

LA PIGMENTACIÓN DE *Fusarium verticillioides* (SACC.) COMO FACTOR DE VIRULENCIA EN PLÁNTULAS DE MAÍZ¹

Alma Rosa Solano-Báez², Carlos De León-García De Alba², Guadalupe Valdovinos-Ponce²,
Hilda Victoria Silva-Rojas³, Lauro Soto-Rojas²

RESUMEN

La pigmentación de *Fusarium verticillioides* (Sacc.) como factor de virulencia en plántulas de maíz. El objetivo de este trabajo fue determinar la relación entre el color del pigmento producido por aislamientos de *F. verticillioides* y la virulencia en plántulas de maíz. Las mazorcas de maíz sintomáticas y asintomáticas se colectaron en el Estado de Veracruz, México durante el ciclo agrícola primavera-verano 2008. El experimento se analizó siguiendo un diseño experimental en parcelas con doble división y se realizó en condiciones de invernadero en dos ciclos; otoño- invierno 2008 y primavera-verano 2009, en el Colegio de Postgraduados Campus Montecillo, Estado de México. La pigmentación de los aislamientos obtenidos de semillas sintomáticas con micelio morado, fue más intensa y con micelio blanco mostraron un color más homogéneo, mientras que los de semillas asintomáticas tuvieron coloraciones de micelio violeta tenue y de blanco a crema. Los aislamientos obtenidos de semillas sintomáticas y asintomáticas fueron patogénicos, el de color morado de semillas sintomáticas fue más virulento que el blanco, caso contrario en semillas asintomáticas, donde el blanco fue más virulento.

Palabras clave: Hongos, micelio-morado, micelio-blanco, semilla-sintomática, semilla-asintomática.

ABSTRACT

The pigmentation of *Fusarium verticillioides* (Sacc.) as factor of virulence in maize seedlings. This research aimed to determine the relationship between the color of the pigment produced by isolates of *F. verticillioides* and virulence in maize seedlings. Symptomatic and asymptomatic corn cobs were collected in Veracruz State, Mexico during the spring-summer cycle of 2008. The experiment was analyzed using an experimental design in split plots with a double division, under greenhouse conditions during two crop cycles, fall-winter of 2008 and spring-summer of 2009, in the Postgraduate College Campus Montecillo, Mexico State. The pigmentation of the isolates obtained from symptomatic seeds with mycelium was more intense with a purple color, and the white mycelium isolates showed a more homogeneous color. Isolates from asymptomatic seeds had a tenuous violet coloration, and from white to cream coloration of mycelium. It was observed that isolates from symptomatic and asymptomatic seeds were pathogenic; the purple isolations from symptomatic seeds were more virulent than the white isolate, opposite to what happened with the isolation from asymptomatic seeds, in which the white mycelium was more virulent.

Key words: Fungi, purple-mycelium, white-mycelium, symptomatic and asymptomatic seed.



¹ Recibido: 21 de octubre, 2010. Aceptado: 3 de octubre, 2011. Este trabajo corresponde a una Tesis de Maestría realizada en el Instituto de Fitosanidad – Fitopatología del Colegio de Postgraduados, Edo De Méx. México.

² Instituto de Fitosanidad. Fitopatología. Colegio de Postgraduados, Km. 36.5 Carretera México-Texcoco Montecillo, C.P. 56230. solanob@colpos.mx, cdeleon@colpos.mx, gvapon@colpos.mx, rojo@colpos.mx, respectivamente.

³ Colegio de Postgraduados, Producción de Semillas, Campus Montecillo, Km. 36.5 carretera Mexico-Texcoco, Montecillo, Edo. de Mexico CP 56230. hsilva@colpos.mx

INTRODUCCIÓN

El maíz (*Zea mays* L.) es uno de los cereales de mayor producción y consumo a nivel mundial (Torren 2008). En México, este cereal ocupa anualmente una superficie de aproximadamente ocho millones de hectáreas y se cultiva bajo diferentes regímenes de humedad, incluyendo riego y temporal (Oropeza *et al.* 2004).

Al ser una planta cultivada, el maíz no escapa del ataque de patógenos que reducen su producción (Eubanks 2001), como es el caso de *Fusarium verticillioides* población A (Sacc.) Nirenberg [Teleomorfo: *Gibberella fujikuroi* (Sawada) sin. *Fusarium moniliforme* (Sheldon) (Whalley 2003). A nivel mundial, esta especie causa pudrición de mazorca y tallo, así como tizón en las plántulas (De León 2004). Además de causar efectos negativos en la producción y calidad de la semilla, el hongo es de gran importancia por la producción de micotoxinas como las fumonisinas B1 y B2 (Vigier *et al.* 1997).

Las especies del género *Fusarium* sintetizan metabolitos que se clasifican con base en la actividad biológica, estos metabolitos son pigmentos, micotoxinas, antibióticos, di y tri-terpenoides, y compuestos con estructura de anillo cuya actividad biológica no ha sido estudiada (Chelkowski 1989, Nelson 1992).

Algunos aislamientos de *F. verticillioides* al secretar pigmentos, presentan variaciones en medio de cultivo PDA (papa-dextrosa-agar) (Klittich y Leslie 1992) que van del color violeta al morado intenso (Levic *et al.* 1994). Dichos pigmentos tienen propiedades antibacterianas (Visconti *et al.* 1983), fitotóxicas (Miller 1961), inhiben la germinación de las semillas (Kimura *et al.* 1981) y actúan como promotores de crecimiento al ser ingeridos por insectos (Jayaraman y Parihar *et al.* 1975). Se considera que los aislamientos de *F. verticillioides* que producen pigmentos en medio de cultivo PDA, son más virulentos que los que no producen (Kimura *et al.* 1981, Visconti *et al.* 1983). No obstante, su efecto como factor de virulencia aún no está bien definido (Golin'ski *et al.* 1991, Klittich y Leslie 1992, Medentsev *et al.* 2005).

