



IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE *Fusarium* AISLADAS DE SEMILLAS SINTOMÁTICAS Y ASINTOMÁTICAS DE MAÍZ CON BASE EN EL GEN *TEF-1α*

IDENTIFICATION OF *Fusarium* SPECIES ISOLATED FROM SYMPTOMATIC AND ASYMPTOMATIC MAIZE SEEDS BASED ON THE *TEF-1α* GENE

Teresa B. Uribe-Cortés¹, Hilda V. Silva-Rojas^{1*}, Leopoldo E. Mendoza-Onofre¹, Carmen Velázquez-Cruz² y Ángel Rebollar-Alviter³

¹Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, PREGEP-Producción de Semillas, Montecillo, Texcoco, Estado de México, México. ²Dupont Pioneer, Centro de Investigación Tlajomulco, Tlajomulco de Zúñiga, Jalisco, México. ³Universidad Autónoma Chapingo, Centro Regional Universitario Centro Occidente, Morelia, Michoacán, México.

*Autor de correspondencia (hsilva@colpos.mx)

RESUMEN

Un problema fitosanitario en el cultivo de maíz (*Zea mays* L.) es la pudrición de mazorca a causa de hongos del complejo *Fusarium fujikuroi*. El síntoma típico de la enfermedad es la presencia de semillas con pudrición distribuidas aleatoriamente en la mazorca. Con frecuencia, el fitomejorador selecciona plantas con mazorcas sanas, que en ocasiones contienen pocas semillas con síntomas y suponen que las semillas asintomáticas están libres del patógeno. El objetivo del presente estudio fue identificar especies de *Fusarium* tanto en semillas sintomáticas como asintomáticas procedentes de la misma mazorca con base en la filogenia de una región del factor de elongación de la traducción 1α (*TEF-1α*). Se utilizaron mazorcas de lotes de producción de semilla ubicados en 14 localidades de cinco entidades federativas de México; 28 mazorcas de Chiapas, 16 de Chihuahua, 10 de Guanajuato, 14 del Estado de México y 16 de Jalisco. Las semillas de cada tipo se desinfectaron y se colocaron en medio de cultivo. Después de 5 d se observó crecimiento del micelio y de conidios, de los cuales se seleccionaron tres por cada aislamiento, se transfirieron a medio PDA y se registró su coloración (blanco, salmón, morado, violeta o rojo). Se obtuvieron 439 cepas. El color predominante de los micelios fue el blanco. El 54 % del total de cepas provino de semillas sintomáticas y el resto de asintomáticas. En cada estado, el número de cepas procedente de cada tipo de semillas fue similar. En ambos casos se identificó a *Fusarium subglutinans*, *F. temperatum* y *F. verticillioides*; además, por primera vez en México se detectó la presencia de los Haplotipos 10 y 11 de esta última especie. El fitomejorador corre el riesgo de seleccionar germoplasma susceptible a la pudrición cuando elige plantas que producen mazorcas en las que coexisten ambos tipos de semilla.

Palabras clave: *Fusarium verticillioides*, filogenia, haplotipos, pudrición de mazorca, semillas.

SUMMARY

A phytosanitary problem in maize (*Zea mays* L.) is ear rotting due to fungi belonging to the *Fusarium fujikuroi* complex. The typical symptom of the disease is the presence of rotten seeds randomly distributed on the ear. Frequently, the plant breeder selects plants that produce healthy ears, which sometimes contain a few seeds with symptoms, assuming that the asymptomatic seeds are free of the pathogen. The objective of the present study was to identify *Fusarium* species in both symptomatic and asymptomatic seeds from the same ear, based on the phylogeny of a region of the 1α translation elongation factor (*TEF-1α*). Ears from seed production plots

from 14 locations of five states of Mexico were used: 28 ears from Chiapas, 16 from Chihuahua, 10 from Guanajuato, 14 from the State of Mexico and 16 from Jalisco. Seeds of each type were disinfested and placed in culture medium. After 5 d mycelium and conidia growth was observed, of which three were selected from each isolate, transferred to PDA medium and their coloration (white, salmon, purple, violet or red) was registered. Four hundred and thirty-nine strains were obtained. The predominant color of the mycelia was white. Fifty-four percent of the total strains came from symptomatic seeds and the rest from asymptomatic ones. In each state, the number of strains from each type of seed was similar. In both cases, *Fusarium subglutinans*, *F. temperatum* and *F. verticillioides* were identified. In addition, for the first time in Mexico, the presence of Haplotypes 10 and 11 of the latter species was detected. The breeder is at the risk of selecting germplasm susceptible to rot when choosing plants that produce ears in which both types of seed coexist.

