* (1983) explica los resultados obtenidos ya que las semillas fueron evaluadas sin ser sometidas a un periodo de almacenamiento.

## **V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

La microbiota natural presente en las semillas no afecta la germinación y el vigor de las semillas.

## VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AOSA (2002): Seed Vigour Testing Handbook, Contribution No. 32 to the Handbook of Seed Testing, Association of Official Seed Analysts, NE, USA.
- CANTONE, F.A.; J. TUIITE; L. F. BAUMAN y R. STROSHINE. 1983. Genotypic differences in reaction of stored corn kernels to attack by selected *Aspergillus* and *Penicillium* spp. *Phytopathology* 73: 1250-12
- CEROVICH, M. y F. MIRANDA. 2001. Sanidad de semillas. Componente básico de la calidad. *In*: Subero, LJ. Patología de semillas XVII Congreso Venezolano de Fitopatología. Maracay
- FINCH-SAVAGE, W. 1995. Influence of seed quality on crop establishment, growth, and yield. *In*: Basra, A. Seed quality, basic mechanisms and agricultural implications. Food Products Press. New York. US.
- GALLI, J. A., S. A. FESSEL y R. C. PANIZZI. 2005. Effect of *Fusarium graminearum* infection index on germination and vigor of maize seeds. *Fitopatologia Brasileira* 30:470-474.
- HAMPTON, J. y P. COOLBEAR. 1990. Potential versus actual seed performance Can vigor testing provide an answer? *Seed Science and Technology* 18: 215-228.
- INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION (ISTA). 1993. International Rules for Seed Testing. *Seed science and Technology. Supplement* 21. 288 p.
- KEROMNES J. y D. THOUVENOT. 1985. Role of Penicillic Acid in the phytotoxicity of *Penicillium cyclopium* and *Penicillium canescens* to the germination of corn seeds. *Appl Environ Microbiol* [En línea] 49(3): 660-663.
- KOMMEDAHL, T. y D. S. LANG. 1971. Seedling wilt of corn from kernels naturally infected with *Helminthosporium maydis* in Minnesota. *Plant Disease Reporter*, 55: 371-373.
- MCDONALD, M. 1994. Seed germination and seedling establishment. *In*: Bennett, B., Sinclair y P. Sen: *Physiology and Determination of Crop Yield*. American Society of Agronomy, Crop Science Society of America and Soil Science Society of America. Madison, US.
- MCDONALD, M. B. 1998. Seed quality assessment. *Seed Science and Technology* 8:265-275.

- MCGEE, D.C. 1988. Maize diseases. A reference source for seed technologists. St. Paul, Minnesota, US. P. 149.
- MINISTERIO DE AGRICULTURA Y CRÍA (MAC). 1961. Resolución MAC-INV-71. Normas específicas para la Certificación de Semillas en Venezuela. Caracas, Venezuela.
- MINISTERIO DE AGRICULTURA Y CRÍA – FONDO NACIONAL DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS (MAC- FONAIAP). 1977. Resolución Reglamentaria sobre Certificación de Semillas Requisitos para la Producción de Semillas Certificadas. FONAIAP-CENIAP, Maracay. VE. 56 pp.
- MORAES, M.H.D., J.O.M.MENTEN; J.C. GRAVENA y C.A. ALVES. 2003. Controle químico de *Fusarium moniliforme* em sementes de milho: metodologia de avaliação e efeitos sobre a qualidade fisiológica. Fitopatologia Brasileira 28: 626-632.
- MUNKVOLD, G. P.; D. V. MCGEE y W. M. CARLTON. 1997. Importance of different pathways for maize kernel infection by *Fusarium moniliforme*. Phytopathology. 87: 209-217.
- MYCOCK, D. J. 1990. A study of some of the inter-relationships between maize and the seed storage fungi as typified by *Aspergillus flavus* var. *columnaris*. University of Natal. 482 pág.
- NAIK, D.M.; I.N., NAWA y R.H. RAEMAEEKERS. 1982. Absence of an effect from internally seed-borne *Fusarium moniliforme* on emergence, plant growth and yield of maize. Seed Science and Technology 10(2) p. 347-356
- NEERGAARD, P. 1979. Seed Pathology. Ed. Rev. The McMillan Press. LTD. London. 839p.
- NWIGWE C. 1974. Effect of *Diplodia zae* and *Phomopsis* on the germination of seeds of maize (*Zea mays*). Plant Disease Reporter, 58: 414-415.
- PEIXOTO, R. S.; S. B. TORRES y M. KARASAWA. 1998. Qualidade sanitária e fisiológica de sementes de milho produzidas no sub-médio São Francisco. Revista Brasileira de Sementes, Brasília, v.20, n.1, p.12-15.
- POPINIGIS, F. 1977. Fisiologia da semente. AGRIPAN. Brasilia, Brasil. 289 p.
- QASEM y C, M. CHRISTENSEN. 1958. Influence of moisture content, temperature, and time on the deterioration of stored corn by fungi. Phytopathology 48: 544-549

- RAO, B, MURALIDHARA, H. S. PRAKASH, H. S. SHETTY y K. M. SAFEEULLA. 1985. Downy mildew inoculum in maize seeds: techniques to detect seed-borne inoculum of *Peronosclerospora sorghi* in maize. *Seed Sci AND Technol.*, 13: 593-600.
- RHEEDER JP, MARASAS WFO y VAN WYK PS. 1990. Fungal association in corn kernels and effects on germination. *Phytopathology* 80, 1314.
- STYER R.C., D. J. y CANTLIFFE. 1984. Infection of Two Endosperm Mutants of Sweet Corn by *Fusarium moniliforme* and its effect on seedling vigor. *Phytopathology* 74:189-194.
- WARREN, H. L. y R. L. NICHOLSON. 1975. Kernel infection, seedling blight and wilt of maize caused by *Colletotrichum graminicola*. *Phytopathology* 65: 620-623.
- YATES, I. E., C. W. BACON y D. M. HINTON. 1997. Effects of endophytic infection by *Fusarium moniliforme* on corn growth and cellular morphology. *Plant Dis.* 81:723-728.

## CAPITULO IV

### EFICACIA DEL TRATAMIENTO CON FUNGICIDAS PARA CONTROLAR LA MICOBIOTA EN SEMILLAS HÍBRIDAS DE MAÍZ.

El tratamiento pre-siembra con Carboxin+Thiram es el principal método para controlar patógenos en semilla de maíz, pero los vigentes problemas de calidad sanitaria justifican evaluar la eficacia del tratamiento con fungicidas para controlar la micobiota en semillas híbrida de maíz. En laboratorio, se evaluó la eficacia de los fungicidas Carboxin+Thiram, Captan, Myclobutanil, Carbendazim, Benomyl, aplicados a semillas del híbrido Himeca 3002 en dosis comerciales. Cuatro repeticiones de 100 semillas de maíz del híbrido citado fueron sembradas en cajas de Petri con PDA y arregladas en un diseño completamente al azar. La incidencia de la micobiota total (MT) e individual (MI) fue registrada. En campo, semilla del híbrido DANAC-3273 fue producida en dos lotes en época de lluvia en el Valle de Tucutunemo. El primer lote recibió tres aplicaciones foliares de 250 g/ha. de Benomyl, y en el segundo (Testigo), no se aplicó fungicida. La incidencia de MT y MI en follaje y semillas en desarrollo durante las etapas R2, R4, MAFI y MACO, se evaluó mediante muestreo sistemático entre hileras y al azar dentro de la hilera. El efecto del fungicida sobre la calidad sanitaria de semillas en MAFI y MACO fue estimado por el porcentaje de semillas infectadas en caja de Petri con PDA, y la calidad fisiológica mediante pruebas de germinación estándar y vigor según ISTA (1993). Los resultados de laboratorio para semillas del híbrido Himeca 3002 presentaron alta incidencia de *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, y menor para *Curvularia*, *Helmintosporium*, *Acremonium* y *Rhizopus*. Todos los fungicidas usados redujeron la incidencia de la MT pero Benomyl, registró el mejor control con un 3% de incidencia, seguido por el grupo Carbendazim (25%), Captan (87,5%) y Carboxin+Thiram (87,25%). Con Myclobutanil la incidencia de *Penicillium* fue mayor que la del testigo, presumiblemente por efecto del fungicida. En las etapas MAFI y MACO la MT y MI consistió de los géneros *Fusarium*, *Penicillium*, *Aspergillus* y *Acremonium*. En campo, las aplicaciones foliares con Benomyl mejoraron la calidad sanitaria de la semilla al reducir la incidencia de *Fusarium* y otros patógenos de la MT. Además, la excelente germinación y vigor de las semillas (>88%) confirmó que los altos niveles de inóculo de la MT no afectan la calidad fisiológica de la SCM experimentalmente producida. En MACO, la incidencia de *Penicillium* en semillas de plantas tratadas con fungicida, fue mayor que en las no tratadas, sugiriendo un efecto colateral del Benomyl por verificar.

**Palabras claves:** semillas de maíz, micobiota natural, calidad sanitaria, control con fungicidas, Benomyl.

## I. INTRODUCCIÓN

Las semillas de maíz son importantes fuentes de inóculo de innumerables patógenos, algunos de los cuales pueden ser transmitidos por la semilla. Los géneros más reportados a nivel mundial y nacional son *Fusarium*, *Aspergillus* y *Penicillium*, porque infectan mazorcas y granos de maíz en el campo y pueden generar micotoxinas altamente tóxica para los humanos y animales, llegando a ser cancerígenas (McGee, 1988;; Mazzani y Borges, 1993; Mazzani *et al.*, 2000; Malaguti, 2000; Mazzani *et al.*, 2001; Da Silva, 2005; Díaz 2006; Díaz *et al.*. 2007; Khosravi *et al.* 2007 y Rondon *et al.*, 2011). Estos hongos pueden ser transmitidos por la semilla, por lo que es importante desarrollar medidas de control que permitan disminuir la incidencia de los mismos (McGee, 1988; Cerovich y Miranda, 2001 y Da Silva, 2005).

La microbiota transmitida por semilla puede ser controlada con el uso de fungicidas en los campos de producción o mediante el tratamiento de semillas con fungicidas antes de la siembra. El tratamiento de semillas pre-siembra se mantiene como la práctica más usada y su objetivo es la eliminación de los posibles patógenos que tenga la semilla y producción de plántulas sanas (Maude, 1996). En Venezuela el producto comercial más utilizado en el tratamiento de semillas es el Carboxin+Thiram, lo que indica la necesidad de identificar otros fungicidas sistémicos o de contacto que aplicados a la semilla aporten mejor eficacia en el control de la microbiota natural y utilizados en el campo mejoren el control de infecciones foliares y de la semilla antes de la cosecha (Miranda, 1981; McGee, 1988 y Cerovich y Miranda, 2001). Debido a la importancia del contexto descrito, se planteo el objetivo de evaluar la eficacia del tratamiento con fungicidas para controlar la microbiota en semillas híbrida de maíz en ensayos de laboratorio y campo.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

Las enfermedades del maíz al igual que las de otros cultivos varían en severidad dependiendo del organismo causal, genotipo de la planta y de las condiciones ambientales donde se desarrolla el cultivo. Uno de los principales objetivos del estudio de las enfermedades es desarrollar medidas de control de las mismas, para lo que se aplican una serie de procedimientos con el fin de eliminar o reducir los daños y las pérdidas causadas por los patógenos. La total erradicación de las enfermedades no es económicamente factible, de tal manera que se debe tratar de minimizar las pérdidas a través de un manejo integrado, el cual debe comenzar en el campo de producción reduciendo el inóculo del patógeno.

El tratamiento de los cultivos y de las semillas con fungicidas es una práctica muy utilizada para controlar la incidencia de patógenos en la semilla y disminuir la micobiota presente y así lograr mejorar la calidad sanitaria y disminuir la incidencia de las enfermedades en los ciclos de producción (Maude, 1996).

Los fungicidas para el tratamiento químico de semillas actúan de forma diferente y pueden ser divididos en dos grupos, no sistémicos y sistémicos. Los fungicidas no sistémicos o de contacto son aquellos que tienen una limitada penetración en el tejido cuando son aplicados a la superficie de la semilla y generalmente no se mueven dentro del tejido; su función es proteger a la semilla contra la invasión de hongos del suelo por cortos periodos de tiempo. En países en vía de desarrollo, casi todas las semillas de maíz, algodón, sorgo y hortalizas son tratadas con fungicidas no sistémicos de amplio espectro como Captan y Thiram, para la protección contra hongos transportados en la semilla y del suelo durante la emergencia en el campo. Estos dos fungicidas se mueven dentro de la cubierta de la semilla pero no penetran al embrión por lo que son efectivos sobre hongos que se encuentran en la cubierta de la misma (Miranda, 1981; Maude, 1996).

Los fungicidas sistémicos son absorbidos por el embrión de la semilla cuando comienza el proceso de germinación, se dispersa por toda la plántula controlando los patógenos, por lo que pueden prevenir el desarrollo de la enfermedad en tejidos lejos del sitio de aplicación; su función es principalmente como curativo, erradicante y con algunas propiedades protectantes. Estos fungicidas tienen la característica de que son selectivos para grupos taxonómicos particulares con un estrecho rango de acción y una relativa facilidad para el desarrollo de resistencia del hongo; controlan infecciones profundas en las semillas y pueden proteger a las plántulas contra la infección por algunas semanas durante el ciclo del cultivo (Miranda, 1981 y Maude, 1996).

En el tratamiento de semillas se utilizan uno o varios fungicidas elegidos de acuerdo al rango de organismos que quieren ser controlados. Hay combinaciones de fungicidas donde se mezclan no sistémicos con sistémicos para lograr la erradicación de las esporas superficiales y el micelio de la cubierta de la semilla, para protección de los hongos del suelo, además de controlar los patógenos internos y proteger a la plántula de las infecciones foliares iniciales causadas por hongos diseminadas por el viento como mildiu y royas (Maude, 1996).

Wilson *et al.* (1993) determinaron que la mezcla de protectantes como Thiram, Metalaxyl o Captan-Thiram y un sistémico de amplio espectro, como Benomyl o Benzimidazole resulta la formulación más efectiva en el tratamiento de semillas para el establecimiento en campos de maíz. Carvalho *et al.* (2005) probando la eficiencia de varios fungicidas en el control de la flora fúngica transportada por semillas de maní, encontraron que los tratamientos que controlaron mayor número de colonias de hongos en el laboratorio fueron Carboxin-Thiram y Carboxin- Thiram + Tolclofos metil o Carbendazin; además llegaron a inhibir totalmente a *Aspergillus flavus* y fueron eficientes controlando a *A. niger*. Pinto (2000a) encontró que los tratamientos con Thiram + Thiabendazole o Carboxin + Thiram fueron mas eficientes en el control de *F. moniliforme* var. *subglutinans* asociado a la semilla de maíz que Captan,

Thiram y Thiabendazole solos. En otro trabajo, el mismo autor señaló que Tolifluanid + Carbendazim fue el tratamiento más eficiente en el control de *Fusarium moniliforme*, *Aspergillus* spp. y *Penicillium* spp. (Pinto, 2000b)

En el caso del maíz la mayoría de las semillas sembradas en Estados Unidos son tratadas con una formulación de Fludioxonil y Mefenoxam o Captan en combinación con Metalaxil. Munkvold y O'Mara (2002) probaron la eficacia de los fungicidas Captan, Difenconazole, y Fludioxonil sobre seis especies de *Fusarium* encontrando que los tres fungicidas logran reducir la colonización y la pudrición de semillas y radículas en plántulas. Igualmente, determinaron que el Difenconazole fue el más efectivo en la prevención de la colonización de la semilla por este patógeno. Yates *et al.* (2003) comparando la eficacia de Plantpro-45 y Captan en el control de la pudrición de semillas causada por *Fusarium verticillioides* no encontraron diferencias entre ambos fungicidas.