El objetivo de este trabajo fue determinar la relación entre el color del pigmento producido por aislamientos de *F. verticillioides* y la virulencia en plántulas de maíz.

MATERIALES Y MÉTODOS

Colecta de muestras

Los granos de maíz con y sin síntomas de infección por *F. verticillioides* se obtuvieron de mazorcas producidas en el estado de Veracruz, México, durante el ciclo primavera-verano 2008.

Aislamiento del patógeno

Se desgranaron las mazorcas y las semillas se desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio al 1,5%, por tres minutos. Posteriormente, se enjuagaron dos veces con agua destilada estéril y se colocaron en cámara húmeda para promover el crecimiento micelial. Del crecimiento obtenido se hizo una suspensión de conidios para obtener cultivos monospóricos.

Caracterización morfológica

Se realizó la identificación morfológica de los aislamientos de acuerdo con Booth (1971), Nelson *et al.* (1983), Marasas *et al.* (1987), Nirenberg y O'Donnell (1998) y Leslie y Summerell (2006). Una vez obtenidos los aislamientos puros del patógeno, se indujo la formación de fiálides, microconidios, macroconidios y clamidosporas. Para inducir la formación de fiálides, se colocó una pequeña porción de crecimiento micelial y agar sobre un porta objetos dentro de una caja Petri en condiciones de humedad y esterilidad por un periodo de 72 horas. La caja Petri se mantuvo bajo luz blanca a 26°C. Las estructuras obtenidas se midieron y documentaron con una cámara montada al microscopio compuesto.

Para obtener macro y microconidios se inoculó en cajas Petri micelio con el medio de cultivo "Carnation Leaf Agar" (CLA), a una temperatura de 22-24°C por 24 días (Morales-Rodríguez *et al.* 2006). Para la formación de cadenas de microconidios, se colocó micelio en cajas Petri con PDA a una temperatura 22-24°C por un período de diez días. Para promover la formación de clamidosporas se mantuvieron los cultivos bajo las mismas condiciones por catorce días. La morfometría se obtuvo realizando 100 mediciones de las estructuras mencionadas.

Ubicación filogenética

a) Extracción de DNA genómico. De manera independientemente, se tomaron aproximadamente 5 mm de micelio de los aislamientos de color blanco y morado derivados de semillas con y sin síntomas de pudrición de mazorca, incubados a 20 - 25°C con luz blanca continua. El micelio, se colocó en un tubo Eppendorf de 200 μ l conteniendo 30 μ l de la solución de lisis. Posteriormente, se colocaron los tubos a 95°C durante cinco minutos y se centrifugaron por diez minutos a 5000 xg. La calidad del DNA se verificó con electroforesis a 76 V/45 minutos, en un gel de agarosa al 1%.

b) Amplificación por PCR del DNA ribosomal. Para la amplificación de la región ITS se utilizaron los iniciadores universales ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC) (White *et al.* 1990) que amplifica un fragmento de aproximadamente 580 pares de bases (pb). Para amplificar la región del ITS y ~600 bp del gen 28S rRNA, se utilizaron los iniciadores ITS5 y NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') (O'Donnell, 1992), para amplificar un fragmento de 1,100 bp.

La mezcla de reacción para PCR se preparó en un volumen final de 25 μ l conteniendo, 10 μ l de agua, 2 μ l de Cloruro de magnesio (0,2 mM), 2 μ l de GoTaq DNA (2x), 2 μ l de deoxinucleosido trifosfatos (0,2 mM cada uno), 2 μ l de cada iniciador (20 pmol) y 4 μ l de la enzima Taq (1 x) DNA polimerasa, 5 μ l de DNA.

Las amplificaciones se realizaron con un ciclo inicial de desnaturalización a 95°C por dos minutos; 35 ciclos de desnaturalización a 95°C por un minuto, el alineamiento a 57°C por un minuto, y una extensión final a 72°C por dos minutos; finalmente un ciclo de amplificación a 72°C por diez minutos.

Todas las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un Peltier Thermal Cycler PTC-200, las amplificaciones se verificaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1,2% preparado con 1x TAE búfer (Tris Acetate-EDTA) y corrido a 87 V/cm³ durante una hora. El gel se tiñó con bromuro de etidio (3 mg/l), y las bandas se visualizaron en un transiluminador Gel Doc 2000 UV. Los productos amplificados se limpiaron con el kit de purificación QIAquick PCR. Estos productos se secuenciaron en ambas direcciones con un sistema automatizado de secuenciación de DNA para asegurar que no hubiera lecturas de nucleótidos incorrectas.

En la amplificación de la región del IGS los componentes de la mezcla de reacción para PCR fueron; 6,2 μ l de agua, 0,3 μ l Taq ADN, 5 μ l de buffer, 2,5 μ l MgCl₂, 2 μ l CNS1 (iniciador 1), 2 μ l CNL11 (iniciador 2), 2 μ l de DNTPs y 5 μ l de DNA, para hacer un volumen final de 25 μ l. La amplificación se realizó con una desnaturalización inicial de 95°C por dos minutos, 35 ciclos de desnaturalización a 95°C durante dos minutos, el alineamiento 60°C por un minuto, extensión final 72°C por un minuto, un ciclo de amplificación a 72°C por 7 minutos, conservación de ADN a 4°.

c) Análisis filogenético de la región del ITS. Las secuencias de ambas regiones se ensamblaron y editaron usando BioEdit versión 7.0.5 (Hall 1999) para secuencia consenso. Esta se comparó con las secuencias depositadas en el GenBank del National Center for Biotechnology Information (NCBI), mediante la opción BLASTN 2.2.19 (Zhang *et al.* 2000). Para el análisis filogenético, la secuencia consenso se compiló en un archivo fasta y se alineó con el profile mode del Clustal W 1.8.1. (Thompson *et al.* 1994), incluido en el programa Mega 4.0.2 (Tamura *et al.* 2007) y analizada con el método de Máxima Parsimonia utilizando la opción Close Neighbour Interchange (CNI) search (nivel=1), con árbol inicial por adición al azar (10 reps) Los gap/missing se consideraron como completas deleciones. Para determinar los valores de confianza de los agrupamientos dentro del árbol resultante, se estimó un análisis de bootstrap con 1000 repeticiones (Felsestein 1985).

