

Análisis interlaboratorio para determinar *Fusarium verticillioides* en semilla de maíz

M. Scandiani<sup>1,2,3</sup>, A. Luque<sup>1</sup>, C. Carracedo<sup>2</sup>, A. Celotto<sup>2</sup>, R. Elizalde<sup>2</sup>, A. Grub<sup>2</sup>, V. Palahy<sup>2</sup>, A. Petinari<sup>2</sup>, R. Picone<sup>2</sup>, A. Rosso<sup>2</sup>, M. Rozenzvaig<sup>2</sup>, M. Sarmiento<sup>2</sup>, R. Sola<sup>2</sup>, M. Souilla<sup>2</sup>, M. Tommasi<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Centro de Referencia de Micología. Rosario, Argentina. <sup>2</sup>Asociación de Laboratorios Agropecuarios Privados (ALAP). <sup>3</sup>Rizobacter Argentina S.A.

## Introducción

Existen hongos de semilla que reducen la germinación y otros que no lo hacen, o lo hacen en menor grado, por lo tanto los primeros son capaces de reducir el stand de plantas y los segundos no. Entre estos últimos se encuentran algunos que no se asocian con enfermedades del cultivo, pero, hay otros de gran importancia epidemiológica, altamente relacionados con la ocurrencia de enfermedades en el cultivo, principalmente en plantas adultas y en espiga, como es el caso de *Fusarium verticillioides*. Dentro de este género, se encuentran especies que pueden ser patógenas tanto para humanos como para vegetales, y las más frecuentemente halladas son *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum* y *Fusarium verticillioides*. Algunas muestras pueden presentar contaminaciones, impurezas, restos de cultivo, semillas amohosadas, etc. En el caso de muestras correspondientes a híbridos comerciales de maíz, la mayoría presenta, un aspecto excelente, uniforme, limpio y sano. Pero en algunas de ellas se ha detectado, mediante el análisis sanitario, elevada incidencia de *Fusarium*, como un problema que merece atención y ocupación, y generar conocimiento. Es muy importante producir semillas sanas o con bajos niveles de *F. verticillioides*, para ello es necesario contar con un sistema de determinación del patógeno confiable, rápido y fácil de implementar.

Con el objetivo de mejorar la calidad en la evaluación de la incidencia de *F. verticillioides* (FV), en semilla de maíz, se realizó un análisis comparativo entre 14 laboratorios de análisis de semillas.

## Metodología

Los 14 laboratorios participantes aplicaron la técnica de detección de FV en semillas, basada en una variante del blotter test, de incubación con congelamiento sobre papel (*Deep freezing method*). Este método fue presentado y discutido previamente en el Taller de determinación de patógenos en semillas de maíz (Centro de Referencia de Micología, CEREMIC 2014) y en la Reunión Plenaria de ALAP, en Venado Tuerto (2014).

Los laboratorios participantes, localizados en diferentes sitios del país, cuentan con la acreditación para realizar análisis de semillas en el Mercosur. Cada laboratorio recibió un protocolo de trabajo, y 3 muestras de semilla de maíz,

con distintos niveles de contaminación. La semilla de la muestra 1 se sembró tal cual, mientras que las semillas de las muestras 2 y 3 fueron desinfectadas previamente por inmersión durante 1 minuto en hipoclorito de sodio al 1% y posterior enjuague en agua destilada estéril. Se sembraron 4 repeticiones de 50 semillas cada una en bandejas de 16 x 20 x 5 cm y se incubaron 24 h a  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , 24 h a  $-20^{\circ}\text{C}$ , y luego a  $25^{\circ}\text{C}$ , con ciclos de 12 h de luz fluorescente-12 h oscuridad durante 7 días. Se evaluó el % de semillas que presentaban desarrollo de estructuras fúngicas que permitieran identificar el patógeno. Sobre los resultados obtenidos se aplicó ANOVA y las medias se separaron por el test de las diferencias mínimas significativas (DMS) al nivel del 5%.