Gonzales (2002) señala el tratamiento de semillas con los fungicidas Captan, Thiram, Metalaxyl o Pentacloronitrobenzeno (PCNB) como medidas de control para las pudriciones en semillas y plántulas en maíz. Bacon *et al.* (2001) indican que el control, prevención y detección de hongos endofíticos como *F. moniliforme* es difícil, ya que los fungicidas convencionales no son efectivos y que la aplicación de fungicidas sistémicos en los estados tardíos de crecimiento de la planta es imposible por que la infección de la semilla es sistémica.

En pruebas realizadas por Miranda (1981) en el cultivo de la soya para la producción de semillas libres de patógenos se concluyó que el Benomyl aplicado a los 45 días y antes de la madurez de cosecha incrementa la productividad, reduce la infección de las semillas y mantiene la viabilidad de las semillas durante la cosecha tardía.

En Venezuela el producto comercial más utilizado en el tratamiento de semillas es el Carboxin+Thiram, fungicida protector de semillas y plántulas que combina la acción sistémica del Carboxin con la de contacto del Thiram. Por su acción sistémica el Carboxin se moviliza de la semilla a la plántula, asegurando un control más prolongado y protección en las primeras etapas de desarrollo vegetativo. El fungicida también impide la pudrición y muerte de semillas y plántulas causadas por *Rhizoctonia solani*, *Fusarium* sp., *Pythium* sp., *Bipolaris* sp., *Sclerotinia* sp., hongos del suelo y además específico para varias especies del género *Ustilago*. Otro fungicida utilizado en la desinfección de semillas es el Captan, de acción preventiva y de contacto, el cual interfiere en el mecanismo de respiración por lo que inhibe la germinación de las esporas y dificulta el crecimiento y desarrollo del micelio. Sirve para controlar un amplio rango de enfermedades causadas por hongos tales como: *Pythium*, *Phoma*, *Rhizoctonia*, *Botrytis*, *Phytophthora*, y *Alternaria*.

Entre los fungicidas sistémicos recomendados para el tratamiento de semillas están Carboxin, Carbendazim, Myclobutanil y Benomyl. Controlan enfermedades ocasionadas por hongos imperfectos, Ascomicetos y algunos Basidiomicetos en semillas de cereales. Son absorbidos a través de raíces y hojas, de donde se trasladan en forma apoplástica (con la transpiración) y acropétala (del centro a los bordes). Su acción es preventiva y curativa, controlando a los hongos patógenos antes de su penetración en las plantas, o bien cuando la infección recién se ha producido. El Benomyl y el Carbendazim actúan impidiendo la formación del huso acromático a nivel de la profase y la culminación de la división celular, lo que causa la detención del crecimiento micelial y división celular; por lo que inhibe el desarrollo de los tubos germinativos, la formación de apresorios y el desarrollo del micelio evitando el establecimiento dentro del tejido, dando así protección a las plantas de posibles infestaciones.

Myclobutanil, actúa inhibiendo la síntesis del ergosterol. El Benomyl se transloca por el apoplasto y se acumula en los extremos de las hojas, en ellas el

movimiento se realiza hacia los bordes (Marsh, 1977). El uso continuo y exclusivo de Benomyl, puede llegar a seleccionar razas resistentes del hongo y producir controles deficientes. Por ello, se recomienda establecer un programa de aplicaciones alternadas o en mezcla con otros fungicidas de diferente modo de acción. Los mejores resultados se obtienen cuando se aplica al aparecer los primeros síntomas; es decir, inmediatamente antes o después del primer período de infección (Agroisleña. 2006). Decallonne y Meyer (1972) estudiando en el efecto de Benomyl sobre los conidios de *Fusarium oxysporum* encontraron que era rápidamente absorbido disminuyendo el contenido de ARN y en concentraciones elevadas, inhibía la respiración.

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

Para evaluar la eficacia de los fungicidas sistémicos sobre la micobiota de semilla de maíz se condujo un experimento en laboratorio y uno en campo.

#### 1 Experimento de laboratorio.

Para evaluar el efecto de cinco fungicidas y un testigo sobre la micobiota presente en semillas del híbrido Himeca 3002 se mezclaron 500g de semillas con las dosis recomendadas comercialmente (Cuadro 4.1) hasta obtener una cobertura completa. Las semillas se colocaron en cajas de Petri con PDA, incubándose durante siete días a temperatura ambiente (Neergaard, 1977). Para cada tratamiento se utilizaron cuatro repeticiones de 100 semillas cada una, dispuesta en un diseño completamente al azar. La micobiota se identificó con base a sus características morfológicas y comparaciones con claves micológicas (Booth, 1971; Booth, 1977; CMI, 1964; Ellis, 1971 y Sivanesan, 1987).

**Cuadro 4.1:** Fungicidas y dosis aplicada a semillas de maíz del híbrido Himeca 3002 para el control de la micobiota natural.

<b>Fungicida</b>	<b>Nombre comercial</b>	<b>Dosis (*)</b>
Carboxin + Thiram	Vitavax 200	200 cc
Captan	Captan 50 PM	350 g
Myclobutanil	Rally 40-WP	250 g
Carbendazim	Curacarb 500 SC	300 cc
Benomyl	Funlate WP	250 g
Testigo	Ninguno	

(\*) Dosis recomendada para 100 kg de semilla

El número total de semillas que presentaron uno o más colonias fue registrado como micobiota total (MT) y las correspondientes a especies individuales como micobiota individual (MI). Los resultados fueron expresados en porcentaje y sometidos a análisis de varianza para diseño completamente al azar. Los promedios

fueron comparados mediante prueba de Tukey al 5%, utilizando el programa Statistix 8.0.

## **2 Experimento de campo.**

El experimento de campo se llevo a cabo en una finca productora de semillas de maíz ubicadas en el Valle de Tucutunemo del estado Aragua, en época de lluvia (abril-agosto, 2007). Dentro del campo, sembrado con el híbrido DANAC-3273, se marcaron dos parcelas de diez hilos de 50 m de largo cada uno. En la primera parcela, durante las etapas VT (61 DDS), R2 (75 DDS) y R4 (89 DDS), se hicieron aspersiones de Benomyl a razón de 250 g/h en cada aplicación y 15 días de separación entre ellas, respectivamente. La segunda parcela fue el tratamiento testigo porque no se realizó ninguna aplicación.

### **2.1 Incidencia de la micobiota en follaje**

La incidencia de enfermedades en follaje fue evaluada en las etapas R2, R4 y R6 (105 DDS) mediante tres muestreos sistemáticos entre hileras y al azar dentro de la hilera, ubicando 10 puntos por tratamiento. En cada punto de muestreo se evaluaron 10 plantas, para identificar las enfermedades presentes y su incidencia. Los datos registrados de incidencia de micobiota en el follaje de las plantas fueron transformados por la raíz cuadrada y sometidos al análisis de varianza y prueba de Tukey al 5% utilizando el programa Statistix 8.0.

### **2.2. Incidencia de la micobiota en las semillas en las etapas de madurez fisiológica (MAFI o R6) y madurez de cosecha (MACO)**

Para evaluar la efectividad del fungicida en el control de la micobiota en las semillas del híbrido DANAC 3273 se realizaron dos muestreos sistemáticos al azar de 10 mazorcas por tratamiento en las etapas reproductivas R6, (correspondiente a la

madurez fisiológica y en lo sucesivo se identificara como MAFI y MACO. Para determinar el nivel de infección de cada mazorca se tomaron 20 semillas al azar, colocándose en cajas de Petri con PDA siguiendo el protocolo ISTA (1993).

En las etapas de desarrollo MAFI y MACO la incidencia de la MT y MI fueron registradas y analizadas estadísticamente según la prueba no paramétrica Kruskal Wallis y las medias fueron comparadas con la prueba de rangos promedio de Kruskal-Wallis, utilizando el programa Statistix 8.0.

### **2.3. Efecto del tratamiento sobre la germinación de las semillas**

Con el objetivo de determinar si había algún efecto del fungicida sobre la germinación estándar y vigor (velocidad de germinación), las semillas colectadas en MACO fueron analizadas en el Laboratorio de semilla del Departamento de Agronomía en la Facultad de Agronomía de la UCV utilizando el protocolo de la ISTA (1993). Cuatrocientas semillas muestreadas al azar, divididas en cuatro repeticiones de 100 semillas para cada uno de los tratamientos fueron sembradas en cuatro bandejas e incubadas por siete días en el cuarto de germinación a temperatura promedio de  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$  y humedad relativa entre 70 y 80%. Se realizaron dos conteos: el primero a los cuatro días después de siembra (DDS) y el segundo a los siete DDS, acorde a lo establecido en ISTA (1993). Como índice de vigor se utilizó el porcentaje de plántulas normales del primer conteo de la prueba de germinación estándar (cuatro DDS), según el protocolo de McDonald (1994).

Los datos de germinación y vigor fueron sometidos a análisis de varianza para un diseño completamente al azar y las medias fueron comparadas mediante la prueba de t para dos muestras independientes utilizando el programa Statistix 8.0.

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 1. Experimento de laboratorio

En la evaluación de la micobiota natural presente en las semillas del híbrido Himeca 3002 la mayor incidencia fue de los géneros *Fusarium* y *Penicillium* y con menor frecuencia los géneros *Aspergillus*, *Curvularia*, *Helmintosporium*, *Acremonium* y *Rhizopus* por lo que se agruparon en la categoría *Otros* junto con aquellos hongos que no formaron estructuras reproductivas.

El análisis de varianza presentado en el Cuadro 4.2 reveló diferencias significativas al 0,01% entre los tratamientos, confirmando que los fungicidas utilizados poseen enormes diferencias de poder fungistático sobre *Fusarium*, *Penicillium* y *Otros* géneros de hongos individuales que infectan las semillas del Himeca 3002.

**Cuadro 4.2.** Análisis de varianza (valores de F) para un diseño completamente al azar, del efecto de los fungicidas sobre la incidencia de la MT y MI en semillas del híbrido del maíz Himeca 3002.

Fuentes de variación	Valores de F			
	MT	MI		
		<i>Fusarium</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Otros</i> <sup>(1)</sup>
Tratamientos	1014,0**	1506,0**	497,0**	12,7**
CV %	3,92	4,73	13,56	52,95

<sup>ns</sup> (P > 0,05); \* (P < 0,05); \*\* (P < 0,01). CV: Coeficiente de variación

<sup>(1)</sup> *Aspergillus*, *Curvularia*, *Helmintosporium*, *Acremonium*, *Rhizopus* y hongos que no esporularon

El Cuadro 4.3, presenta la separación de medias de tratamientos fungicidas para la MT y MI en semillas del híbrido Himeca 3002. En general los tratamientos con fungicidas disminuyeron la incidencia de la micobiota, lo que presuntamente resultaría en mejor calidad sanitaria de la semilla.

Para el testigo de MT el 3% de incidencia registrado para Benomyl demuestra una alta eficacia comparada con los cuatro restantes. Mientras que el peor fungicida es el Myclobutanil porque su grado de control es igual al testigo o sea nulo. Carbendazim muestra un modesto grado de control de MT respecto al Benomyl, aunque estadísticamente superó al realizado por Carboxin + Thiram y Captan.

El citado cuadro 4.3 también indica que Benomyl controló totalmente el inóculo de *Fusarium* (0% de incidencia) y en muy alto grado al de *Penicillium*, (0,25% de incidencia), aunque para *Penicillium* resultó estadísticamente igual al 1,5% de Carboxin + Thiram, 3,5% de Carbendazim y 6,0% de Captan. El fungicida Myclobutanil presentó 95% de semillas infectadas con *Penicillium*, comparadas con el 45,5% del Testigo sugiriendo un efecto estimulador del desarrollo del hongo que de acuerdo a Bollen (1982) estaría presuntamente asociado con grados de resistencia del patógeno al fungicida.

**Cuadro 4.3.** Incidencia promedio (%) de MT y MI en semillas del híbrido de maíz Himeca 3002, tratadas con cinco fungicidas y un control.

Fungicida	Porcentajes promedios (%)			
	MT	MI		
		<i>Fusarium</i>	<i>Penicillium</i>	Otros
Testigo	100,00 a	99,00 a	45,50 b	9,00 a
Carboxin + Thiram	87,25 b	85,75 b	1,50 c	3,25 bc
Captan	87,50 b	84,25 b	6,00 c	0,75 bc
Myclobutanil	96,50 a	2,25 d	95,00 a	0,00 c
Carbendazim	25,00 c	20,50 c	3,50 c	4,75 b
Benomyl	3,00 d	0,00 e	0,25 c	2,75 bc

Medias con diferente letra difieren significativamente entre si a  $P < 0,05$ .

Para el control de “Otros” hongos, Myclobutanil fue el mejor fungicida (0%), seguido de grupo estadísticamente igual formado por Captan (0,75%), Benomyl (2,75%) y Carboxin + Thiram (3,25%), luego Cabendazim (4,75%) y el testigo (9%) con el mayor porcentaje de incidencia estadístico y absoluto.

El resultado obtenido con Benomyl es semejantes al obtenido por Cappellini *et al.* (2005) quien probando ocho fungicidas encontraron que fue el mejor tratamiento para *Fusarium*, mientras que Captan no logró controlar a este hongo (Cuadro 4.3). Pinto (2000a) encontró que Carboxin + Thiram era mas eficiente que el Captan en el control de *Fusarium*. Por otra parte, Goulart (1993), Von Pinho (1995), Galli *et al.* (2000) y Alezones y González (2009) obtuvieron resultados diferentes a estos con una mayor eficiencia del Captan que Carboxin + Thiram en el control de *Fusarium*, *Penicillium* y *Aspergillus* que los otros tratamiento utilizados. Moraes *et al.* (2003) obtuvieron como resultado que la mezcla de Captan + Tiabendazol lograba controlar por encima del 90% a *Fusarium*. Moraes *et al.* (2003), Denucci *et al.* (1990) y Patricio *et al.* (1990) citados por Goulart (1993) demostraron la eficacia de Captan y Carboxin + Thiram para el control *Penicillium* sp. en semillas de maíz lo que coincide con los resultados obtenidos en esta investigación.

## **2. Experimento de campo**

Las aplicaciones foliares a los lotes de producción de semilla de maíz, permitieron evaluar la eficacia de Benomyl en el control de la micobiota en follaje y semillas en etapas de MAFI y MACO, así como su efecto sobre la calidad de la semilla estimada por la germinación estándar de las semillas cosechadas del híbrido de maíz DANAC 3273.

### **2.1. Incidencia de la micobiota en follaje**

El follaje de los parentales del híbrido presentó variada intensidad de la mancha por *Curvularia* debida al hongo *Curvularia* sp. El Cuadro 4.4 muestra que no había diferencias estadísticas entre los tratamiento con y sin fungicidas usados para controlar esta enfermedad en follaje de plantas ni entre las etapas de desarrollo

reproductivas (EtapRep), aunque si se presentaron diferencias significativas en la interacción de los tratamientos con y sin Benomyl y las EtapRep de las plantas

**Cuadro 4.4.** Análisis de varianza (valores de F) para incidencia de *Curvularia* en follaje de plantas de maíz de parentales del híbrido DANAC 3273, con y sin aplicación de Benomyl durante tres etapas de desarrollo reproductivo (EtapRep) en el Valle de Tucutunemo, en época de lluvias

Fuente de variación	Valores de F	
<b>Tratamiento</b>	1,36	(0,93) ns
<b>EtapRep</b>	0,91	(1,60) ns
<b>Interacción</b>	5,87	(5,59)**
<b>CV (%)</b>	32,6	(16,8) <sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup>: Transformación  $\sqrt{\quad}$  de los valores.

ns ( $P \geq 0,05$ ); \* ( $p < 0,05$ ); \*\* ( $p < 0,01$ )

El Cuadro 4.5 muestra que independientemente de la diferencia estadística del porcentaje de incidencia con y sin aplicaciones de Benomyl, los estrechos rangos de incidencia sin Benomyl (3,7 y 6,3%) y con Benomyl (5,0 y 6,3) indican la baja utilidad de aplicar fungicidas en las etapas R4 (pastoso), y MAFI para el control de *Curvularia*, porque la interacción en este patrón de comportamiento indica que hay otros factores que están afectando lo que coincide con los resultados de Edgingto *et al.* (1971), Fajemisin y Okuyemi (1976) y Acosta *et al.* (2005) quienes encontraron que el Benomyl no controla al hongo *Curvularia*.