Clasificación por pigmentación

Los cien aislamientos del hongo obtenidos de semillas con y sin síntomas de infección por pudrición de mazorca, se clasificaron con base en su pigmentación en blancos y morados. Se obtuvieron cultivos monospóricos hasta que la pigmentación de los aislamientos fue constante.

La medición del color de cada aislamiento se hizo en un espectrofotómetro. El micelio purificado obtenido de los aislamientos que produjeron colonias blancas y moradas se colocaron independientemente en un matraz con medio de cultivo papa-dextrosa (PD) por un periodo de quince días en agitación constante, posteriormente se licuó y se colocó en tubos de ensayo para medir la absorbancia. El espectrofotómetro se calibró a 550 nm, absorbancia usada para detectar

metabolitos en especies de *Fusarium* (Chelkowski 1989) usando como blanco medio de cultivo PD.

Concentración de papa en PDA. Los aislamientos con crecimiento micelial de color blanco y morado, obtenidos de semillas sintomáticas y asintomáticas, se sembraron independientemente en medio de cultivo PDA preparado con 50, 100, 150 y 200 g de papa. Se observó la variación en la producción del pigmento.

Prueba de patogenicidad. El experimento se realizó en condiciones de invernadero en los ciclos otoño- invierno 2008, manteniendo una humedad relativa (HR) promedio de 65% a 22°C, en primavera-verano 2009 con una HR promedio de 75% a 24°C. Los aislamientos blanco y morado de semillas con y sin síntomas de pudrición de mazorca se incrementaron en sustrato de avena entera, humectada por doce horas y esterilizada durante dos horas a 120°C a 20 Lb de presión.

Las pruebas de patogenicidad de los diferentes aislamientos se llevaron a cabo mezclando diferentes proporciones del sustrato inoculado con suelo estéril (100% suelo: 0%inóculo, 80% suelo: 20% inóculo, 60% suelo: 40%inóculo, 40% suelo: 60%inóculo, 20% suelo: 80% inóculo, 0% suelo: 100%inóculo) usando una concentración de 2×10^6 conidios/g de sustrato inoculado.

En cada mezcla (tratamiento) se colocaron diez semillas de maíz blanco del sintético VS 356 (origen 2007B) provistas por el Campo Cotaxtla, del Instituto Nacional Investigaciones Agrícolas y Pecuarias, con cinco repeticiones por tratamiento.

Se realizaron tres evaluaciones de severidad del área foliar de las plántulas de maíz, con base en la siguiente escala diagramática: plántula sana (testigo) = 1; plántula de tamaño reducido = 2; plántula clorótica y de tamaño reducido = 3; plántula con hojas atizonadas y/o enrollamiento foliar = 4 y plántula muerta = 5. La primera evaluación se realizó a los quince días después de la inoculación (ddi), la segunda 20 ddi y la tercera a los 25 ddi; en esta última, además de la severidad del área foliar, se tomó el peso de raíz de cada plántula.

Los resultados obtenidos se analizaron con el programa SAS® System for Windows 9.0 (2002) siguiendo un diseño experimental en parcelas sub-divididas; siendo parcela mayor aislamiento de semillas sintomáticas o asintomáticas, parcela mediana color de micelio blanco o morado y parcela menor porcentaje de inóculo de cada tratamiento.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización morfológica

Los estados perieciales del genero de *Fusarium* admiten una organización en secciones, lo que permite caracterizarlos morfológicamente (Nelson 1990). Los aislamientos obtenidos de semillas sintomáticas y asintomáticas, presentaron características similares a *F. verticillioides* (Sacc.) Nirenberg (sin. *F. moniliforme*) (Figuras 1 a 4) miembro de la sección Liseola, en la que sus integrantes no forman clamidosporas, sino hinchamientos de hifas que ocasionalmente son confundidas con pseudoclamidosporas. Inicialmente, los aislamientos desarrollaron crecimiento micelial en medio de cultivo PDA de color blanco, posteriormente naranja y finalmente morado (Nelson *et al.* 1983, 1990, 1992, Leslie y Summerell 2006). Fue poco frecuente la formación de macroconidias (Nelson *et al.* 1983) y cuando se presentaron tuvieron la célula apical curvada y la basal en forma de pie (Nirenberg y O'donnell 1998) con tres a siete septos (Booth 1971). Hubo una frecuente formación de microconidias en cadenas (Morales-Rodríguez *et al.* 2006). La conidiogénesis fue entoroblástica fialídica (Glenn *et al.* 2004). La morfometría de las estructuras originadas de los aislamientos obtenidos de semillas sintomáticas y asintomáticas se asemejó a *F. verticillioides* y fue similar en los cuatro aislamientos (Cuadro 1).



Figura 1. Morfología de aislamiento obtenido de semilla de maíz con síntomas de infección. A: micelio morado; B: hifas hinchadas; C: microconidios en cadena larga; D: croconidios; E: monofialide. Barras = 10 μ m. Montecillo, Texcoco Edo. de México, 2009.