### Resultados y discusión

Los resultados mostraron que el entrenamiento previo realizado permitió que los analistas identificaran al patógeno y disminuyó el riesgo de confusiones con otros hongos (Figuras 1 y 2). La incubación sobre papel con congelamiento demostró ser un método sensible, económico y fácil de realizar. La incidencia promedio fue de 51, 50 y 16%, para las muestras 1, 2 y 3 respectivamente. Se observó variabilidad de los resultados, debido probablemente a la naturaleza de este patógeno (Tabla 1). En una próxima etapa, con los resultados obtenidos se analizará la repetibilidad y reproducibilidad, con el objetivo de estimar la tendencia de los laboratorios a sub o sobre estimar sobre la media de todos los resultados y la variabilidad entre las repeticiones. Este análisis interlaboratorio, para la determinación de *FV* mediante *blotter test* con congelamiento, es el primero realizado en Argentina. La semilla sana es la base de un buen cultivo.

Un sistema sustentable debería contemplar la siembra de semillas sanas, *FV* es uno de los agentes predominantes causales de podredumbres de raíces, quebraduras de base de tallos, podredumbres de espigas, micotoxinas, y, finalmente de enfermedades en las personas.

La correcta identificación y estimación de la incidencia de *FV* en muestras de semilla permitirá brindar un mejor servicio, tanto al productor agropecuario como al asesor técnico.

La industria de semillas debería incluir la determinación de la sanidad de la semilla en su laboratorio de calidad. En el caso de presentar elevada incidencia de *Fusarium* debería tratar esa semilla con productos eficientes, en el caso del control químico de *FV*, estos productos se encuentran dentro del grupo de los bencimidazoles. El uso de semillas sanas junto con la elección del curasemilla que contenga moléculas compatibles con el ambiente, suelo, agua y aire, contribuyen con el sistema sustentable.

Código de laboratorio	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3
1	61,99 bc	58,88 bc	23,90 a
2	67,92 ab	51,71 cde	9,56 ef
3	39,76 efg	46,22 def	24,82 a
4	23,81 i	No participó	12,47 def
5	77,93 a	75,46 a	10,43 def
6	54,76 cd	71,94 a	24,47 a
7	63,80 bc	36,36 g	7,41 f
8	46,74 de	73,99 a	No participó
9	58,35 bc	46,25 def	15,94 bcd
10	36,36 gh	10,90 h	15,55 cd
11	60,42 bc	No participó	No participó
12	56,87 bcd	No participó	No participó
13	29,84 hi	42,22 efg	12,31 def
14	37,38 fgh	40,24 fg	15,19 de
cv%	8,61	8,83	18,29

Tabla 1. Incidencia (%) de semillas con *Fusarium verticillioides*, incubadas con congelamiento sobre papel, obtenida por los laboratorios participantes

Letras iguales indican diferencias no significativas según DMS 5%.