**Cuadro 4.5.** Incidencia (%) de *Curvularia* para la interacción de tratamientos sin y con aplicaciones de Benomyl en las etapas de desarrollo reproductivo (EtapRep) de parentales del DANAC 3273.

Tratamiento	EtapRep	Incidencia (%)	
Sin Benomyl	<b>R2</b>	3,7	b
	<b>R4</b>	6,3	a
	<b>R6</b>	5,5	a b
Con Benomyl	<b>R2</b>	6,3	a
	<b>R4</b>	5,1	a b
	<b>R6</b>	5,0	a b

Medias con diferente letra difieren significativamente entre si a  $P < 0,05$ .

R2: Ampolla; R4: Pastoso; R6: Dentado

## 2.2 Incidencia de la microbiota en las semillas en etapas de madurez fisiológica (MAFI) y madurez de cosecha (MACO)

En las semillas cosechadas en las etapas de MAFI y MACO se presentaron con frecuencia los géneros *Fusarium*, *Penicillium* y *Aspergillus*. También se presentó con baja incidencia el género *Acremonium* por lo que fue agrupado en la categoría *Otros* junto con los hongos que no desarrollaron estructuras reproductivas. Las especies de *Fusarium* identificadas fueron *F. verticillioides* y *F. proliferatum*, las de *Aspergillus* fueron *A. niger* y *A. flavus*.

Al realizar el análisis estadístico para efectos independientes de tratamiento en las etapas MAFI (Cuadro 4.6) se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos para MT y *Fusarium*. En MACO las diferencias se detectaron para las variables *Fusarium* y *Penicillium*. Las otras variables no presentaron diferencias (Cuadro 4.6).

**Cuadro 4.6.** Analisis de Kruskal -Wallis (Valores de H) para efectos de tratamiento con y sin Benomyl en las etapas MAFI y MACO del hibrido DANAC 3273.

Madurez	Fuente de variación	Valores de H				
		MT	<i>Fusarium</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Aspergillus</i>	Otros
MAFI	Tratamiento	10.5**	18,9**	3,03ns	0.33ns	2.04ns
MACO	Tratamiento	5.55ns	20.4**	12.0**	1.00ns	0.93ns

<sup>ns</sup> (P ≥ 0,05); \* (p < 0,05); \*\* (p < 0,01)

En el Cuadro 4.7, se presenta la incidencia promedio de la MT y MI para el efecto de tratamiento con y sin Benomyl en las etapas MAFI y MACO. Al observar la incidencia de *Fusarium* en las dos etapas se encontró que hubo un efecto del tratamiento al presentarse menor incidencia en las semillas provenientes de plantas tratadas. Este efecto se refleja en la MT. Sin embargo se mantiene la mayor incidencia de microbiota en MACO con relación a la etapa MAFI tal como fue demostrado en el capítulo uno.

**Cuadro 4.7.** Incidencia promedio (%) de MT y MI para efecto de tratamiento con y sin Benomyl en las etapas MAFI y MACO del híbrido DANAC 3273

Madurez	TRAT	MT	<i>Fusarium</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Aspergillus</i>	Otros
MAFI	SIN	25,00 a	23,50 a	0,00 a	0,50a	1,00a
	CON	12,50 b	8,00 b	1,50 a	1,00a	3,00a
MACO	SIN	99,00 a	85,00 a	28,50 b	0,00 a	3,50 a
	CON	95,00 a	66,00 b	45,00 a	0,50 a	5,50 a

Medias con diferente letra difieren significativamente entre si a  $P < 0,05$ .

El Cuadro 4.7 muestra que en la etapa MAFI, la incidencia de *Penicillium*, *Aspergillus* y *Otros* hongos fue estadísticamente igual en los tratamientos con y sin Benomyl. En MACO si se presentaron diferencias significativas para el hongo *Penicillium*, siendo la incidencia mayor en las semillas de plantas tratadas que en las no tratadas. Como consecuencia la MT no presenta diferencias significativas entre las semillas de plantas tratadas y no tratadas.

Miranda (1981) realizando pruebas en el cultivo de la soya para la producción de semillas libres de patógenos concluyó que el Benomyl, aplicado antes de los 45 DDS y antes de la MACO, reduce la infección y mantiene la viabilidad de las semillas durante la cosecha y posterior a MACO.

Mycock (1990) observó una disminución de la incidencia de la micobiota en las semillas aplicando Benomyl a intervalos regulares durante todo el ciclo de la planta, encontró un efecto transitorio sobre *Fusarium* y *Aspergillus flavus var. columnaris* y ningún efecto sobre *Penicillium*. *Fusarium* y *Aspergillus* aumentaron en la planta con una ligera disminución de la incidencia después de cada aplicación. *Aspergillus* se mantuvo en un nivel bajo pero constante en todos los tejidos llegando a aislarse de semillas maduras.

Casa *et al.* (2007) aplicando fungicidas sistémico en distintas etapas de desarrollo de la planta de trigo para controlar *Fusarium graminearum* determinaron

que aplicaciones desde el inicio de la floración reducen significativamente la infección en semillas.

Los resultados obtenidos por estos investigadores pueden compararse con los obtenidos en esta investigación ya que se obtuvo una disminución significativa de la incidencia de *Fusarium* la cual fue mayor en MAFI.

### 2.3. Efecto del tratamiento sobre la germinación de las semillas

En el Cuadro 4.8 se presentan los valores de F del análisis de varianza para el efecto de los tratamientos con y sin Benomyl sobre la germinación estándar y el vigor de las semillas obtenidas en MACO. No se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos para ninguna de las dos variables.

**Cuadro 4.8.** Analisis de varianza (Valores de F) para efecto de tratamientos con y sin Benomyl sobre el vigor y la germinación de las semillas del híbrido DANAC 3273

Fuentes de variación	Valores de F	
	Germinación	Vigor
Tratamiento	0,01 <sup>ns</sup>	0,14 <sup>ns</sup>
CV %	3,09	4,04

<sup>ns</sup> (P > 0,05); \* (P < 0,05); \*\* (P < 0,01). CV: Coeficiente de variación

Los porcentajes de germinación que se obtuvieron (Cuadro 4.9) son superiores al valor mínimo requerido en las normas de certificación (MAC, 1961) por lo que se considera que los lotes de semilla de los dos tratamientos presentaron un buen potencial de germinación

**Cuadro 4.9:** Porcentaje promedio de germinación y vigor de semilla del híbrido DANAC 3273, al tratamiento con Benomyl

Tratamiento	Germinación	Vigor
Sin fungicida	94.00 a	92,75 a
Con fungicida	94.25 a	91.75 a

Medias con diferente letra difieren significativamente entre si a P < 0,05

Germinación (% de germinación a los 7 días). Vigor (% germinación a los 4 días)

## **V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

1. Benomyl fue el fungicida más eficaz como tratamiento de semilla de maíz para el control presiembrado de inóculo de micobiota.
2. Benomyl aplicado al follaje reduce significativamente el inóculo de Fusarium en semillas maduras de maíz en la etapa precosecha.
3. Se recomienda evaluar nuevos fungicidas en dosis y cronogramas de aplicación presiembrado y foliares para definir estrategias de control de micobiota que mejoren significativamente la calidad sanitaria de la SCM.

## VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACOSTA, M.; Y. ALVARADO; M. CRUZ; M. LEIVA y L. DELGADO. 2005. Micobiota epífita y contaminantes fungosos del establecimiento in vitro de *Eucalyptus grandis*. Manejo Integrado de Plagas Agroecológicas, 75, 60-63.
- AGROISLEÑA. 2006. Productos: Agroquímicos/ fungicidas. (En línea). Consultada el 20-09-06. Disponible en <http://www.agroislena.com/productos/>
- ALEZONES, J. y A. GONZÁLEZ. 2009. Efecto de diferentes fungicidas sobre la incidencia de *Fusarium verticillioides* en semillas de un híbrido de maíz de grano blanco. Fitopatol. Venez. 22: 31-32
- BACON C W.; E, IDA; YATES; D. M. HINTON, y F. MEREDITH. 2001. Biological Control of *Fusarium moniliforme* in Maize. Environmental Health Perspectives, 109(2): 325-332.
- BOLLEN, G.J. 1982. Fungicide resistance and microbial balance. En: Dekker, J., and Georgopoulos, S. G. 1982. Fungicide resistance in crop protection. Centre for Agricultural Publishing and Documentation (Pudoc).
- BOOTH, C. 1971. The genus *Fusarium*. Kew, Surrey, England, Commonwealth Mycologicals Institute. 237 p.
- BOOTH, C. 1977. *Fusarium* Laboratory Guide to The Identification of the Major Species.. Kew, Surrey, England, Commonwealth Mycologicals Institute. 58 p.
- CAPPELINI, L. T. D.; PANIZZI, R. DE C.; R. D.VIEIRA y J. A. GALLI. 2005. Effect of *Fusarium moniliforme* on the quality of maize seeds. Científica, Jaboticabal, v.33, n.2, p. 185-191.
- CASA, R. T.; A. BOGO; E. N. MOREIRA y P. R. KUHNEM JUNIOR. 2007. Época de aplicação e desempenho de fungicidas no controle da giberela em trigo. *Cienc. Rural* [online]. 37, (6) 1558-1563.
- CAVALLO, A. R.; R. J. NOVO y M. A. PÉREZ. 2005. Eficiencia de fungicidas en el control de la flora fúngica transportada por semillas de maní (*Arachis hypogaea* L.) en la Argentina. *Agriscientia*, 22(1).
- CEROVICH, M. y F. MIRANDA. 2001. Sanidad de semillas: componente básico de la calidad de semilla. En Curso de Patología de Semillas. XVII Congreso de Fitopatología de Semillas. Maracay, Ven. Universidad Central. Facultad de Agronomía. 17 pp

- COMMONWEALTH MYCOLOGICAL INSTITUTE (CMI) 1964. *Gibberella fujikuroi*. Descriptions of pathogenic fungi and bacteria. Set. 3 No 22 Kew, Surrey, England
- DA SILVA, L. 2005. Detección, identificación, ubicación y transmisión de especies de *Fusarium* en semillas de maíz (*Zea mays* L.) Tesis Magíster Scientiarum en Agronomía. UCV- Maracay. VE. 94 p.
- DECALLONNE J. R. y J. A. MEYER. 1972. Effect of Benomyl on spores of *Fusarium oxysporum* *Phytochemistry* 11( 7): 2155-2160
- DIAZ, J. 2006. Características dimensionales y colorimétricas de cultivares comerciales de maíz con fines de procesamiento agroindustrial. Tesis de Maestría. Universidad Central de Venezuela, Facultad de Agronomía, 145 pp.
- DIAZ, J. F. MIRANDA, M. CEROVICH y R FIGUEROA. 2007. Incidencia de *Fusarium verticillioides* en semillas certificadas de maíz producidas en la región central de Venezuela. XX Congreso Nacional de Fitopatología.
- EDGINGTO. LV; K. L KHEW y G. L. BARRON. 1971. Fungitoxic spectrum of benzimidazole compounds. *Phytopathology*, 61(1), 42.
- ELLIS, M:B. 1971. Dematiaceous Hyphomycetes, Commonwealth Mycological Institute. Kew, Surrey, England,
- FAJEMISIN, J. M., y O. OKUYEMI. 1976. Fungicidal Control of Curvularia Leaf Spot of Maize. *PANS*, 22(2), 234-238.
- GALLI, J. A.; S. A. FESSEL; R. SADER; R. D. C. PANIZZI y P. R. R COSTA. 2000. Influência do tratamento químico na população de fungos, na germinação e no vigor de sementes de milho. *Revista Brasileira de Sementes*, Brasília, 22(2), 245-249.
- GONZÁLEZ N., M. S. 2002. Control de enfermedades del maíz en Venezuela. Memorias de las 1<sup>ras</sup> jornadas de actualización de manejo integrado de artrópodos y enfermedades plagas. Asociación de estudiantes de Fitotecnia. UCV. Maracay. VE. 1 disco compacto, 8 mm.
- GOULART, A. C. P. 1993. Tratamento de sementes de milho (*Zea mays* L.) com fungicidas. *Revista Brasileira de Sementes*, 15(2), 165-169.
- KHOSRAVI, A. R.; M. MANSOURI; A. R. BAHONAR y H. SHOKRI. 2007. Mycoflora of maize harvested from Iran and imported maize. *Pakistan journal of biological sciences: PJBS*, 10(24), 4432-4437.

- INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION (ISTA). 1993. International Rules for Seed Testing. Seed science and Technology. Supplement 21. 288 p.
- MALAGUTI, G. 2000. Enfermedades del maíz en Venezuela. In: El maíz en Venezuela. H. Fontana y C. González (Compiladores). Fundación Polar. p 363-405
- MARSH, R. W. (ed.). 1977. Systemic fungicides, 2 ed. Longman. Group Ltd.: Edinburgh. Page 401
- MAUDE, R. B. 1996. Seed borne diseases and their control: principles and practice. CAB international.
- MAZZANI, C. y O. BORGES. 1993. *Fusarium moniliforme*, importante especie de hongo en granos de maíz (*Zea mays* L.) en Venezuela. Memoria XIII Congreso Venezolano de Fitopatología
- MAZZANI, C., O. BORGES, O. LUZÓN, V. BARRIENTOS y P. QUIJADA 2000. *Fusarium moniliforme*, fumonisinas y *Aspergillus flavus* en granos de híbridos de maíz en el Estado Guárico, Venezuela. Rev. Fac. Agron. (LUZ). 17: 185-195
- MAZZANI, C.; O. BORGES, O. LUZÓN, V. BARRIENTOS y P. QUIJADA. 2001. Occurrence of *fusarium moniliforme* and fumonisinas in kernels of maize hybrids in Venezuela. Brazilian Journal of Microbiology 32:345-349
- MCDONALD, M. 1994. Seed germination and seedling establishment. In: Bennett, B., Sinclair y P. Sen: Physiology and Determination of Crop Yield. America Society of Agronomy, Crop Science Society of America and Soil Science Society of America. Madison, US.
- MCGEE, D.C. 1988. Maize diseases. A reference source for seed technologists. St. Paul, Minnesota, US. P. 149.
- MIRANDA, F. M. 1981. Chemical and biological protection of soybean (*Glycine max.* (L.) Merrill) seed. Dissertation Miss. State Univ., Miss State, MS. US
- MORAES, M.H.D.; J.O.M. MENTEN; J. C. GRAVENA y C.A. ALVES. 2003. Controle químico de *Fusarium moniliforme* em sementes de milho: metodologia de avaliação e efeitos sobre a qualidade fisiológica. Fitopatologia Brasileira 28:626-632.
- MUNKVOLD, G. P., y J. K. O'MARA. 2002. Laboratory and growth chamber evaluation of fungicidal seed treatments for maize seedling blight caused by *Fusarium* species. *Plant disease*, 86(2), 143-150.