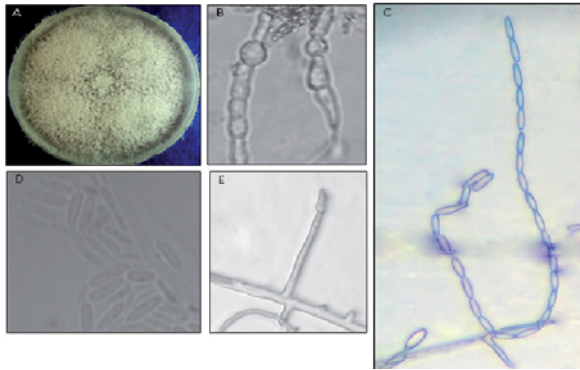


Figura 2. Morfología de aislamiento obtenido de semilla de maíz con síntomas de infección. A: micelio blanco; B: hifas hinchadas; C: microconidios en cadena larga; D: microconidios; E: monofíalide. Barras = 10 μ m. Montecillo, Texcoco Edo. de México, 2009.



Figura 3. Morfología del aislamiento obtenido de semilla de maíz sin síntomas de infección. A: micelio morado; B: hifa hinchada; C: microconidios en cadena larga; D: microconidios; E: monofíalide. Barras = 10 μ m. Montecillo, Texcoco Edo. de México, 2009.

Ubicación filogenética

El árbol filogenético construido con la amplificación de los ITS (Figura 5) indicó que los aislamientos obtenidos de semillas con síntomas de pudrición de mazorca corresponden a *F. verticillioides*, mientras que los aislamientos de semillas asintomáticas no se alinearon con una especie de *Fusarium* en específico. En una ubicación filogenética frecuentemente se utiliza



Figura 4. Morfología del aislamiento obtenido de semilla de maíz sin síntomas de infección. A: micelio blanco; B: hifa hinchada; C: microconidios; D: monofíalide; E: microconidios en cadena larga. Barras = 10 μ m. Montecillo, Texcoco Edo. de México, 2009.

la región del ITS y en ocasiones hay menos del 1% de similitud en estas secuencias. En el complejo de especies de *G. fujikuroi* la región del ITS no detecta diferencias en especies que están relacionadas filogenéticamente (Zeng *et al.* 2009).

En la amplificación de IGS, los aislamientos de semillas sin síntomas caen dentro del grupo de especies complejas de *G. fujikuroi*. La divergencia de la secuencia de la región del IGS es mayor que la de las secuencias de la región del ITS (Sugita *et al.* 2004), lo

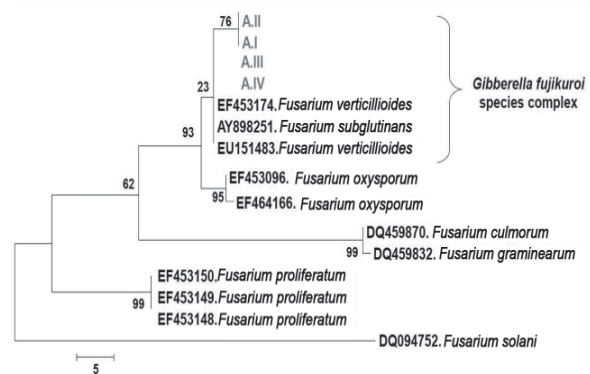


Figura 5. Árbol filogenético construido con secuencias correspondientes al Espacio Transcrito Interno (ITS) usando el método de Máxima Parsimonia con 1000 en aislamientos obtenidos de semilla de maíz con y sin síntomas de pudrición de mazorca. Montecillo, Texcoco Edo. de México, 2009.

Cuadro 1. Características morfológicas consideradas en la caracterización morfológica de *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg. Montecillo, Texcoco Edo, de México, 2009.

	Morales-Rodríguez <i>et al.</i> (2006)	Leslie y Sumner (2006)	Nirenberg y O'donnell (1998)	Nelson <i>et al.</i> (1983), Nelson (1990), Nelson (1992)	Booth (1971)	Asilamiento I	Aislamiento II	Aislamiento III	Aislamiento IV
Morfología									
Color	Salmon-púrpura	Gris-magenta, violeta		Blanco-púrpura	Crema beige-violeta	Blanco	Morado	Blanco	Morado
Microconidia (largo x ancho en μm)	11,8 x 2,4,5,0-12,0 x 1,5-2,5	Con célula apical curvada	2-3x5-12		5-12 x 1,5-2,5	9,97 x 2,49	8,56 x 1,95	9,87 x 1,93	7,43 x 1,81
Microconidia en cadena	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Falsas cabezas	+	+	+	+	+				
Macroconidio (largo x ancho en μm)	31,0 x 3,7	Sin septo con base lisa	2,5-5 x 15-60		30-50 x 2,5-4 (5-6 septos)	39,64 x 3,58	34,2 x 3,07	32,06 x 3,29	31 x 3,09
Conidióforo	Simple o ramificado	Simple y/o ramificado	Simple y/o ramificado	Simple y/o ramificado	Simple y/o ramificado	Simple y/o ramificado	Simple y/o ramificado	Simple y/o ramificado	Simple y/o ramificado
Fiálides (largo x ancho en μm)	Monofialide 22,0x3,5	Monofialide	Monofialide	Monofialide	Monofialide 20-24 x 3,5-4	Monofialide de 27,9 x 2,13	Monofialide 22 x 2,99	Monofialide 25x 2,22	Monofialide 22 x 2,88
Clamidosporas ^a	-	-a	-	- a	-	-a	-a	-a	-a

que permitió confirmar la ubicación de los aislamientos. Debe considerarse que las secuencias de nucleótidos y las estructuras de la región IGS responsable de la heterogeneidad no se han terminado de comprender (Shihomi *et al.* 2009), por lo que es necesario usar otras herramientas moleculares para determinar la especie a la que corresponde los aislamientos provenientes de las semillas asintomáticas.