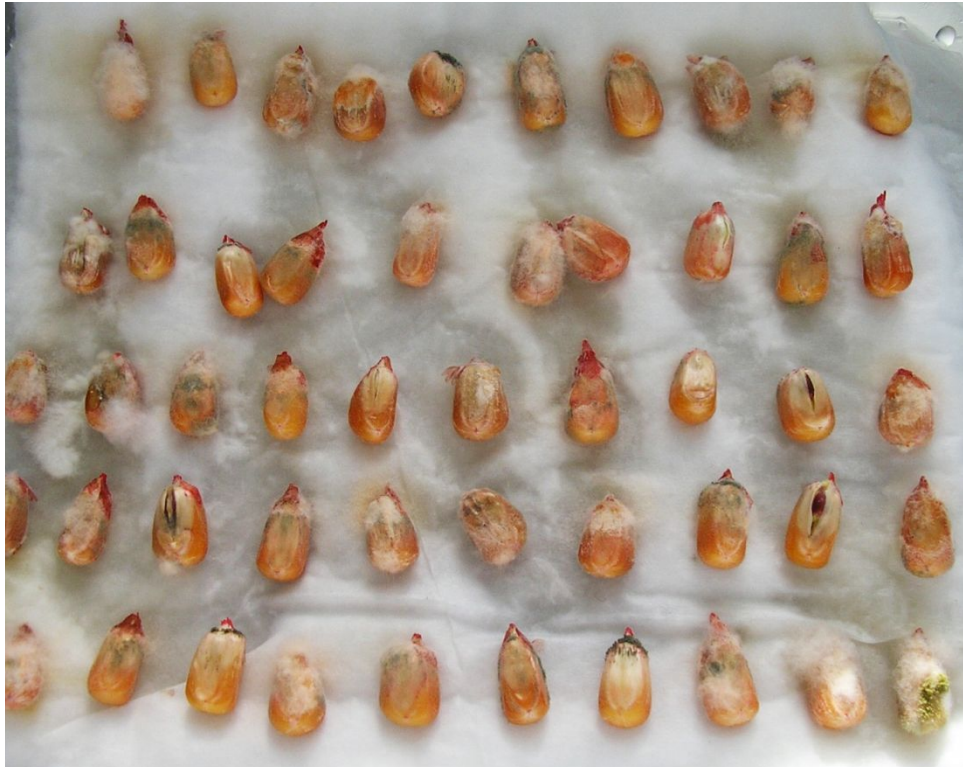


Figura 1- Vista de una repetición de 50 semillas de maíz, con desarrollo de *Fusarium verticillioides*.

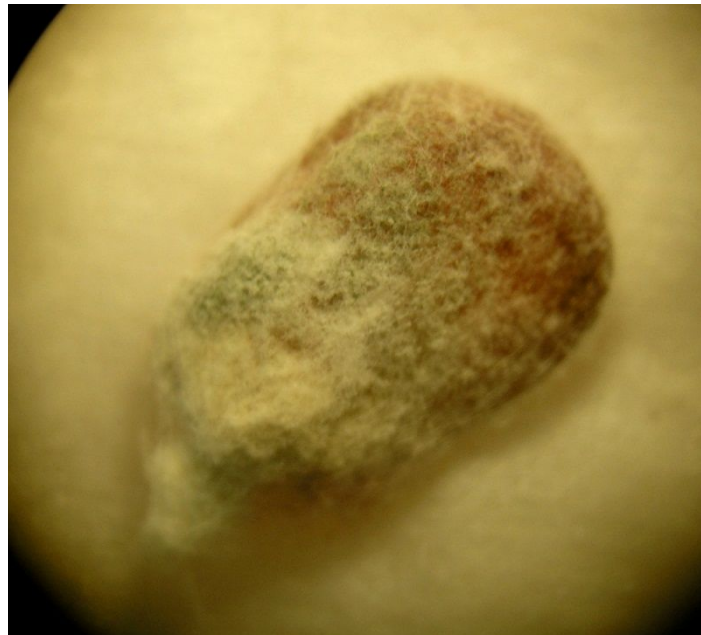


Figura 2. Semilla de maíz con desarrollo de estructuras de *F. verticillioides*.

## Bibliografía consultada

Carmona M y Scandiani MM. "Importancia y control de *Fusarium verticillioides* en semillas de maíz Propuesta para su manejo". IX Congreso Nacional de Maíz, 17 al 19 de noviembre de 2010, Rosario, P 180-181.

Carmona M y Scandiani MM. "Importancia y control de *Fusarium verticillioides* en semillas de maíz. Propuesta para su manejo". 2011. Revista Maíz en Siembra Directa Ed AAPRESID, P 73-76.

Machado JC, Langerak CJ, Jaccoud-Filho DS. 2002. Seed-borne fungi: A Contribution to Routine Seed Health Analysis. ISTA. 134 pp.

Mathur SB, Kongsdal O. 2003. Common Laboratory Seed Health Testing Methods for Detecting Fungi. ISTA .1º ed. 425 pp.

Scandiani MM y Luque AG. 2009. Manual: "Identificación de Patógenos en Semilla de Soja". Suplemento Especial N° 2, 2009. Análisis de Semillas. 148 pp.