- MYCOCK, D. J. 1990. A study of some of the inter-relationships between maize and the seed storage fungi as typified by *Aspergillus flavus* var. *columnaris*. University of Natal. 482 páginas
- NEERGAARD, P. 1977. Seed Pathology Vol 1 and 2. MacMillan Press, London.
- PINTO, N. F. J. A. 2000a. Tratamento fungicida de sementes de milho contra fungos do solo e o controle de *Fusarium* asociado às sementes. *Scientia agrícola* 57 (3):483-486.
- PINTO, N. F. J. A. 2000b. Evaluation of the efficiency of the fungicides tolylfluanid and tolylfluanid + carbendazim in the treatment of corn seeds. Ciência e Agrotecnologia 2000 Vol. 24 No. 2 pp. 500-503
- RONDON, M., M. CHAVARRI, A. CAPOBIANCO y C. MAZZANI. 2011. Mohos asociados al maíz blanco (*Zea mays*) de cosecha procedente del estados Guarico. Sociedad Venezolana de fitopatología. XXII congreso venezolano de fitopatología. Trujillo, 08 al 11 de noviembre de 2011. Resúmenes. *Fitopatol. Venez.* 24 (2): 65
- SIVANESAN, A. 1987. Graminicolous species of bipolares, curvularia, drechslera, exserohilum and their Teleomorphs. *Mycological Papers*, No 158. C.A.B. International Mycological Institute. 261 p.
- VON PINHO, E.V.R. 1995. Efeitos do tratamento fungicida sobre a qualidade sanitária e fisiológica de sementes de milho (*Zea mays* L.). *Revista Brasileira de Sementes* 17:23-28.
- WILSON, D. O.; S. K. MOHAN; E. A. KNOTT y B. SHAFII. 1993. Evaluation of Fungicide Seed Treatments for *Shrunken-2* (“Supersweet”) Sweet Corn. *D. O. Plant Dis.* 77:348-351.
- YATES, I. E.; J. W. ARNOLD; D. M. HINTON; W. BASINGER y R. R. WALCOTT. 2003. *Fusarium verticillioides* induction of maize seed rot and its control. *Canadian journal of botany*, 81(5), 422-428.

## CAPITULO V

### **Influencia potencial de la distribución de semilla de híbridos de maíz portadora de micobiota transmisible, sobre la sostenibilidad del actual sistema de certificación de semillas.**

El mejoramiento genético y uso de semilla certificada de maíz (SCM) han contribuido al incremento de la productividad del cultivo, pero la producción de semillas en zonas tradicionales presenta problemas agronómicos y sanitarios que requieren solución. Para estimar mediante un análisis crítico la influencia potencial de la distribución de semilla de híbridos de maíz portadora de micobiota transmisible sobre la sostenibilidad del actual sistema de certificación de semillas se utilizaron los resultados de los capítulos I II y III de este trabajo, y los de la encuesta para actores del sistema de producción de SCM registrados en SENASEM, analizada por el método de distribución de frecuencias. Los cuadros 1.2 y 1.4 del capítulo I; 2.2 y 2.3 del capítulo II y 3.2 del capítulo III, respectivamente, muestran semilla de maíz con alta incidencia de siete patógenos de alto poder epidemiológico en semilla genética de los parentales de los híbridos; suelos de las dos localidades y épocas de siembra; follaje del cultivo, estructuras reproductivas y en semillas durante la madurez fisiológica (MAFI) y de campo (MACO). Contrario a lo esperado, toda la semilla cosechada mostró excelentes porcentaje de germinación y vigor demostrando que los problemas de calidad sanitaria encontrados no afectaron la calidad fisiológica de la SCM exigidos por SENASEM para su certificación. La encuesta realizada destacó que los productores de SCM tienen excelente preparación técnica y experticia; las inspecciones de campo y comercialización no garantizan semilla libre de patógenos porque no se realizan análisis sanitarios rutinarios; hacen falta nuevos protocolos para evaluar la calidad sanitaria en términos de enfermedades, insectos y malezas. Se concluyó que la calidad sanitaria de la SCM producida en Aragua es consecuencia del inóculo potencial presente en las semillas de los parentales de los híbridos utilizados en los suelos y ambiente de las localidades de producción, en el follaje y estructuras reproductivas del cultivo en desarrollo y en las semillas cosechadas en MAFI y MACO. La alta incidencia de la micobiota encontrada no afectó la calidad fisiológica de la SCM ni la potencial aprobación por el SENASEM; la sostenibilidad del sistema de certificación de semilla de maíz depende de la implementación de innovaciones tecnológicas, institucionales y legales para mitigar el impacto ambiental sobre los sistemas de producción y mejoramiento de la calidad integral. Las recomendaciones fueron: realizar investigaciones complementarias para la caracterización adicional del riesgo ambiental y epidemiológico de la MI en otras zonas de producción de SCM; modernizar tecnológica, legal y operativamente el sistema de producción de SCM para asegurar la producción, distribución y uso de SCM con superior calidad genética y sanitaria, en consonancia con la sostenibilidad ambiental requerida.

**Palabras clave:** Semilla de maíz. Calidad sanitaria. Certificación, Sostenibilidad.

## I. INTRODUCCIÓN

El mejoramiento genético y uso de semilla certificada de maíz (SCM) han contribuido con incrementos importantes de la productividad del cultivo de maíz (Segovia. y Alfaro, 2009; Vielma, 2003; Oropeza *et al.*, 2000). En este contexto, el sistema de producción, comercialización y uso de SCM durante el periodo 1961-2005 consistió en la producción y disponibilidad de semilla de variedades e híbridos nacionales.

La mayor superficie de producción de SCM se ubica en la región central, principalmente en el estado Aragua y, en menor escala, en Guárico y Carabobo. Existen también pequeñas superficies de producción en los estados Monagas y Portuguesa (Oropeza y Mazzani, 1997; SENASEM-INIA, 2014). Sin embargo, desde 2006, predomina el uso de semilla importada para la siembra nacional de maíz. (Alvarado y Hernández, 2009 y SENASEM-INIA, 2014),

La siembra se realiza principalmente en el periodo de lluvias, entre abril y septiembre, complementadas con siembras de norte-verano entre octubre y marzo. El sector privado de semillas está conformado por empresas que realizan todas las fases del proceso de certificación desde la producción hasta la venta del producto. El sector público está conformado por el Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA) quien produce semilla a través del Plan Nacional de semillas y el Servicio Nacional de Semillas (SENASEM) INIA que es la autoridad nacional de semilla encargada de verificar la calidad genética, física, fisiológica y fitosanitaria, mediante las normas y reglamento de Certificación y Análisis de Calidad de Semillas a nivel nacional.

La gestión combinada del sector privado de semillas y el SENASEM, debe asegurar el control de la calidad del proceso de certificación desde la fase de pre producción hasta la venta del producto. Así se asegura al usuario que la SCM

adquirida mantiene los factores de calidad genética, fisiológica, física y sanitaria establecidos en la legislación nacional. Sin embargo, está bien documentado que la producción de SCM durante largos periodos en las zonas tradicionales conlleva problemas agronómicos y sanitarios derivados del uso de siembras uniformes exigidos por el programa de selección negativa de plantas que demanda el sistema de control de calidad para la certificación de semillas (Cerovich y Miranda, 2001; Miranda y Cerovich, 2001).

En este contexto, surgen las debilidades de la legislación nacional de semillas porque, según Rodríguez (1968), los análisis fitopatológicos de semillas tienen una importancia fundamental ya que los lotes de semillas puede ser portadores de fitopatógenos capaces de poner en peligro la cosecha; además, Cerovich y Miranda (2001) sostienen que en Venezuela la evaluación de la calidad sanitaria de la semilla es insuficiente para certificar su calidad sanitaria, porque se basa en la inspección ocular de campo sin exigir los análisis sanitarios en campo o laboratorio como requisitos para emitir la certificación formal. Estas opiniones destacan que la incidencia de organismos patógenos en la semilla no está siendo considerada adecuadamente, lo cual es preocupante para la salud, la sostenibilidad ambiental y económica del sistema nacional de certificación de semillas.

El conocimiento de la micobiota de las semillas y la caracterización de sus efectos para la calidad integral de las mismas, permitirían definir estrategias de prevención y control de la contaminación en los sucesivos ciclos de sistema de producción de SCM y otros cultivos. El objetivo de este capítulo fue “estimar mediante un análisis crítico la influencia potencial de la distribución de semilla de híbridos de maíz portadora de micobiota transmisible, sobre la sostenibilidad del actual sistema de certificación de semillas”

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

En Venezuela, el mejoramiento genético y uso de semilla certificada de maíz (SCM) han contribuido al incremento sostenido de la productividad del cultivo, pero la producción de semillas en zonas tradicionales presenta problemas agronómicos y sanitarios que requieren solución. (Oropeza *et al.*, 2000; Cerovich y Miranda, 2001; Miranda y Cerovich, 2001; Cabrera y García, 2003 y Miranda, 2014).

### 1. Desarrollo del cultivo y la producción de semilla certificada de maíz en Venezuela.

En relación al desarrollo del cultivo de maíz en el país, Oropeza y Mazzani. (1997) y Cabrera y García (2003), citan que diversas instituciones científicas y tecnológicas, públicas y privadas, contribuyeron en la generación, desarrollo y transferencia de maíces blancos y amarillos con características morfológicas y agronómicas favorables para su procesamiento agroindustrial como alimento importante en la alimentación de la población venezolana. Estos autores también coinciden en la necesidad de resolver los problemas asociados a los sistemas de manejo agronómico, sanitario y de zonificación del cultivo para optimizar la productividad de los sistemas de producción de semillas y granos. En cuanto a la tendencia al desplazamiento de cultivares nacionales por foráneos, Cabrera y García (2003) opinan que ello refleja la opinión de medianos y grandes productores, porque consideran que los cultivares foráneos poseen mayor potencial de rendimiento y calidad que los híbridos y variedades de origen nacional.

La modernización del sistema de producción de maíz en Venezuela estuvo orientada por las políticas sectoriales de sustitución de importaciones (1961-1983), contingentamiento (1984-1988), apertura total (1989-1993) y apertura equilibrada a partir de 1994 (Miranda, 1996). Esta política estimulo el desarrollo de híbridos nacionales de maíz y la producción de semilla híbrida certificada para el 95% del área

total del cultivo sembrada por campesinos, medianos y grandes productores. (Oropeza y Mazzani, 1997; Cerovich y Miranda, 2001; Cabrera y García, 2003; Miranda, 1996 y 2014; Vielma *et al.*, 2005). Aspecto importante fue la implementación del sistema de certificación de semilla para promover la producción y uso de semilla certificada de maíz (SCM) y otros cultivos desarrollados por los proyectos de mejoramiento genético del Centro Nacional de Investigaciones Agronómicas hoy CENIAP del INIA (Miranda, 1996). El Servicio Nacional de Semillas (SENASA), adscrito al Ministerio de Agricultura y Cría (hoy MPPMAT), fue designado como la Autoridad Certificadora responsable por el cumplimiento de los requisitos de calidad genética, física, fisiológica y sanitaria, establecidos en las “Normas para la certificación de arroz, ajonjolí, caraota, frijol y maíz”, (MAC-INV-71, 1961) y las “Normas generales sobre semillas” (CMAC- DGDA 159) (MAC, 1986).

De acuerdo a Miranda y Urdaneta (2014a) y Riccelli (1994, citado por Vielma *et al.*, 2005), las políticas de promoción al desarrollo semillerista condujeron a la implementación de un “Sistema de abastecimiento de semilla certificada” (SIABSEM) que, apoyado en la proactividad e inversiones del sector privado nacional de semilla, garantizaría la consolidación y sostenibilidad del SIABSEM. Añaden estos autores que la concertación entre empresas, asociaciones, gremios e instituciones oficiales y privados de investigación, comercialización y uso de la tecnología de semillas facilitó la construcción de una sólida Agroindustria Nacional de Semilla (ANS) que fortaleció el SIABSEM nacional y lideró en América Latina la incorporación del sector campesino como productor y usuario de semilla certificada de maíces híbridos.

En 1995 el SENASEM fue transformado para ampliar su misión y modernizar sus bases legales, organizativas y operativas para fortalecer el abastecimiento de semillas para el sistema agroalimentario interno y para insertarnos en la expansión del comercio regional de semillas, basados en nuestras ventajas comparativas y

competitivas para producir, procesar y comercializar semilla de alta calidad durante todo el año. Un cambio de gran trascendencia representa la próxima emisión de Certificados de Protección de Cultivares amparado en la vigencia del Régimen Común Subregional para la Protección de los Derechos de Obtentores de Variedades Vegetales, según la Decisión 345 de la Junta del Acuerdo de Cartagena, publicada en la Gaceta Oficial Extraordinaria N° 4676 del 18-01-94, con carácter de Ley Supranacional.

En la ANS actual participan 624 actores (98,5% privados y 1,5% públicos) acreditados por SENASEM en las especialidades de fitomejoramiento, producción, acondicionamiento y servicios técnicos del sistema nacional de certificación de semillas. (SENASEM-INIA, 2014; Miranda y Urdaneta, 2014a).

La mayor superficie de producción de SCM se concentra en la región central, principalmente en el estado Aragua, con menor escala en Guárico y Carabobo y pequeñas superficies en Monagas y Portuguesa. La época de producción de semilla certificada de maíz comprende dos ciclos de siembra: lluvias entre los meses de marzo y septiembre y norte-verano entre los meses de octubre y marzo, aprovechando la capacidad de riego de las fincas y la disponibilidad de las plantas procesadoras. La industria de semilla en la región central contribuye a la producción de semilla certificada de maíz en un 90 %. (Miranda 1996; Oropeza *et al.*, 2000).

Miranda y Urdaneta (2014a), en su “Análisis de la contribución del sector privado de semillas al desarrollo y sostenibilidad del Sistema de abastecimiento de semillas de Venezuela (SIABSEM) sustentan que la producción de semilla certificada de maíz entre el periodo 1986 al 1997 abastecía la demanda total para la siembra del cultivo, con 90 % de semilla de híbridos públicos y privados nacionales, mayoritariamente sembrados en Aragua y otros estados de la región central del país.

Las estadísticas oficiales de la producción de semilla certificada de maíz (SCM) durante el periodo 1961 – 2013 muestran una clara autosuficiencia nacional hasta 1993 (Miranda, 1996), y de acuerdo a Flores (2004) la sensible reducción de SCM entre 1994 y 1997 se explica porque en el programa de SCM de la Región Central se produjeron 12.965 t., en 3262 ha. con 295 multiplicadores contratados por 7 empresas nacionales y 3 multinacionales. Adicionalmente, esta autora confirma que la producción de SCM entre 1998 y 2004 continúa su reducción, hasta 4.556 t en el 2000; luego durante el lapso 2005–2009 aumenta entre 8.878 t. y 13.392 t, y desciende drásticamente hasta 3. 087 t. en 2013.

Entre las causas del creciente desabastecimiento de SCM descrito destacan: errores del MAT, INIA y SENASEM en la rectoría, supervisión y operación, respectivamente del Plan Nacional de Semillas (PNS) excluyente de la tradicional participación de las empresas asociadas a la ANS; sustitución improvisada de híbridos por variedades de polinización abierta insuficientemente caracterizadas, cuya consecuencia fue notable reducción de la producción de SCM de las empresas nacionales asociadas a la Cámara Nacional de Productores de Semilla (CANAPROSE); incorporación de nuevos actores sin la capacitación adecuada para producir SCM, discrecionalidad del SENASEM en la aplicación de las normas para producción de SCM y apoyo discrecional a las empresas transnacionales para la importación de SCM, en competencia desventajosa para las empresas asociadas a la ANS.

El creciente déficit citado por Segovia y Alfaro (2009), fue parcialmente cubierto con semilla importada de las empresas transnacionales, presumiblemente por su presunta alta tecnología genética y calidad de semilla y por semilla fiscalizada de variedades de polinización abierta supervisado por el Plan Nacional de Semillas (PNS) del INIA, para uso de pequeños agricultores asociados a dicho Plan.

## **2. Situación actual y perspectivas del sistema de certificación de semillas de maíz en Venezuela.**

De acuerdo a Miranda (2014) y Miranda y Urdaneta (2014b) , el actual Sistema de certificación de semillas de Venezuela es altamente vulnerable porque las decisiones legales y operativas se basan en los instrumentos sublegales titulados “Normas Específicas para la Certificación de Semillas en Venezuela” MAC-INV-71 (1961) y las “Normas Generales sobre Semillas”, MAC. DGSDA- 159 (1986), porque la “Ley de Semillas, Materiales para la Reproducción Animal e Insumos Biológicos”, promulgada por la Asamblea Nacional en 2002, nunca ha sido aplicada por errores de forma y fondo en su articulado.