Medición de color con espectrofotómetro

La absorbancia a 550 nm indicó que la cantidad de luz absorbida a esta longitud de onda por los aislamientos procedentes de semillas sintomáticas

con micelio morado fue de 2,012, mientras que la del micelio blanco fue de 0,176. De manera similar, los aislamientos con micelio blanco y morado obtenidos de semillas asintomáticas obtuvieron valores de absorbancia de 0,226 y 0,714, respectivamente. Comparativamente los valores de absorbancia, en los aislamientos con micelio color morado tuvieron valores numéricos más altos que los aislamientos con micelio blanco. Los pigmentos 8-0-methylfusarubin producido por *F. subglutinans* (Visconti *et al.* 1983) y el 8-0-methyljavanicin producido por *F. verticillioides* da lecturas de absorbancia a 550 nm (Kimura *et al.* 1981) con un comportamiento similar a los pigmentos obtenidos de los aislamientos.

Efecto de la concentración de papa en medio de cultivo PDA sobre la pigmentación del micelio de *F. verticillioides*

El comportamiento en medio de cultivo de los aislamientos de semillas con síntomas y semillas sin síntomas fue similar. A los cinco días después de la siembra (dds), el crecimiento micelial de color morado en medio de cultivo con 50 gramos de papa fue difuso y delgado, con pigmentación no definida. El micelio de las colonias blancas, mostró un aspecto fino, desarrollo homogéneo y sin pigmentación. En medio de cultivo PDA con 100 gramos de papa, el crecimiento micelial fue lento y con aspecto algodonoso. En medio de cultivo PDA con 150 y 200 gramos, el crecimiento micelial producido por los aislamientos de color blanco y morado mostraron una coloración naranja que posteriormente se tornó morada.

A los 30 dds, el crecimiento micelial color blanco en medio con 50 gramos de papa fue homogéneo y sin pigmentación. Las colonias con micelio color morado desarrollaron una pigmentación más definida e intensa. La pigmentación se produce bajo condiciones adversas o de deficiencia de algún elemento (Mendentsev *et al.* 2005). En medio de cultivo PDA con 100, 150 y 200 gramos de papa el crecimiento micelial incrementó la consistencia algodonosa, los micelios blancos y morados no tuvieron una coloración bien definida, ya que en diferentes puntos dentro de la caja de Petri mostraron pigmentación morada con micelio algodonoso. La pigmentación puede ser variegada en el medio de cultivo, lo que sugiere que la producción del pigmento es influenciada por la concentración de papa (Klittich y Leslie 1992).

En algunos casos, cuando se estudia la heredabilidad de un pigmento y la progenie no lo reproduce homogéneamente, puede deberse a que la pigmentación está asociada a un carácter multigénico (Klittich y Leslie 1992, Nirenberg y O'Donnell 1998).

Prueba de patogenicidad

El valor de $Pr > F$ de la fuente de variación bloque, no mostró diferencias significativas, debido a que las repeticiones del experimento tuvieron el mismo comportamiento. Por ejemplo, las macetas con inóculo del aislamiento color morado obtenido de semillas sintomáticas color morado, tuvieron el mismo comportamiento en los cinco bloques, siendo consistente en la

evaluación de severidad en área foliar y en el peso de la raíz (Cuadro 2).

La significancia de la fuente de variación tratamiento fue $<0,0001$ tanto en la evaluación de severidad del área foliar como en el peso de raíz (Cuadro 2). Las plántulas sin inóculo (Tratamiento 1) (Figura 6A) tuvieron el mayor peso de raíz (DMS de 0,146) y no mostraron área foliar dañada (DMS de 5,9), por lo que se coloca en un grupo diferente del resto de los tratamientos. Al incluir el tratamiento 1 en el análisis de varianza, se incorpora una variabilidad que no está asociada con ningún aislamiento o color, por lo que no se consideró en el análisis de varianza ni en la comparación de medias de Tukey.

Cuadro 2. Medias del porcentaje de infección de *F. verticillioides* en el área foliar y en peso de la raíz (g) de plántulas de maíz bajo condiciones de invernadero. Montecillo, Texcoco Edo, de México, 2009.

Concentración de inóculo	Media de severidad*		Media de peso de raíz**	
Trat6 100%	58,319	a	0,28850	a
Trat5 80%	27,201	b	0,50900	b
Trat4 60%	23,172	bc	0,65700	c
Trat3 40%	21,637	bc	0,78700	d
Trat2 20%	18,663	c	1,00600	e

*DMS = 5,9281.

** DMS = 0,146. Medias con la misma letra no difieren significativamente en $P \geq 0,05$.

Los resultados de la proporción suelo: concentración de inóculo confirmaron la existencia de una relación directamente proporcional entre la severidad y la concentración del inóculo (Cuadro 3). El tratamiento 6 con mayor cantidad de inóculo, tuvo el valor de severidad media más alto (grupo a). En contraste, en el tratamiento 2, que correspondió a la concentración más baja de inóculo, el porcentaje de severidad fue menor y se ubicó en el grupo (c) con dos diferencias mínimas significativas con respecto al tratamiento 6.

Estadísticamente, la severidad en las plántulas es similar en los tratamientos con un 40%, 60% y 80% de inóculo, es decir en los tratamientos 3, 4 y 5, respectivamente. Sin embargo, los datos experimentales

Cuadro 3. Medias del porcentaje de infección de *F. verticillioides* en el área foliar y en peso de la raíz (g) de plántulas de maíz bajo condiciones de invernadero, Montecillo, Texcoco, México, 2009.

Concentración de inóculo	Media de severidad*	Media de peso de raíz**
Trat6 100%	58,319 a	0,28850 a
Trat5 80%	27,201 b	0,50900 b
Trat4 60%	23,172 bc	0,65700 c
Trat3 40%	21,637 bc	0,78700 d
Trat2 20%	18,663 c	1,00600 e

*DMS = 5,9281; ** DMS = 0,146. Medias con la misma letra no difieren significativamente en $Pr \geq 0,05$.

muestran un claro patrón en el que la media de infección incrementa conforme hay mayor concentración de inóculo en el sustrato.

El peso de la raíz y la concentración del inóculo presentaron una relación inversamente proporcional (Cuadro 3.). El tratamiento 2 correspondiente al sustrato con menor cantidad de inóculo (20%), registró la media del peso de raíz con el valor más alto y estadísticamente diferente al resto de tratamientos (e). En contraste, el tratamiento 6 (mayor concentración de inóculo, 100%), registró la media del peso de raíz con menor valor, ubicado en el grupo (a).

Por otro lado, la agrupación de medias indicó que la severidad media observada en el área foliar y en el peso de la raíz, no incrementaron significativamente, independientemente del origen del aislamiento (semillas con o sin síntomas de *F. verticillioides*). No obstante, aunque la evidencia estadística indique que los aislamientos no son significativos a un nivel de significancia estándar ($\alpha=0,05$), en la determinación del grado de severidad el valor $Pr > F$ se muestra una probabilidad de error de 0,1189 (Cuadro 2). Debe considerarse que en un rango de probabilidad de 0 a 1 se puede afirmar que el aislamiento de semillas con síntomas de *F. verticillioides* es más virulento, por lo que la probabilidad de que la afirmación sea correcta es de 0,8811 el cual es un valor cercano a 1. De acuerdo con lo observado durante las evaluaciones, la experiencia visual sugiere que dicho aislamiento es más virulento por el daño que provoca en el área foliar y la disminución del peso de raíz (Figura 6b y Figura 7a), que



Figura 6. Plántulas de maíz con y sin sustrato inoculado. A: tratamiento 1, sustrato con 0% de inóculo; B tratamiento con 100% de inóculo obtenido de semillas sintomáticas con micelio blanco. Montecillo, Texcoco Edo. de México, 2009.

los aislamientos obtenidos de semillas sin síntomas de infección (Figura 7b y c).

El diseño experimental en parcelas con doble división dejó ver que la interacción aislamiento-color fue significativa, por lo que fue estudiada mediante un análisis de varianza, considerando como fuentes de variación; tratamiento y la interacción antes mencionada (Cuadro 4).

En la severidad del área foliar no hay significancia en la fuente variación aislamiento-color, por lo que las posibles interacciones entre el color de micelio y el aislamiento obtenido de semillas sintomáticas o asintomáticas, resultarían en un solo grupo. Debido a lo subjetivo que puede ser una evaluación visual de daño foliar se debe considerar la variable peso de raíz en este caso la fuente de variación de la interacción aislamiento-color es significativa (Cuadro 4). Como resultado de la agrupación de medias de esta variable, se tiene que el aislamiento color morado obtenido de

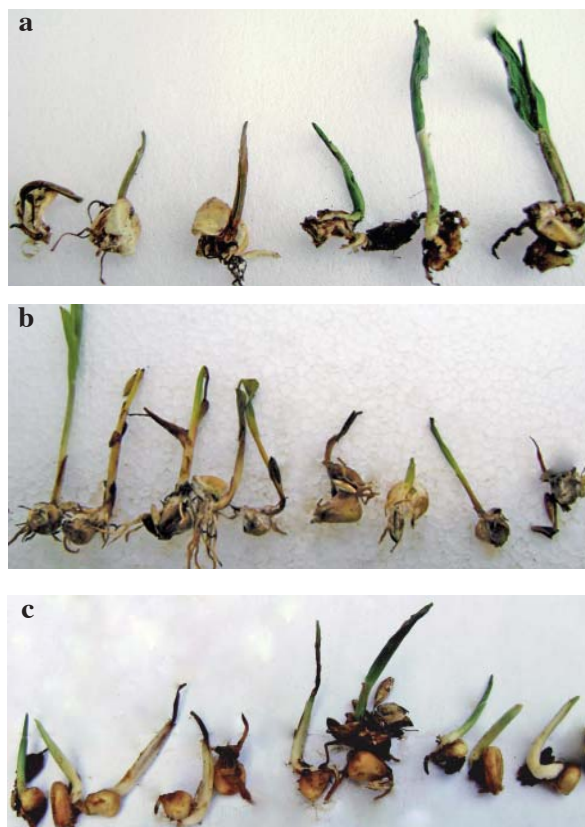


Figura 7. Plántulas de maíz con sustrato inoculado bajo invernadero. A: tratamiento con 100% de inóculo obtenido de semillas sintomáticas con micelio morado; B: tratamiento con 100% de inóculo obtenido de semillas asintomáticas con micelio blanco; C: tratamiento con 100% de inóculo obtenido de semillas asintomáticas con micelio morado. Montecillo, Texcoco Edo. de México, 2009.

granos sintomáticos, es el más virulento, ya que tiene la media con el menor peso de raíz en comparación con el aislamiento blanco obtenido de semillas sintomáticas. Por otro lado, el aislamiento blanco obtenido de semillas asintomáticas es más virulento que el aislamiento morado obtenido de semillas asintomáticas (Cuadro 5).

Se asocia una mayor virulencia con un menor peso de raíz porque este comportamiento lo tuvieron las raíces de plántulas que interactuaron con los diferentes aislamientos del hongo, ya que en promedio las raíces de las plántulas que se desarrollaron sin estar en contacto con *F. verticillioides* tuvieron el doble del peso de raíz (Figura 8).

Cuadro 4. Significancia de las fuentes de variación para medir los efectos de los aislamientos de semillas de maíz con y sin síntomas en interacción con color micelial, sobre la virulencia en área foliar y peso de raíz de plántulas de maíz bajo condiciones de invernadero. Montecillo, Texcoco Edo. de México, 2009.

Fuente de variación	Severidad de área foliar*		Peso de raíz**	
	F-valor	Pr > F	F-valor	Pr > F
Aislamiento-color	1,42	0,2419	5,84	0,0011
Tratamiento	93,66	<,0001	40,86	<,0001

*CV= 22,41; R² = 0,89; Media de Severidad = 29,79.