Según los investigadores Cerovich y Miranda (2001), Miranda y Cerovich (2001 y 2004), y Urdaneta (2006), las tolerancias establecidas en las Normas INV- 71 (1961) para evaluar la calidad sanitaria de la semilla certificada de maíz, arroz y otros cultivos, son inaplicables porque se sustentan en estimaciones subjetivas durante las inspecciones de campo, al margen de protocolos técnicos y análisis de laboratorio que orienten las decisiones al respecto.

La presencia de la micobiota en la semilla constituye un factor de deterioro de la semilla porque es un vehículo efectivo para la diseminación de inóculo patogénico e introducción de enfermedades en nuevas áreas o regiones de producción de semillas (Christensen y Kaufmann, 1965; ISTA, 1996; Miranda, 1977 y 1981; Cerovich y Miranda, 2001,). La existencia de patógenos transmitidos por semilla en el cultivo sin producir síntomas que pueden infectar las semillas en desarrollo acarrear la necesidad de realizar análisis sanitarios de laboratorio. Ejemplo de ello es el *Fusarium verticillioides* que puede ser transmitido por la semilla y producir la infección asintomática de la planta hasta llegar a infectar las nuevas semillas (Munkvold *et al.*, 1997; Wilke *et al.*, 2007).

Finalmente, Miranda (2014) al analizar la situación actual y perspectivas del sistema de certificación de semillas de maíz en Venezuela concluye que “el actual modelo del SIABSEM confronta debilidades tecnológicas, operativas y legales que justifican la creación e implantación de un moderno sistema de producción y certificación de semillas, apoyado en nuevo marco legal de semillas que incluya: Una “Ley de abastecimiento de semilla y protección de cultivares” que según criterios propuestos por Miranda y Urdaneta (2014b), actualice los sistemas de producción de semilla Certificada, Fiscalizada y Común, e incorpore la protección intelectual de nuevos cultivares, en concordancia con el articulado propuesto en dicha ley.

### **3. Calidad sanitaria y sostenibilidad del sistema de certificación de semillas de maíz.**

De acuerdo a los investigadores Miranda y Cerovich (2001 y 2004), Cerovich y Miranda (2001) la producción de SCM durante largos periodos en zonas tradicionales genera problemas agronómicos y sanitarios, porque el sistema de control de calidad en la certificación de semillas utiliza protocolos de selección negativa de plantas para garantizar las poblaciones uniformes de plantas de maíz exigidos por las normas de certificación.

En este contexto, surgen las debilidades de la legislación nacional de semillas porque Rodríguez. L (1968), concluía que los análisis fitopatológicos de semillas tienen una importancia fundamental porque los lotes de semillas pueden ser portadores de fitopatógenos capaces de poner en peligro la cosecha. Tal opinión es apoyada por Miranda y Cerovich (2001 y 2004), Urdaneta (2006) y Miranda (2014) al informar que la evaluación de la calidad sanitaria de la semilla de maíz, arroz y otros cultivos en Venezuela es insuficiente para certificar su calidad sanitaria, porque se basa en la inspección ocular de campo sin exigir los análisis sanitarios en campo o laboratorio como requisitos para emitir la certificación formal. Estas opiniones

destacan que la incidencia de organismos patógenos en la semilla es considerada inadecuadamente, lo cual es preocupante para la sanidad vegetal y la sostenibilidad ambiental y económica del sistema nacional de certificación de semillas.

Respecto al criterio generalmente aceptado, que la presencia de la micobiota en la semilla constituye un factor de deterioro de su calidad es retado por las investigaciones de Miranda en semilla (1977 y 1981), Urdaneta (2006) y Díaz *et al.* (2007) en semillas de soya, arroz y maíz, respectivamente, porque aun cuando los lotes de semillas evaluados mostraban altos porcentajes de incidencia de micobiota patogénica, las semillas tenían muy buena germinación y vigor demostrativos de una excelente calidad fisiológica. Estas investigaciones confirman que probablemente su principal papel en la semilla sería como vehículo eficaz para la diseminación de inóculo patogénico e introducción de enfermedades en nuevas áreas o regiones de producción de semillas, tal como lo refieren Christensen y Kaufmann (1965), Miranda (1977), Cerovich y Miranda (2001).

Resultados en apoyo a este enfoque son aportados por Díaz (2006), quien trabajando con semilla certificada de maíz producida por tres empresas del estado Aragua comprobó niveles de incidencia de *Fusarium verticillioides* entre 6 y 78% para todos los tamaños de SCM procesados. La calidad fisiológica de esos lotes contaminados con micobiota fue excelente porque sus porcentajes de germinación superaron ampliamente el 88% exigido por el SENASEM para su aprobación como SCM, además de presentar altos valores de vigor de semilla.

Complementariamente, Miranda y Cerovich (2004) y Urdaneta (2006), encontraron que la calidad sanitaria de la semilla certificada de arroz (SCA) de Venezuela confronta similares problemas que la SCM. Para ello, estos investigadores caracterizaron las calidades sanitarias y fisiológicas de 48 lotes de SCA producidas en Portuguesa y Guárico, encontrando una micobiota de 10 géneros patogénicos del arroz, seis de ellos (*Bipolaris oryzae*, *Gerlachia oryzae*, *Alternaria padwickii*,

*Fusarium* sp., *Aspergillus* sp., y *Cladosporium* sp.) asociados al manchado de granos y semillas en arroz y los restantes, relacionados con la “mancha marrón en hojas y granos ” y “escaldado apical de la hoja”, enfermedades confirmadas como transmisibles por semilla. Aun cuando los porcentajes de incidencia variaron entre 2 y 100% en los lotes evaluados sus porcentajes de germinación mínimos superaron el 90% con altos porcentajes de vigor.

También se ha reportado la existencia de patógenos como *Fusarium verticillioides* que pueden ser transmitidos asintóticamente por semilla, pudiendo infectar las plántulas en desarrollo, lo que establece la necesidad de realizar análisis sanitarios de laboratorio (Munkvold *et al.*, 1997; Wilke *et al.*, 2007). Complementariamente, los investigadores Cerovich y Miranda (2001), Miranda y Cerovich (2001 y 2004), Miranda (2005), Da Silva (2005), Díaz (2006) y Urdaneta (2006) sustentan sus críticas a las tolerancias para evaluar la calidad sanitaria de la semilla certificada de maíz fijadas en las Normas INV- 71 (1961), porque son inaplicables debido a que se sustentan en estimaciones subjetivas durante la inspecciones de campo al margen de protocolos técnicos y análisis de laboratorio que oriente estas decisiones.

Los resultados presentados sobre la actual calidad sanitaria de la semilla certificada de maíz con extensión a la de arroz y, presumiblemente, otros cultivos bajo certificación, plantean un escenario preocupante, donde hay una diseminación de inóculo potencial de enfermedades transmisibles, o transportados, por la semilla a otras áreas agroecológicas que requieren adecuada atención porque representa una tangible amenaza a la sostenibilidad ambiental y económica de las áreas de producción de semilla y granos de maíz y otros cultivos.

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

La evaluación de la influencia de la microbiota natural de la semilla certificada de maíz (SCM), sobre su calidad y la sostenibilidad ambiental del sistema de certificación de semillas está basada en la caracterización sanitaria de los agentes biológicos que intervienen en el ciclo de producción de SCM a saber: (a) semilla de los parentales de los híbridos Himeca 3002, DANAC 3273 y Sefloarca 91; (b) suelos de las dos localidades y dos épocas de siembra del estado Aragua utilizadas para producir la semilla híbrida sujeta a evaluación; (c) inóculo de la microbiota total e individual aislado del follaje, estructuras reproductivas, semillas en desarrollo y maduras de estos híbridos; (d) semillas maduras de los híbridos considerados.

Para evaluar la percepción de actores en la cadena de producción, comercialización y uso de SCM, registrados en el Servicio Nacional de Semillas (SENASA), se diseñó la encuesta presentada en el Anexo 5 cuyo formato permitiría diagnosticar: las características y experticia de los actores en la producción de SCM; su percepción sobre la calidad sanitaria de la SCM; y sobre los requisitos legales y técnicos exigidos por el SENASEM para la certificación de semilla de maíz. La frecuencia de las respuestas de los actores expresada en porcentaje fue analizada mediante el programa Statistix 8.0

#### IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de las incidencias de micobiota total (MT) e individual (MI) caracterizados en los agentes individuales del ciclo de producción de SCM fueron presentados en los Cuadros 1.2 y 1.4 del capítulo I; 2.2 y 2.3 del capítulo II y 3.2 del capítulo III de la presente investigación.

El Cuadro 1.2 muestra los promedios de incidencia de MT y MI en la semilla parental de los tres híbridos utilizados para producir la SCM en las dos localidades y dos épocas de siembra del estado Aragua. Este Cuadro también indica que la MT esa compuesta por: *Fusarium*, *Penicillium*, *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *Curvularia*, *Acremonium* y *Rhizopus* con muy altos porcentajes de incidencia donde las máximas incidencias corresponden a la semilla materna, hecho que explica su mayor capacidad de transmisión y transporte de inóculo potencial de enfermedades a otros campos y zonas de producción de semillas y granos de maíz (Da Silva, 2005; Díaz *et al.*, 2007; Antolini y Garcia, 1994; Cerovich y Miranda, 2001; Miranda, 1977 y 2005; Munkvold *et al.*, 1997; Christensen y Kaufmann, 1965).

**Cuadro 1.2.** Promedios de incidencia de micobiota total (MT) e individual (MI) en semilla parental (P) de los híbridos sembrados en dos localidades y dos épocas de siembra en el estado Aragua.

Hibrido	P	Promedio de incidencia (%)					
		MT	MI				
			<i>Fusarium</i>	<i>Penicillium</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. flavus</i>	Otros <sup>(2)</sup>
Himeca 3002	Padre	65,00 a	61,75 b	0,25 a	0,66 <sup>(1)</sup> a	3,10a	
	Madre	71,75 b	45,75 a	30,00 b	1,68 <sup>(1)</sup> a	0,87a	
DANAC 3273	Padre	65,00 a	63,75 a	0,50 a	1,53 <sup>(1)</sup> a	2,50 a	
	Madre	80,25 b	71,50 b	16,50 b	0,72 <sup>(1)</sup> a	6,25 b	
Sefloarca 91	Padre	52,25 a	36,50 a	7,00b	3,25 a	8,25 a	0,98 a
	Madre	98,25 b	40,25 b	1,75 a	21,00 b	82,75 b	0,57 a

Medias con diferente letra difieren significativamente entre si a  $P < 0,05$  según las Pruebas de 't' para dos muestras independientes. <sup>(1)</sup>Promedio de *A. niger* y *A. flavus*. <sup>(2)</sup>*Curvularia*, *Acremonium* y *Rhizopus*.

En el Cuadro 1.4, se presenta el porcentaje de incidencia de la micobiota individual registrada en el suelo de las localidades y épocas de siembra evaluadas. Se observa que la mayor incidencia de micobiota en el suelo corresponde a los hongos *Penicillium* y *Aspergillus*, resultados que son coincidentes con los de Diener *et al.* (1987), McGee (1988) y Horn (2003), quienes señalan que las mayores fuentes de inóculo de estos hongos son el suelo, residuos de plantas y el aire; las esporas son transportadas a las mazorcas por insectos o el viento donde germinan e infectan los granos de maíz. En relación a la incidencia de *Aspergillus*, Bennett (2010) cita que sus esporas se encuentran entre las estructuras fúngicas más abundantes en el aire, dispersándose a cortas y largas distancias; mientras que Wicklow y Wilson (1986) informan que esclerocios *Aspergillus* ubicados en la superficie del suelo germinan ocho días antes de la emisión de los estigmas produciendo conidias que infectan el maíz. En el Cuadro 1.4 la ausencia de *Fusarium* sugiere que los suelos de las localidades y épocas de siembra referidas no son una fuente de inóculo potencial. Este resultado coincide con la investigación de Leslie *et al.* (1990) quienes observaron que *F. moniliforme*, *F. proliferatum* y *F. subglutinans* fueron comunes en tejidos del maíz pero no en rastrojos de cosecha o muestras de suelo, probablemente porque según Rheeder y Marasa (1998) este hongo no sobrevive porque no produce clamidosporas.

**Cuadro 1.4. Porcentaje de incidencia de micobiota en suelos de dos localidades y épocas de siembra en el estado Aragua.**

% MI	La Cuarta	Valle de Tucutunemo	
	Lluvia	Lluvia	Norte-verano
<i>Aspergillus</i>	32,58	14,80	16,36
<i>Penicillium</i>	22,76	23,46	32,28
<i>Otros*</i>	44,66	61,74	51,36

\* Micobiota con menor frecuencia no identificada por falta de esporulación

**Cuadro 2.2.** Incidencia promedio de MT y MI en las etapas de desarrollo reproductivo (EtapRep) de semilla híbrida de maíz producida dos épocas de siembras y dos localidades del estado Aragua.

Hibrido	Etap Rep <sup>(1)</sup>	Promedios de incidencia de micobiota (%)						
		MT	MI					Otros <sup>(2)</sup>
			<i>Fusarium</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Penicillium</i>			
Himeca 3002	VT	0,80 f	0,00 e	0,40 a	0,00 b	0,60 b		
	R1	27,60 d	4,20 e	3,20 a	1,6 b	20,40 a		
	R2	11,67 ef	4,33 e	0,50 a	0,00 b	10,67 ab		
	R3	4,00 f	1,33 e	1,33 a	0,00 b	2,50 b		
	R4	19,33 de	15,00 d	1,17 a	3,00 b	1,50 b		
	R5	47,65 c	44,71 c	1,29 a	3,06 b	3,65 b		
	MAFI	71,80 b	67,60 b	2,00 a	4,00 b	5,60 b		
	MACO	94,00 a	79,20 a	0,6 a	23,00 a	8,40 ab		
DANAC 3273	VT	2,80 d	0,40 c	2,00 a	0,00 b	0,20 b		
	R1	25,00 b	9,00 bc	1,40 a	0,00 b	23,00 a		
	R2	6,00 cd	1,50 c	0,67 a	0,17 b	4,17 b		
	R3	3,00 d	0,50 c	0,33 a	0,00 b	2,33 b		
	R4	16,33 bc	13,83 b	0,50 a	0,00 b	2,50 b		
	R5	14,94 bc	12,71 b	0,70 a	0,35 b	1,29 b		
	MAFI	22,60 b	19,40 b	1,20 a	0,40 b	1,40 b		
	MACO	98,80 a	85,00 a	0,00 a	28,60 a	3,40 b		
Sefloarca 91	VT	0,00 b	0,00 b	0,00 a	0,00 b	0,00 a		
	R1	4,40 b	0,20 b	0,20 a	0,00 b	4,20 a		
	R2	6,60 b	0,40 b	0,00 a	0,20 b	6,20 a		
	R3	5,67 b	3,17 b	0,00 a	0,00 b	2,50 a		
	R4	2,67 b	1,17 b	0,33 a	0,00 b	1,17 a		
	R5	5,29 b	3,65 b	0,00 a	0,12 b	2,00 a		
	MAFI	8,40 b	6,00 b	0,00 a	0,20 b	3,00 a		
	MACO	94,40 a	83,00 a	0,00 a	20,4 a	0,40 a		

<sup>(1)</sup> Etapas de desarrollo del maíz según Hanway (1984): panoja, (VT), Sedas (R1), ampolla (R2), lechosa (R3), pastoso (R4), dentado (R5). <sup>(2)</sup> *Acremonium*, *Rhizopus* y hongo sin esporulación. Medias con diferente letra difieren entre si a P < 0,05.