**CV= 29,30; R² = 0,66; Media de peso = 0,649500.

Fue notable que en concentraciones altas el micelio pigmentado (Kimura *et al.* 1981) y no pigmentado (micelio blanco) como en los no pigmentados (micelio blanco) aislado de los dos tipos de semilla inhibiera la germinación. Algunos aislamientos de *F. verticillioides* producen infecciones asintomáticas en semilla. Sin embargo, una vez que se promueve el crecimiento micelial, el hongo logra infectar a la semilla afectando la emergencia de la plántula (Yates y Jaworski 2000). El hongo es capaz de colonizar tejidos de la planta de maíz durante todo su ciclo vegetativo, incluyendo raíz, tallo, mazorca y semillas (White 2004).

Aunque durante la selección de las semillas la presencia del hongo no fue perceptible, no implicó que estas no estuvieran infectadas (Singh y Singh 1977,

Cuadro 5. Comparación de medias de la disminución del peso de raíz, causado por aislamientos micelios de color blanco y morado obtenidos de semillas de maíz con y sin síntomas de *F. verticillioides*. Montecillo, Texcoco Edo. de México, 2009.

Aislamiento-color micelial	Peso de raíz*
Asintomático - Morado	0,73880 a
Sintomático - Blanco	0,71760 ab
Asintomático - Blanco	0,58520 bc
Sintomático - Morado	0,55640 c

*DMS= 0,1409; Medias con las misma letra no difieren significativamente en Pr ≥ 0,05.

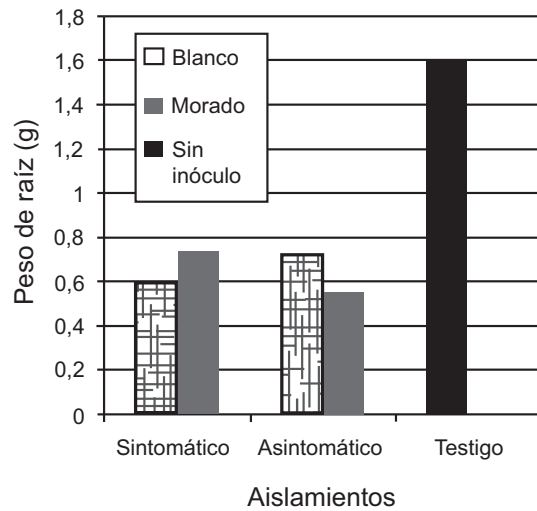


Figura 8. Disminución del peso de raíz causado por aislamientos de semillas sintomáticas y asintomáticas de maíz con micelio color morado o blanco de *F. verticillioides*. Montecillo, Texcoco Edo. de México, 2009.

Thomas y Buddenhagen 1980). La infección asintomática puede presentarse en cualquier parte de la planta y ser transmitida por la semilla a las plántulas, pudiendo o no desarrollar una infección sistémica (Munkvold y Desjardins 1997). Está reportado que los granos de maíz son muy vulnerables a las infecciones asintomáticas de semillas (Mendoza *et al.* 2006), ya que las hifas colonizan los espacios intercelulares a diferencia de las infecciones sintomáticas, en las cuales el hongo se desarrolla inter e intracelularmente (Oren *et al.* 2003).

Los aislamientos de *F. verticillioides* pueden o no producir pigmentación (Nelson 1992). En el presente trabajo se destacó que el micelio morado del aislamiento de semillas con síntomas fue más virulento que el micelio blanco del mismo aislamiento. En contraste, el micelio blanco del aislamiento de semillas asintomáticas fue más virulento que el micelio morado de este aislamiento.

Los aislamientos provenientes de semillas sintomáticas y asintomáticas causaron daño foliar y disminuyeron el peso de la raíz. El aislamiento color morado obtenido de semillas con síntomas de *F. verticillioides* fue más virulento que el aislamiento de color blanco. En contraste, el aislamiento de color blanco obtenido de semillas asintomáticas fue más virulento que el aislamiento color morado.

LITERATURA CITADA

- Booth, C. 1971 The genus *Fusarium*. Ed. Commonwealth Micological Institute. England. 213 p.
- Chelkowski, J. 1989. *Fusarium* mycotoxins, taxonomy and pathogenicity; topics in secondary metabolism. Vol.2. Elsevier Sci. Publi. B.V. New York. U.S. 492 p.
- Eubanks, MW. 2001. The mysterious origin of maize. *Economic Botany* 55(4):492-514.
- De León, C. 2004. Enfermedades del maíz. Una guía para su identificación en campo. 4a ed. Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo, El Batán, Mex. 123 p.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791.
- Golin'ski, P; Chelkowski, J; Zajkowski, P; Kostecki, M. 1991. Do the pigments differ chemotaxonomically in fungi belonging to the genus *Fusarium*?. *Mycotoxin Research* 7(A(Suppl.) Part. II):165-171.
- Hall, TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41:95-98.
- Jayaraman, S; Parihar, DB. 1975. Isolation of a growth promoting pigment from foodgrains infested with *Fusarium moniliforme*. *Indian Journal of Experimental Biology* 13(3):313-314.
- Kimura, Y; Takashi, H; Nakajima, H. 1981. Isolation, Identification and Biological Activities of 8-O-Methyl-javanicin Produced by *Fusarium solani*. *Agric. Biol Chem.* 45 (11):2653-2654
- Klittich, JR; Leslie, JF. 1992. Identification of a second mating population within the *Fusarium moniliforme* anamorph of *Gibberella fujikuroi*. *Mycologia* 84: 541-547.
- Leslie, JF; Summerell, SB. 2006. The fusarium laboratory manual. Irs. Ed. Blackwell Publi. Iowa, USA. 388 p.
- Levic, J; Halda, L; Penčić, V. 1994. Reduced pigmentation and growth of *Fusarium* cultures caused by *Enterobacter cloacae* strains. *Phytopathologia Mediterranea*. 33(1):71-77.
- Marasas, W; Rabie, CJ; Thiel, PG; Nelson, PE; Toussoun, TA. 1987. Moniliformin production in fusarium section liseola. *Mycologia* 78(2):242-247.
- Mendoza, EM; Andrio, EE; López, BA; Rodríguez, GR; Moreno, LL; Rodríguez, HS. 2006. Tasa de Infección de la pudrición del tallo en maíz causada por *Fusarium moniliforme*. *Agronomía mesoamericana* 17: 19-24.
- Medentsev, AG; Arinbasarova, A Yu; Akimenko, VK. 2005. Biosynthesis of Naphthoquinone Pigments by Fungi of the Genus *Fusarium*. *Applied Biochemistry and Microbiology* 41:503-507.