Respecto a la incidencia de MT y MI durante las etapas de desarrollo reproductivo (EtapRep), el Cuadro 2.2 revela los promedios detectados en las etapas comprendidas entre la aparición de la panoja (VT) y la madurez de cosecha (MACO) de la semilla híbrida producida en dos épocas de siembras y dos localidades de Aragua, que es la principal zona de producción de SCM del país (Miranda, 1996; Oropeza *et al.*, 2000; Cabrera y García, 2003 y Flores, 2004).

La incidencia de MT reflejada en el Cuadro 2.2 muestra un preocupante patrón de infección de crecimiento sostenido en todas las EtapRep de la semilla y en todos los híbridos que alcanza su máximo porcentaje en MAFI, etapa que según Miranda (1977 y 1981), Cerovich y Miranda (2001), Miranda y Cerovich (2004) y Díaz (2006) es el indicador de la máxima calidad de la semilla de maíz y otros cultivos porque refleja máximos valores de masa seco, germinación, vigor y variados porcentajes de MT. Adicionalmente, en la etapa identificada como MACO semilla de los tres híbridos registraron máximos porcentajes de MT con incidencia significativamente mayor que la MAFI. Este escenario destaca las recomendaciones de Miranda (1977) sobre la importancia de desarrollar investigaciones para caracterizar los factores genéticos, sanitarios y fisiológicos asociados con el DEPRECO de semillas que faciliten la implementación de estrategias de control y mejoramiento de la calidad de semillas de maíz y otros cultivos en Venezuela.

Complementariamente, el Cuadro 2.3 presenta el patrón de incidencia de MT y MI en ovarios, estilos, estigmas, tusas y pedúnculos de mazorcas de los tres híbridos sembrados en dos localidades y épocas de siembra del estado Aragua, lo cual confirma las opiniones de los investigadores citados en la discusión del cuadro correspondiente.

El Cuadro 3.2 presenta el porcentaje promedio de germinación de las semillas de los tres híbridos. Los porcentajes fueron superiores al 88% valor mínimo de germinación establecido en las normas de certificación (MAC, 1961). La germinación

a los 4 días como índice de vigor muestra que el híbrido Himeca 3002 presentó menor vigor que los híbridos DANAC 3273 y Sefloarca 91. Los altos valores en todos los casos indican que la MN encontrada no afecta la germinación ni el vigor de las semillas evaluadas.

**Cuadro 2.3.** Incidencia promedio (%) de la MT y MI en estructuras reproductivas (EstruRep), desde flor a semilla, de los híbridos Himeca 3002, DANAC 3273 sembrado en la Cuarta y valle de Tucutunemo en época de lluvia y Sefloarca 91 sembrado en el Valle de Tucutunemo en norte verano.

Híbrido	EstruRep	Promedios de incidencia (%)									
		MT		MI							
				<i>Fusarium</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Penicillium</i>	Otros <sup>(1)</sup>				
Himeca 3002	Ovario	26,84	a	24,69	a	1,11	a	1,76	a	2,15	b
	Estilo	13,41	b	6,27	b	0,94	a	0,94	a	7,28	b
	Estigma	29,52	a	6,35	b	0,63	a	1,27	a	25,08	a
	Tusa	13,92	ab	9,49	b	3,16	a	1,90	a	0,63	b
	Pedúnculo	19,62	ab	11,39	b	5,70	a	2,53	a	1,90	b
DANAC 3273	Ovario	8,97	b	7,55	a	0,64	a	0,13	a	0,71	b
	Estilo	9,02	b	4,78	a	0,34	a	0,00	a	4,51	b
	Estigma	29,21	a	9,84	a	2,22	a	0,00	a	28,25	a
	Tusa	15,33	ab	8,67	a	4,00	a	1,33	a	3,33	b
	Pedúnculo	20,00	ab	12,00	a	2,67	a	0,00	a	6,00	b
Sefloarca 91	Ovario	3,83	a	2,72	a	0,00	a	0,07	a	1,32	a
	Estilo	3,75	a	1,42	a	0,15	a	0,00	a	2,25	a
	Estigma	9,25	a	0,21	a	0,00	a	0,00	a	9,03	a
	Tusa	0,00	a	0,00	a	0,00	a	0,00	a	0,00	a
	Pedúnculo	1,33	a	0,67	a	0,67	a	0,67	a	0,00	a

<sup>(1)</sup> *Acremonium*, *Rhizopus* y hongos que no esporularon.  
Medias con diferente letra difieren entre si a P <0,05.

**Cuadro 3.2.** Porcentaje promedio de germinación y vigor de semilla de los híbridos Himeca 3002, DANAC 3273 producida época de lluvia en la Cuarta y valle de Tucutunemo respectivamente, y Sefloarca 91 sembrado en época de norte verano en el Valle de Tucutunemo.

Hibrido	Germinación	Vigor
Himeca 3002	95.25 a	83.25 b
DANAC 3273	94.00 a	92.75 a
Sefloarca 91	97.75 a	96.25 a

Germinación (% de germinación a los 7 días), Vigor (% germinación a los 4 días)

Medias con diferente letra difieren significativamente entre si a  $P < 0,05$ .

Estos resultados aportan la base experimental sobre la imposibilidad tecnológica de producir “semilla certificada de maíz libre de enfermedades transmisibles” como criterio optimista y utópico plasmado en las Normas Específicas para la producción de semilla certificada de maíz en Venezuela, MAC\_ INV\_71 (MAC, 1961). Este escenario confirma los resultados de Miranda (1977) en semilla de soya en Mississippi, EEUU, quien comprobó que el inóculo de *Diaporthe phaseolorum* var. sojae y otros fitopatógenos en ovario, estilo y estigma durante la formación de la semilla impide la producción de semilla de soya libre de enfermedades, cuya solución requiere el desarrollo de investigaciones complementarias sobre el impacto de la micobiota en la calidad sanitaria y los riesgos de distribución de inóculo infeccioso durante la comercialización y uso de semilla con estas características en nuevos agrosistemas. La aplicación de esta y otras investigaciones (Miranda, 1977 y 2005; Cerovich y Miranda, 2001; Miranda y Cerovich, 2001; Urdaneta, 2006; Díaz *et al.*, 2007) confirma la conveniencia de que SENASEM modernice los protocolos de las inspecciones para el control de calidad en campo y aseguramiento de la calidad de la SCM en Venezuela. En tal sentido, el fortalecimiento de la sostenibilidad del sistema nacional de certificación de semilla de maíz y otros cultivos dependerá de la incorporación de innovaciones tecnológicas y legales al sistema de certificación de semillas de maíz para asegurar óptima calidad sanitaria, genética y protección ambiental.

En relación al esperado efecto deletéreo de las infecciones de microbiota sobre el vigor y la germinación de la semilla infectada el Cuadro 3.2 del Capítulo III demuestra que la semilla de tres híbridos de maíz, producida en dos localidades y en dos épocas de siembra diferentes, presentan severas infecciones de los géneros *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium* pero manifiestan una excelente calidad fisiológica, porque sus porcentajes de germinación y vigor superan notablemente los límites requeridos para su aprobación como SCM según la legislación de semillas vigente en Venezuela.

**Cuadro 5.1.** Perfil de los actores registrados en el Servicio Nacional de Semillas como participantes en la producción de semilla certificada de maíz.

Actor	Categoría/ Clase	(%)
Individual	Fitomejorador	20
	Multiplicador	20
	Representante Técnico (RT)	60
Organización	Privada	35
	Oficial	60
	No responde	5
Clase de RT	Inspector de control de calidad	33
	Manejo agronómico	25
	Fitopatólogo	33
	Entomólogo	0
	Otro	8
Años de experiencia	<10	32
	10,0 - 20,0	26
	21.0 - 30.0	16
	> 30	26

Respecto a las características y experticia profesional de los actores de la producción de SCM, su percepción sobre la calidad sanitaria y los requisitos legales y técnicos exigidos por el SENASEM para la certificación de semilla de maíz el Cuadro 5.1 muestra que 20% de los encuestados son fitomejoradores, 20% multiplicadores,

60% representantes técnicos (RT), de los cuales 35% pertenecen a empresas privadas y 60% a organismos oficiales. Respecto a los años de experiencia en el PSCM 42 % tiene entre 10 y 30 años, 32 % menos de 10 años y 26 % más de 30 años en el programa. Estos resultados permiten concluir que los actores participantes en la producción de semilla certificada de maíz (PSCM) tienen excelente preparación técnica y amplia experiencia en sus áreas profesionales de competencia.

**Cuadro 5.2.** Percepción de los actores encuestados sobre la calidad sanitaria de la semilla de maíz producida en el país.

ITEM	Percepción	(%)
Calidad sanitaria general de la semilla de maíz comercializada en el país	Muy buena	5
	Buena	40
	Regular	35
	Mala	10
	Muy mala	5
	No responde	5
Calidad sanitaria de la “semilla experimental” producida en dos localidades de Aragua	Mejor	20
	Igual	55
	Inferior	5
	No responde	20
Aplicación de fungicidas como estrategia de control de patógenos en semilla de maíz	No	45
	Si	40
	No responde	15
Tipo de fungicida que utiliza	contacto	12,5
	sistémico	12,5
	ambos	50
	No responde	25
La aplicación de fungicidas garantizan la calidad sanitaria de la semilla producida	no	75
	si	25

El Cuadro 5.2, resume la percepción, de los encuestados sobre la calidad sanitaria de la SCM ya que 80% de los actores consideran que la calidad de la semilla

producida en el país varía entre “muy buena y regular” y un 15% la cataloga entre “mala y muy mala”. Respecto a la semilla de maíz producida en los campos experimentales bajo los protocolos para la presente investigación el 20% considera que la semilla producida en los campos donde ha participado es de mejor calidad que el resto mientras que el 55% dice que es igual. Esto nos indica que en general los actores del Sistema de Producción de SCM consideran que la semilla producida en Venezuela es de buena calidad. En lo referente al uso de fungicidas el 45% expresa que no se usa como medida de control de patógenos en la semilla, el 40% señala que si se hace determinando que se realizan entre una y dos aplicaciones de fungicidas, según estos últimos los tipos de fungicida utilizados en el campo de producción de semillas son de contacto (12,5%), sistémico (12,5%) o de ambos (50%). Del total de encuestados el 75% opina que las aplicaciones de fungicidas no son suficientes para garantizar la calidad sanitaria de la semilla.

Las respuestas de los actores consultados indican que aun cuando consideran que la semilla producida en el país es de buena calidad se requiere mejores controles de calidad en la producción y certificación de las mismas.

El Cuadro 5.3 presenta la percepción de los encuestados sobre los requisitos legales y técnicos del actual sistema de producción y certificación de semilla de maíz vigente. El 80% de los actores consultados declaran conocer las normas vigentes del SENASEM para la producción de SCM. En cuanto a enfermedades transmisibles por semilla el 90% afirma saber que la tolerancia máxima en campo para la enfermedad “Punta Loca” es 2%, complementada con ausencia total de otros patógenos del maíz. En este contexto, es importante destacar que 90% de los encuestados considera que aun cuando el SENASEM realiza inspecciones oculares en campo para evaluar la sanidad de la semilla estas son inefectivas para garantizar las tolerancias sanitarias formales establecidas por el SENASEM para asegurar la comercialización y uso de semilla de maíz libre de patógenos en las distintas zonas de producción del país.

En materia de análisis de laboratorio requeridos para evaluar la calidad sanitaria de la semilla en vías de certificación el 65% considera que los laboratorios del SENASEM no realizan análisis de laboratorio para determinar la presencia de patógenos transmitidos y/o transportados por la semilla de maíz ni de otros cultivos bajo certificación. Hecho que confirma las críticas de Miranda (1996, 2001, 2005 y 2014), Cerovich y Miranda (2001), Miranda y Urdaneta (2014a). Complementariamente, el 95% encuestado considera que el actual modelo de inspecciones en las fases de campo y comercialización no garantizan que la semilla está libre de patógenos ni otros requisitos exigidos por la legislación vigente de semillas, lo que coincide con los criterios de Miranda (2014) y Miranda y Urdaneta (2014a).

Este escenario explica que el 100% de los encuestados consideran que los análisis patológicos deben ser incorporados dentro de los análisis de laboratorio de rutina para garantizar la calidad sanitaria de la semilla de maíz y otros cultivos. También, el 95% de los encuestados consideran que se requieren nuevos protocolos técnicos y tolerancias para validar la calidad sanitaria de la semilla de maíz en términos de enfermedades, insectos plagas y malezas. Complementariamente, el 75% estima que el actual proceso de control de calidad sanitario de la SCM no garantiza la comercialización y uso de semilla de alta calidad sanitaria ni la sostenibilidad ambiental del sistema actual de Certificación de semillas de maíz. Según la opinión general de los actores consultados, la semilla producida y certificada de maíz es de buena calidad pero requiere la incorporación de los análisis de calidad sanitaria de la semilla en los laboratorios y la implementación de nuevos protocolos técnicos y tolerancias validadas para asegurar alta calidad genética, sanitaria y fisiológica de semilla comercializada y fortalecer la sostenibilidad ambiental del sistema actual de producción y certificación de semillas.

**Cuadro 5.3.** Percepción de los actores encuestados sobre Los requisitos para la certificación de semillas y que opinión tienen sobre el actual programa de certificación.

ITEM	Si/No	(%)
¿Conoce las normas vigentes para el control de malezas, insectos y enfermedades de la semilla certificada de maíz?	no	20
	si	80
2% máximo de plantas con síntomas de la enfermedad “Punta Loca” y “libre” de otros patógenos?	no	10
	si	90
Considera que ese requisito asegura la comercialización y uso de semilla de maíz libre de patógenos en las distintas zonas de producción del país?	no	90
	si	10
¿Los responsables del control de la calidad sanitaria de la semilla de maíz ((Internos: las empresas y externo: el SENASEM), realizan los análisis de laboratorio para determinar la presencia de patógenos transmitidos y/o transportados por la semilla?	no	65
	si	20
	No responde	15
Sin análisis patológico de la semilla, ¿las actuales inspecciones de campo y comercialización garantizan que la semilla está libre de patógenos y cumpla con los requisitos exigidos por la legislación de semillas?	no	95
	si	5
Si no se realizan análisis patológicos rutinarios de la semilla, ¿Cree usted que se deben incorporar dentro de los análisis de laboratorio?	si	100
¿Cree usted que se deben desarrollar nuevos protocolos y tolerancias para garantizar la calidad sanitaria de la semilla de maíz	no	5
	si	95
Según las respuestas previas, ¿Cree usted que el actual proceso de control de calidad sanitario de la semilla de maíz garantiza la comercialización y uso de semilla de alta calidad sanitaria y la sostenibilidad ambiental del sistema actual de Certificación de semillas de maíz?	no	75
	si	5
	No responden	20

En este sentido, Fontana y González (2000) y Vielma *et al.* (2005) confirman que el uso de la semilla certificada de maíz ha influido en el incremento del rendimiento promedio nacional, mientras que Vielma (2003) al revisar el programa tecnológico de las empresas de semillas de maíz asociadas a CANAPROSE observa que sus asociados controlan principalmente insectos plagas como cogollero, barredor y cortadores, enfermedades y manchas foliares y combaten malezas comunes del maíz, mientras que San Vicente (1985), citado por Vielma (2003), opina que se

requieren actividades adicionales para producir semillas de alta calidad dado que las practicas agronómicas para la multiplicación de la semilla de maíz son las mismas utilizadas para maíz de consumo.