- Miller, MW. 1961. The Pfizer handbook of microbial metabolites. McG. Company, INC.USA.792 p.
- Morales-Rodríguez, I; Yáñez-Morales, M; Silva Rojas, HV; García de los Santos, G; Guzman de Peña, D. 2006. Biodiversity of *Fusarium* species in Mexico associated with ear rot in maize, and their identification using a phylogenetic approach. *Mycopathologia* 163:31-39.
- Munkvold, GP; Desjardins, AS. 1997. Fumonisin in maize. Can we reduce their occurrence? *Plant Disease* 81(6): 556-563.
- Nelson, PE; Toussoun, TA; Marasas, WF. 1983. *Fusarium* species; an illustrate manual for identification. The Penn. Stat. Univ. Press. USA. 193 p.
- Nelson, PE; Burgess, LW; Summerell, BA. 1990. Some morphological and physiological characters of fusarium species in sections liseola and elegans and similar species. *Mycologia* 82(1):99-106.
- Nelson, PE. 1992. Taxonomy and biology of *Fusarium moniliforme*. *Mycopathologia* 117:29-36.
- Nirenberg, H. I.; O'Donnell, K.1998. New *Fusarium* species and combinations within the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia* 90(3):434-458.
- O'Donnell, K. 1992. Ribosomal DNA internal transcribed spacer are highly divergent in the phytopatogenic ascomycete *Fusarium sambucinum* (*Gibberella pulicaris*). *Current Genetics* 22:213-220.
- Oren, L; Smadar, E; Cohen, D; Sharom, A. 2003. Early events in the *Fusarium verticillioides*-maize interaction characterized by using a green fluorescent protein-expressing transgenic isolate. *Applied Environmental Microbiology* 69(3):1695-1701.
- Oropeza, RM; Molina, GJ; Cervantes, TS. 2004. Logros del programa de mejoramiento genético de maíz del Campus Veracruz – C.P. al 2004. *Agrociencia* 36(4):421-431.
- SAS Institute. Inc. 2002- 2003. Version 9.1.3. SAS Institute Inc., Cary. NC. USA.
- Singh, D; Singh, T. 1977. Location of *Fusarium moniliforme* in kernels of maize and disease transmission. *Indian Journal of Mycology and Plant Pathology* 7:32-38.
- Shihomi, U; Michio, I; Makoto, K. 2009. Structure and organization of the rDNA intergenic spacer region in *Pythium ultimum*. *Mycoscience* 50(19):224-232.
- Sugita, T; Ikeda, R; Nishikawa, A. 2004. Analysis of *Trichosporon* isolates obtained from the houses of patients with summer-type hypersensitivity pneumonitis. *Journal.Clin. Microbiol.* 42(12):5467-5471.
- Tamura, K; Dudley, J; Nei, M; Kumar, S. 2007. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software ver. 4.0. *Molecular Biology Evolution* 24: 1596-1599.
- Thompson, JD; Higgins, DG; Gibson, TJ. 1994. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22:4673-4680.
- Thomas, MD; Buddenhagen, IW. 1980. Incidence and persistence of *Fusarium moniliforme* in symptomless maize kernels and seedlings in Nigeria. *Mycologia* 72(5):882-887.
- Torren, FA. 2008. Rodríguez-Montessoro, R; De León, C. *In* El cultivo del maíz; temas selectos. 1ra Ed. Mundi-Prensa. 126 p.
- Vigier, B; Reid, ML; Seifert, AK; Stewart, WD; Hamilton, RI. 1997. Distribution and prediction of *Fusarium* species associated with maize ear rot in Ontario. *Canadian Journal Plant Pathology* 19(1):60-65.
- Visconti, A; Surico, G; Iacobellis, NS; Bottalico, A. 1983. Production of pigments by isolates of *Fusarium moniliforme* Sheld. from cereals in Italy and their antibacterial activity. *Phytopathologia Mediterranea* 22(3):152-156.
- Whalley, JA. 2003. The name *Fusarium moniliforme* should no longer be used. *Mycol. Res.* 107(6):641-644.
- White, TJ; Bruns, TJ; Lee, S; Taylor, J. eds. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *In* M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. p. 315-322.
- White, DG. 2004. Plagas y enfermedades del maíz. The American Phytopathological Sociate. 2da Ed. Mundi-Prensa, México 77 p.
- Yates, IE; Jaworski, A. J.2000. Differential growth of *Fusarium moniliforme* relative to tissues from 'Silver Queen', a sweet maize. *Canadian Journal Botanic* 78(4):472-480.
- Zhang, Z; Schwart, S; Wagner, L; Miller, W. 2000. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *Journal of Computational Biology* 7:203-214.
- Zeng, J; Souza, MC; Fukushima, K; Takizawa, K; Correja, MO; Pereira, NR; Nishimura, K. 2009. Identification of *Trichosporon* spp. strains by sequencing D1/D2 region and sub-typing by sequencing ribosomal intergenic spacer region of ribosomal DNA. *J Huazhong Univ Sci Technol* 29:655-658.