En resumen, el aporte de los resultados obtenidos en los capítulos I, II y III más los generados para este capítulo V suministran la base experimental y referencial de la situación actual de la certificación de semilla de maíz en Venezuela, así como la debilidad de la sostenibilidad de este sistemas en los términos que plantean los resultados y recomendaciones de Cerovich y Miranda (2001), Díaz *et al.* (2007), Miranda (2014), y Miranda y Urdaneta (2014a y 2014b) sobre la necesidad de incorporar las innovaciones tecnológicas y legales que garanticen la producción, certificación y comercio de SCM con perfiles de calidad sanitaria sustancialmente superiores a la actual

## V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

1. La semilla certificada de maíz producida en Aragua, la principal zona del país, presenta una variada micobiota compuesta por fitopatógenos que requieren una caracterización adicional como factor de riesgo a la salud vegetal, animal y ambiental en las zonas de producción de semilla y grano de maíz del país.
2. Los altos % de incidencia de *Fusarium* spp., *Aspergillus* spp. y otros hongos encontrados no afectan la calidad fisiológica de la semilla certificada de maíz a juzgar por los excelentes niveles de germinación y vigor registrados.
3. Los actores participantes en el sistema de semilla certificada de maíz poseen excelente formación técnica y experiencia.
4. Las debilidades tecnológicas y legales del actual modelo de certificación no garantizan la sostenibilidad sanitaria de la producción de semilla de maíz.
5. Se recomienda la modernización tecnológica y legal del sistema para asegurar la producción, comercialización y uso de SCM con superior calidad genética y sanitaria en consonancia con la sostenibilidad ambiental requerida.

## VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVARADO, J. y HERNÁNDEZ, J. L. 2009. Significación de la semilla importada para el desarrollo de la producción de maíz y efectos de una limitación o suspensión de las importaciones de semilla. Periodo agosto, 2008 -enero 2009. Estudio realizado para la Asociación de Empresas de Semillas de Venezuela (AVESEM), Caracas, Ven.
- ANTOLINI, J. y C. GARCÍA. 1994. Micoflora en semillas de híbridos nacionales y granos de maíz (*Zea mays* L.) importado. II festival Nacional del maíz Jornada Científica. Guanare. VE
- BENNETT J.W. 2010. An overview of the genus *Aspergillus*. In: *Aspergillus: Molecular Biology and Genomics*. (Machida M, Gomi K, eds) Caizer Academic Press, Portland: 1–17.
- BUSH B J; M L CARSON; M A CUBETA; W M HAGLER y G A PAYNE. 2004. Infection and Fumonisin Production by *Fusarium verticillioides* in Developing maize kernels *Phytopathology*; 94: 1(88-93); ProQuest Biology Journals
- CABRERA, S. y GARCÍA, P. 2003. Evolución del cultivo de maíz en Venezuela. En: Memorias del X Curso sobre Producción de Maíz. Araure: INIA – ASOPORTUGUESA, p. 54-67.
- CEROVICH, M. y F. MIRANDA. 2001. Sanidad de semillas: componente básico de la calidad de semilla. En Curso de Patología de Semillas. XVII Congreso de Fitopatología de Semillas. Maracay, Ven. Universidad Central. Facultad de Agronomía. 17 pp
- CHRISTENSEN, C. y. H. KAUFMANN. 1965. Deterioration of stores grains by fungi. *Annual Review of Phytopathology* 3: 69 – 84.
- DA SILVA, L. 2005. Detección, identificación, ubicación y transmisión de especies de *Fusarium* en semillas de maíz (*Zea mays* L.) Tesis Magíster Scientiarum en Agronomía. UCV- Maracay. VE. 94 p.
- DIAZ, J. 2006. Características dimensionales y colorimétricas de cultivares comerciales de maíz con fines de procesamiento agroindustrial. Tesis de Maestría. Universidad Central de Venezuela, Facultad de Agronomía, 145 pp.
- DIAZ, J. F. MIRANDA, M. CEROVICH y R. FIGUEROA. 2007. Incidencia de *Fusarium verticillioides* en semillas certificadas de maíz producidas en la región central de Venezuela. XX Congreso Nacional de Fitopatología.

- DIENER, U. L., R. J. COLE, T. H. SANDERS, G. A. PAYNE, L. S. LEE, y M. A. KLICH. 1987. Epidemiology of aflatoxin formation by *Aspergillus flavus*. *Annu. Rev. Phytopathol.* 25:249-270.
- FLORES, Z. 2004. Certificación de semillas de maíz en la Región Central. INIA Divulga 2. Mayo – Agosto. 2004
- FONTANA, H. 2000. El futuro del maíz en Venezuela. En: El maíz en Venezuela. H. Fontana y C. González (Compiladores). Fundación Polar. p 467-489
- HORN, B. W. 2003. Ecology and population biology of aflatoxigenic fungi in soil. *Toxin Reviews*, 22(2-3), 351-379.
- INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION. 1996. International Rules for Seed Testing. Seed Science and Technology. Supplement 21. 288 p.
- 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
- MCGEE, D.C. 1988. Maize diseases. A reference source for seed technologists. St. Paul, Minnesota, US. P. 149.
- MINISTERIO DE AGRICULTURA Y CRÍA (MAC). 1961. Resolución MAC-INV-71. Normas específicas para la Certificación de Semillas en Venezuela. Caracas, Venezuela.
- MINISTERIO DE AGRICULTURA Y CRIA (MAC). 1986. Normas Generales sobre Semillas. Resolución Ministerial. MAC. DGSDA. Número 159. Gaceta Oficial de Venezuela N° 33.456.
- MIRANDA, F. 1977. The influence of some seed borne pathogens on soybean seed quality. M.S. Thesis. Mississippi State University. Mississippi State. MS.39762.
- MIRANDA, F. 1981. Chemical and biological protection of soybean seed quality. Ph.D. Dissertation. Mississippi State University. Mississippi State. MS.39762
- MIRANDA, F. 1996. El Servicio Nacional de Semillas y el Cambio Tecnológico en la Agricultura Venezolana: Evolución durante el período 1961–1995. FONAIAP Divulga N° 51. Pág. 67 – 69. Maracay, estado Aragua, Venezuela.
- MIRANDA, F. 2005. Evaluación del sistema de flujo nacional e importado de granos, semillas u otros materiales de reproducción existentes en la República Bolivariana de Venezuela”. En: Proyecto Marco Nacional de Seguridad de la

Biotecnología en Venezuela. Ministerio del Poder Popular para el Ambiente UNEP-GEF. Maracay. <http://www.minamb.gob.ve/files/conservacion-biose>.

- MIRANDA, F. 2014. Situación actual y perspectivas del sistema de producción y certificación de semillas en Venezuela. En. XV Jornadas Técnicas y Científicas de la Facultad de Agronomía de la Universidad del Zulia. Maracaibo, 15 de octubre de 2014.
- MIRANDA, F. y M. CEROVICH. 2001. Patología de Semillas. En: Curso de Patología de semillas XVII Congreso de Fitopatología de Semillas. Maracay, Venezuela. Universidad Central Facultad de Agronomía. 17pp.
- MIRANDA, F. y CEROVICH. 2004. Bases legales y técnicas para la certificación de semillas de arroz en Venezuela. En el Curso- Taller sobre producción de semilla de arroz, libres de arroz rojo organizado por FAO, Facultad de Agronomía de la UCV e INIA- Portuguesa. Araure, Portuguesa. Septiembre 2004. 22pp.
- MIRANDA, F. y URDANETA, L. 2014a. Contribución del sub sector privado de semillas al desarrollo e implantación de un “Sistema Nacional de Abastecimiento de Semilla de Calidad (SINABSEC)”. En Informe final de la Consultoría sobre “Fortalecimiento de la participación institucional de Aproscello, Fevearroz, Fundarroz, y Fundación Danac en las actividades legales y técnicas sobre semillas que adelanta la Asamblea Nacional. Acarigua, estado Portuguesa, octubre, 2014
- MIRANDA, F. y L. URDANETA. 2014b. Marco legal de la producción y certificación de semillas en Venezuela. En Congreso de Mejoramiento Genético y Biotecnología. Calabozo, estado Guárico. Julio 2014
- MUNKVOLD, G. P., D. V. MCGEE y W. M. CARLTON. 1997. Importance of different pathways for maize kernel infection by *Fusarium moniliforme*. *Phytopathology*. 87: 209-217.
- OROPEZA, H. y MAZZANI, B. 1997. Evolución tecnológica del maíz en Venezuela: selección de cultivares y producción de semilla. Caracas: Fundación Polar – Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuarias. 50 p.
- OROPEZA, H., C. MÁRQUEZ y D. NÚÑEZ T. 2000. Tecnología de la producción de semillas. *In*: El maíz en Venezuela. H. Fontana y C. González (Compiladores). Fundación Polar
- PEIXOTO, R. S.; TORRES, S. B. y KARASAWA, M. 1998. Qualidade sanitária e fisiológica de sementes de milho produzidas no sub-médio São Francisco. *Revista Brasileira de Sementes*, Brasília, v.20, n.1, p.12-15.

- RHEEDER J.P. y W.F.O. MARASAS. 1998. *Fusarium* species from plant debris associated with soils from maize production areas in the Transkei region of South Africa *Mycopathologia* 143: 113–119.
- RODRÍGUEZ L. A 1968. Análisis y certificación fitopatológica de semillas. *Rev. Fac. Agron. Maracay* 4 (3) 29-66
- SEGOVIA V. y J. ALFARO. 2009. El maíz: un rubro estratégico para la soberanía Agroalimentaria de los venezolanos. *Agronomía Tropical*. 59(3): 237-247.
- SERVICIO NACIONAL DE SEMILLAS - INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES AGRICOLAS. (SENASA-INIA) 2014. Producción de semilla certificada de maíz. Periodo 1993- 2013.
- SIRIACHA, P.; P. TONBOONEK; A. WONGURAI y S. KOSITCHAROENKUL. 1994. Preharvest contamination of maize by *Aspergillus flavus* In: Highley, E.; Wright, E.J.; Banks, H.J.; Champ, B.R. (Eds.), *Stored Product Protection, Proceedings of the 6th International Working Conference on Stored-Product Protection, 17-23 April 1994, Canberra, Australia*. CAB International, Wallingford, United Kingdom. <http://spiru.cgahr.ksu.edu/proj/iwcspp/iwcspp6.html>
- VIELMA, M. 2003. Evaluación técnico-económica de la cadena de semillas y producción de granos de maíz (*Zea mays*, L) en Venezuela. Trabajo de grado presentado como requisito final para optar el título de Doctor en Ciencias Agrícolas. Maracay, Venezuela 117 pp.
- VIELMA, M., M. CEROVICH; F. MIRANDA y C. MARÍN. 2005. Influencia de la semilla certificada de maíz en la productividad de los sistemas de producción de maíz en grano de los estados Portuguesa y Guárico. *Agronomía Tropical*, vol. 55, n° 3, pp. 343-361.
- WICKLOW D.T. y D.M. WILSON. 1986. Germination of *Aspergillus flavus* sclerotia in a Georgia maize field. *Trans Br. Mycol Soc.* 87: 651–653. (En línea: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0007153686801103>)
- WILKE, A. L.; C. R. BRONSON; A. TOMAS y G. P. MUNKVOLD. 2007. Seed transmission of *Fusarium verticillioides* in maize plants grown under three different temperature regimes. *Plant Dis.* 91:1109-1115.
- URDANETA, L. 2006. “Diagnóstico del sistema de producción y control de calidad de la semilla Certificada de arroz en Venezuela”. Tesis de Maestría. Universidad Central de Venezuela, Facultad de Agronomía, p. 115.

**ANEXO CAPITULO V**

## **ANEXO 5.1**

### **ENCUESTA**

**UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA  
FACULTAD DE AGRONOMIA  
DOCTORADO DE CIENCIAS AGRICOLAS**

PARA: Actores del proceso de certificación de semillas de maíz  
DE: Neyda Simosa, estudiante del doctorado en Ciencias Agrícolas de la UCV  
ASUNTO: Encuesta para actualizar el seguimiento técnico del control de calidad sanitaria de la semilla certificada de maíz

Estimado Sr.

Por medio de la presente solicitamos su valiosa colaboración para obtener la información que nos permita identificar el estado actual del seguimiento de la calidad sanitaria de la semilla certificada de maíz, con el único fin de delinear recomendaciones que contribuyan a la identificación de métodos y procedimientos para modernizar este proceso.

En este sentido, declaramos que la información solicitada tendrá un uso exclusivo como insumo para la investigación titulada “INFLUENCIA DE LA MICROBIOTA ASOCIADA AL MAÍZ (*Zea mays* L.) SOBRE LA CALIDAD SANITARIA DE LA SEMILLA Y LA SOSTENIBILIDAD DEL SISTEMA DE CERTIFICACION DE SEMILLAS DE ESTE CULTIVO EN VENEZUELA ”, que adelantamos como requisito para optar al doctorado en Ciencias agrícolas del postgrado de la Facultad de Agronomía de la Universidad Central de Venezuela (UCV)

Agradeciendo anticipadamente su participación en la presente encuesta técnica

Atentamente

Ing. Agr. Neyda Simosa  
Responsable de la investigación

Dra. Miriana Cerovich  
Prof. Tutora

**I.- Información General.**

1. ¿A cual categoría de actor del proceso de certificación de semilla de maíz pertenece usted.?:

- a. Fitomejorador \_\_\_\_
- b. Productor de semilla : \_\_\_\_
- c. Comerciante: Importador \_\_\_\_ Distribuidor nacional \_\_\_\_ Ambos \_\_\_\_
- d. Representante Técnico (RT):\_\_ De empresa privada \_\_\_\_ De un organismo Oficial\_\_
- e. A cual clase de RT corresponde
  - 1. Inspector de control de calidad: \_\_\_\_
  - 2. Fitopatólogo \_\_\_\_
  - 3. Entomólogo \_\_\_\_
  - 4. Otro \_\_\_\_

3. Años de experiencia en su área experticia?: \_\_\_\_\_ años.

**II. Calidad sanitaria de la semilla de maíz**

1. ¿Como considera usted la actual calidad sanitaria de la semilla de maíz que se comercializa en el país?

- a. Muy buena \_\_\_\_
- b. Buena \_\_\_\_
- c. Regular \_\_\_\_
- d. Mala \_\_\_\_
- e. Muy mala \_\_\_\_

2. Respecto a su respuesta en la pregunta anterior, cree usted que la calidad de la semilla producida en los campos donde usted participó es:

Mejor \_\_\_\_

Igual \_\_\_\_

Inferior \_\_\_\_

Porque? \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

3. ¿Realiza usted aplicaciones de fungicidas como medida de control de patógenos en las semillas?

Si \_ ¿Con fungicidas de contacto \_\_o sistémico\_\_? Cuántas aplicaciones \_\_\_\_

No \_\_ ¿Porque?

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

4. ¿Cree usted que la(s) aplicación(es) de fungicidas que se realizan en el campo, son suficiente para garantizar la calidad sanitaria de la semilla producida?

a. Si \_\_\_\_

b. No \_\_\_\_

### III. Sobre la calidad sanitaria de la semilla certificada maíz.

1. ¿Conoce usted las normas específicas vigentes para el control de malezas, insectos y enfermedades de la semilla certificada de maíz?  
a. Si \_\_\_\_ b. No \_\_\_\_
2. ¿Sabía usted que la Resolución Reglamentaria y Requisitos para la Producción de Semillas Certificadas MAC Inv-71 establece como requisitos específicos con respecto a calidad sanitaria, que en la inspección final en el campo, la plantación no debe presentar más del 2% de plantas con síntomas de la enfermedad conocida como “Punta Loca” y debe estar libre de otros patógenos?  
Si \_\_\_\_ b. No \_\_\_\_
3. ¿Considera usted que este requisito es suficiente para asegurar la comercialización y uso de semilla de maíz libre de patógenos en las distintas zonas de producción del país?  
a. Si \_\_\_\_ b. No \_\_\_\_  
¿Porque? \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_
4. ¿Los responsables del control de la calidad sanitaria de la semilla de maíz (Internos: las empresas y externo: el SENASEM), realizan los análisis de laboratorio para determinar la presencia de patógenos transmitidos y/o transportados por la semilla?  
Si \_\_\_\_ b. No \_\_\_\_
5. Si no se realiza el análisis patológico de la semilla ¿garantizan las actuales inspecciones de campo y comercialización, que la semilla está libre de patógenos y cumple con los requisitos legales exigidos por la legislación vigente de semillas?  
Si \_\_\_\_ b. No \_\_\_\_
6. Si no se realizan análisis patológicos rutinarios de la semilla ¿Cree usted que se deben incorporar dentro de los análisis de laboratorio?  
Si \_\_\_\_ b. No \_\_\_\_
7. ¿Cree usted que se deben desarrollar nuevos protocolos técnicos y tolerancias para garantizar la calidad sanitaria de la semilla de maíz en términos de enfermedades, insectos plagas y malezas de las mismos?  
Si \_\_\_\_ b. No \_\_\_\_
8. Por lo antes mencionado ¿Cree usted que el actual proceso de control de calidad sanitario de la semilla de maíz garantiza la comercialización y uso de semilla de alta calidad sanitaria y la sostenibilidad ambiental del sistema actual de Certificación de semillas de maíz?  
Si \_\_\_\_ b. No \_\_\_\_

## CAPITULO VI

### DISCUSIÓN GENERAL

El maíz es un cultivo estratégico para la dieta del venezolano y la seguridad agroalimentaria del país. Los avances en mejoramiento genético y producción de semilla certificada de maíz (SCM) han fortalecido la productividad y el abastecimiento nacional de este cultivo. La región central del país persiste como la principal zona de producción y comercialización de SCM, pero las investigaciones de Da Silva (2006), Díaz (2006) y Díaz, Miranda *et al.* (2007) destacan problemas sanitarios y agronómicos asociados con debilidades tecnológicas y operativas de los programas de producción y control de calidad de las empresas productoras y el Servicio Nacional de Semillas (SENASA), respectivamente.

En el capítulo I, se caracterizó el origen, diversidad y magnitud de la MT y MI en los componentes bióticos del ciclo de producción de la SCM como estrategia para identificar programas de control y mejoramiento de la calidad sanitaria de la SCM, a saber, semillas parental de los híbridos Himeca 3002, DANAC 3273 y Sefloarca 91; follaje de las plantas y semillas en diferentes etapas de maduración.

La metodología utilizada fue consistente e innovadora porque permitió sistematizar los procedimientos de muestreo y caracterización del inóculo de microbiota contenida en los componentes bióticos de la producción de SCM a saber: semilla parental de los tres híbridos utilizados (Himeca 3002, DANAC 3273 y Sefloarca 91), suelos de las localidades y épocas de producción seleccionadas, diferentes estados de desarrollo y maduración de las plantas madres y de sus semillas en vías de certificación.

En general, los resultados de esta investigación confirman que la semilla es un medio eficiente de diseminación de patógenos que afecta la calidad sanitaria de SCM

y podría amenazar la sostenibilidad de las áreas de producción de semilla y granos de este cultivo.

La microbiota total (MT) consistió de ocho fitopatógenos destacándose *Fusarium* spp. y *Aspergillus* sp. por su alto riesgo epidemiológico y sanitario asociado con la producción de fumonisinas y otras toxinas perjudiciales a la salud vegetal, animal y humana en las áreas de producción de semillas y granos de maíz del país (Diener *et al.*, 1987; McGee, 1988; Mycock, 1990; Mazzani *et al.*, 1997, 2001; Mazzani *et al.*, 2001; Luzón *et al.*, 2003; Da Silva, 2006; Díaz, 2006; Díaz, Miranda *et al.*, 2007).

Respecto a las fuentes del inóculo primario de MT identificado, la semilla parental de los tres híbridos presentó alta incidencia con rango de 72 - 98% en la semilla materna y 53 - 65% en la paterna. Consecuencialmente, la progenie de los tres híbridos presentó altos porcentajes de infección por MT durante su desarrollo y la madurez fisiológica (MAFI) de todos los lotes con máxima incidencia (94 – 98 %) en la etapa de MACO.

En los suelos de las localidades y épocas de siembras utilizados la mayor incidencia de *Aspergillus* sp. y *Penicillium* sp. confirmaron que los suelos son una fuente de inóculo primario para invasión de la semilla del maíz sembrado, confirmando así los trabajos de Diener *et al.* (1987) y Mycock (1990). Adicionalmente, la ausencia de *Fusarium* sugiere que los suelos de las localidades y épocas de siembra referidas no son fuente de inóculo potencial para este patógeno, resultado que coincide con la investigación de Leslie *et al.* (1990) y Rheeder y Marasas (1998) quienes observaron que *F. moniliforme*, *F. proliferatum* y *F. subglutinans* fueron comunes en tejidos del maíz sin sobrevivir en muestras de suelo o rastrojos de cosecha, probablemente porque no produce clamidosporas.

Los híbridos sembrados fueron similarmente susceptibles a infecciones de MT y MI, porque las incidencias registradas en sus semillas variaron entre “alta y muy alta” para todos los híbridos, lotes de producción, localidades y épocas de producción de la SCM experimental. Este cuadro sanitario está directamente asociado con los alarmantes niveles de inóculo primario cuantificado en la semilla parental original, suelos de las localidades de producción, épocas de siembra (EDS), etapas de desarrollo (ED) y maduración de plantas madres y semillas de los híbridos utilizados. También se comprobó menor incidencia de MT y MI durante la EDS de norte-verano que en el periodo de lluvias indicando que la producción de SCM debería concentrarse en la EDS norte verano con riego complementario y cosecha temprana, como una estrategia sustentable para mejorar la calidad sanitaria y fisiológica de la SCM actualmente comercializada.

En el capítulo II, el muestreo semanal de inflorescencia femenina desde la formación de panoja (VT) hasta madurez fisiológica (MAFI) y madurez de cosecha (MACO) permitió caracterizar el patrón de infección de la microbiota durante las etapas de formación, desarrollo, maduración y pos maduración de la semilla de los híbridos evaluados. Estos resultados demostraron que a partir de la etapa reproductiva R1, la microbiota principal estuvo constituida por *Fusarium*, *Aspergillus* y *Penicillium*, los estigmas registraron la mayor incidencia de inóculo confirmando su importancia como fuente de contaminación de la semilla de maíz y se mantuvo la tendencia creciente de la incidencia de hongos hacia la MAFI de la semilla con máximo nivel de *Fusarium* y *Penicillium* en MACO. Estos resultados corroboran los informes de Siriacha *et al.* (1994), Munkvold and Carlton (1997) y Bush *et al.* (2004) y validan el patrón de infecciones de MT expuesto en el capítulo 1 de esta investigación.

Los híbridos Himeca 3002 y DANAC 3273 sembrados en época de lluvia tuvieron mayor incidencia de MT que Sefloarca 91 sembrado en época de norte

verano ratificando la conveniencia de sembrar en época de norte verano y cosechar tempranamente como estrategia para mejorar la actual calidad sanitaria de la SCM.

En el capítulo III, se evaluó el efecto de inóculo de micobiota natural sobre la calidad fisiológica de la semilla de los tres híbridos producida en dos localidades y épocas de siembra. Todos los lotes de semilla cosechados en su MACO mostraron alto vigor y germinación superior al 88% exigido por las normas de SENASEM para certificación de semillas de maíz (MAC- INV 71 y MAC DGDA-159- 1986). El análisis sanitario sobre los duplicados de las muestras utilizadas para los ensayos de calidad fisiológica identificó alta incidencia de los hongos *Fusarium* spp., *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp. (*A. niger* y *A. flavus*) *Acremonium* y *Rhizopus* confirmando que el inóculo de micobiota en la semilla afecta la calidad sanitaria pero no la calidad fisiológica de la SCM. Estos hallazgos validan los resultados de Da Silva, 2006; Díaz, 2006; Díaz *et al.*, 2007 para semilla de maíz y Miranda (1981 y 1977) con semilla de soya, en Misisipi. EE.UU.

En los precedentes capítulos I, II y III se demostraron los problema de calidad sanitaria derivados del alto y variado inóculo de micobiota que infecta todos los agentes biótico de la producción de SCM, a saber semilla parental, suelos de las zonas de producción, órganos vegetativos y reproductivos de las planta madres y semillas en desarrollo y maduras.

En el capítulo (IV) se evaluó la eficacia de aplicaciones pre siembra y foliares pre cosecha de fungicidas para mejorar la calidad sanitaria de la SCM mediante la reducción del inóculo de micobiota en la SCM. En laboratorio, semillas del híbrido Himeca 3002 fueron tratadas con dosis comerciales de los fungicidas Carboxin+Thiram, Captan, Myclobutanil, Carbendazim, Benomyl, y un Testigo no tratado,utilizando la metodología especificada en la sección de Materiales y Métodos del capítulo IV. Los resultados indicaron que Benomyl realizó el mejor control

presiembr de la MT (3,00 %) comparado con el 100,00 % del Testigo y además erradico el inóculo de *Fusarium* spp. (0,00 %).

En el campo, para evaluar el efecto del Benomyl sobre las calidades sanitaria y fisiológica de semilla del híbrido DANAC 3273 se realizaron tres aplicaciones de 250 g/ha. cada una comparado con un Testigo sin fungicida, con seguimiento de la incidencia de MT y MI durante las etapas VT, R2, R4, MAFI y MACO. La efectividad del Benomyl sobre la calidad fisiológica de las semillas fue evaluada en las etapas MAFI y MACO mediante pruebas de germinación estándar y vigor según el protocolo de la ISTA (1996). Los resultados indicaron que las aplicaciones de Benomyl mejoraron sustancialmente la calidad sanitaria de la semilla en MAFI, porque el inóculo de la MT y *Fusarium* fue reducidos en 50% y 67% respectivamente, en comparación a los porcentajes registrados para el Testigo. En MACO el grado de control fue de 2% y 8% para MT y *Fusarium* respectivamente, comparados con los muy altos porcentajes de inóculo del testigo, probablemente asociado con condiciones promotoras del deterioro sanitario de las semillas. En este contexto, los porcentajes de germinación y vigor de la semilla superior al 92%, validan la conclusión del capítulo III referida a que las altas incidencia de MT y *Fusarium* en MAFI y MACO no afectaron la calidad fisiológica exigida por el SENASEM para la comercialización de la SCM producida en la región central del país.

Para estimar la influencia potencial de la distribución de semilla de híbridos de maíz portadora de micobiota transmisible sobre la sostenibilidad del actual sistema de certificación de semillas, caracterizar la influencia del inóculo de micobiota endémico sobre la calidad sanitaria de la SCM producida en la zona central del país y la sostenibilidad del sistema de certificación de semillas de Venezuela se utilizaron los resultados de los capítulos I, II y III de este trabajo complementados con las respuestas de los actores del sistema de producción de SCM sobre el funcionamiento de este sistema.

Los cuadros 1.2 y 1.4 del capítulo I; 2.2 y 2.3 del capítulo II y 3.2 del capítulo III, respectivamente, demuestran que la SCM tiene baja calidad sanitaria por su alto contenido de inóculo endémico de fitopatógenos con alto poder epidemiológico en todos los agentes bióticos que intervine en el proceso de producción de SCM, a saber: semilla de los parentales; suelos de las localidades y épocas de siembra; follaje del cultivo, estructuras reproductivas y semillas a la MAFI y MACO. Contrario a lo esperado, esta semilla con problemas sanitarios presenta excelentes germinación y vigor demostrando que los problemas de calidad sanitaria no afectan la calidad fisiológica de la SCM exigidos por SENASEM para su certificación. Los actores del sistema de producción de SCM consultados destacan que la certificación de semillas no debe depender de inspecciones oculares de campo sin análisis de laboratorio que validen la calidad sanitaria de la SCM. También opinan que se requiere un actualizado marco legal, tecnológico y operativo que apoye a los productores y al SENASEM en el aseguramiento de la calidad de SCM y la sostenibilidad del sistema de producción de maíz, al mitigar el impacto ambiental debido a la comercialización de SCM con inóculo potencial de patógenos de alto riesgo epidemiológico como *Fusarium spp.* y *Aspergillus sp.*

Las conclusiones y recomendaciones a las cuales se llegó en cada capítulo fueron recopiladas en el cuadro 7.1

**Cuadro 7.1:** Recopilación de las conclusiones y recomendaciones de los capítulos

CAPITULO	CONCLUSIONES	RECOMENDACIONES
I	<p>1. La SCM producida en Aragua, contiene micobiota de carácter endémico, alta incidencia y variada composición</p> <p>2. La calidad sanitaria de la SCM, es consecuencia del inóculo endémico en los componentes bióticos de la cadena de producción, a saber: semilla parental; suelos, localidades y épocas de siembra; plantas madres infectadas durante su desarrollo vegetativo y reproductivo, semillas en desarrollo y maduración.</p>	<p>1. Desarrollar investigaciones para caracterizar el riesgo epidemiológico y ambiental asociado con la producción, distribución y uso de SCM con los perfiles sanitarios encontrados.</p> <p>2. Explorar nuevas zonas de producción de SCM, con menor presión de inóculo potencial de micobiota que garanticen mejor calidad sanitaria, fisiológica y genética.</p>
II	<p>1. La metodología utilizada es novedosa para estudios de patología, calidad sanitaria y tecnología de producción de SCM y otros cultivos.</p> <p>2. <i>Fusarium</i> sp., patógeno de alto riesgo epidemiológico, es la principal fuente de inóculo infeccioso de la SCM.</p> <p>3. Los estigmas son la principal vía de infección hacia la semilla, y los granos de polen no son fuente de inóculo para la SCM</p> <p>4. La infección de la semilla de maíz aumenta en las etapas de desarrollo y MAFI de la semilla, y es máxima a la MACO.</p>	<p>1. Para mejorar la calidad sanitaria de la SCM, se recomienda producirla en época de norte –verano, con riego complementario y riguroso programa de control de calidad en campo y cosecha.</p> <p>2. Desarrollar investigaciones para fortalecer la sostenibilidad de la producción de SCM.</p>
III	<p>Alta incidencia del inóculo de micobiota no afecta la calidad fisiológica de la SCM</p>	

IV	<p>1. Benomyl es un fungicida muy eficaz para el control pre siembra de inóculo de micobiota de semilla de maíz.</p> <p>2. Aplicaciones foliares de Benomyl hasta la etapa de MAFI, mejoran la calidad sanitaria de la SCM, mediante la significativa reducción del inóculo de MT y Fusarium en semillas maduras.</p> <p>3. El inóculo de la micobiota en la semilla no afecta la germinación ni el vigor de la SCM</p>	<p>1. Evaluar nuevos fungicidas, en dosis y cronogramas de aplicación pre siembra y foliares para definir estrategias de control de micobiota que mejoren significativamente la calidad sanitaria de la SCM.</p>
V	<p>1 La SCM producida en Aragua, la principal zona del país, presenta una variada micobiota compuesta por fitopatógenos que requieren una caracterización adicional como factor de riesgo a la salud vegetal, animal y ambiental en las zonas de producción de semilla y grano de maíz del país.</p> <p>2 Los altos porcentajes de incidencia de <i>Fusarium</i> sp., <i>Aspergillus</i> sp. y otros hongos encontrados, no afectan la calidad fisiológica de la semilla certificada de maíz, a juzgar por los excelentes niveles de germinación y vigor registrados</p> <p>3 Los actores participantes en el sistema de SCM, poseen excelente formación técnica y experiencia.</p> <p>4 Las debilidades tecnológicas y legales del actual modelo de certificación no garantizan la sostenibilidad sanitaria de la producción de semilla de maíz.</p>	<p>1. Implementar la modernización legal, tecnológica y operativa del sistema para asegurar la producción, comercialización y uso de SCM con superior calidad genética y sanitaria, en consonancia con el apoyo a la sostenibilidad ambiental requerida.</p> <p>2. Promover estudios para establecer rangos de tolerancia sanitaria de apoyo a la producción de SCM de buena calidad sanitaria, fisiológica y genética.</p>