Index words: Ear rot, *Fusarium verticillioides*, haplotypes, phylogeny, seeds.

INTRODUCCIÓN

El maíz (*Zea mays* L.) es el tercer cereal más importante para la alimentación en el mundo, después del arroz (*Oryza sativa* L.) y el trigo (*Triticum aestivum* L.). Su producción se destina principalmente a la alimentación humana y animal, y en las últimas dos décadas se ha convertido en un insumo útil para la producción de biocombustible (Young y Long, 2000).

México ocupa el sexto lugar en producción mundial y el tercero en América Latina y el Caribe (FAOSTAT, 2017). En el año 2016, el 38 % de la superficie agrícola total en México se sembró con maíz; la mayor proporción de esta superficie se encuentra en zonas de secano. Los principales estados productores son Sinaloa, Jalisco, Estado de México, Michoacán y Guanajuato (SIAP, 2016).

La pudrición de mazorca reduce el rendimiento del cultivo (Briones-Reyes *et al.*, 2015; Leyva-Madriral *et al.*, 2015). Los agentes causales de esta pudrición

corresponden al denominado complejo *Fusarium fujikuroi* que incluye al menos 50 especies filogenéticas que se caracterizan por producir diversos tipos de toxinas como fumonisinas, tricotecenos, moniliformina y beauvericina (O'Donnell *et al.*, 2018). En los maíces susceptibles, las especies que se encuentran con mayor frecuencia son: *F. verticillioides* (Saccardo) Nirenberg, *F. subglutinans* (Wollenweber y Raeking) P. E. Nelson, Toussoun y Marasas y *F. proliferatum* (Matsushima) Nirenberg (O'Donnell *et al.*, 2000). Estas especies causan pudrición de semilla, marchitamiento, reducción de la germinación, pudrición de raíces y tallos, así como tizón en plántulas (Leslie y Summerell, 2013).

En México, la pudrición de mazorca se ha reportado en los Valles Altos Centrales (Morales-Rodríguez *et al.*, 2007), donde se han detectado altos niveles de resistencia en híbridos experimentales de maíz, como el HGVC-2 (Rivas-Valencia *et al.*, 2011). La enfermedad también está presente en los estados de Tamaulipas, Jalisco, Veracruz, Chiapas, Sonora (Leyva-Madrugal *et al.*, 2015) y Oaxaca (Briones-Reyes *et al.*, 2015).

Algunas cepas de *F. verticillioides* producen infecciones asintomáticas en la semilla, donde se ha demostrado que inicialmente el hongo invade el tejido en desarrollo (Wigmann *et al.*, 2019) y posteriormente causa una infección sistémica en la planta (Mancini *et al.*, 2016); por esto, la certificación de la calidad fitosanitaria de las semillas es un requisito esencial en la industria semillera.

El diagnóstico temprano de patógenos fúngicos que se transmiten vía semillas sintomáticas es trascendental, pues este insumo es la unidad básica de producción y un componente primario del comercio semillero. Semillas asintomáticas también pueden ser portadoras de patógenos, los que en condiciones ambientales favorables logran establecerse en áreas donde han estado ausentes (Tsedaley, 2015). En consecuencia, las medidas de protección para evitar la diseminación de la enfermedad, o para reducir su presencia, se basan inicialmente en la detección e identificación precisa de los patógenos (Walcott, 2003); por el contrario, una identificación imprecisa puede conducir a medidas innecesarias de control, como la aplicación de restricciones cuarentenarias inoportunas, o paradójicamente, a omitir alguna acción para controlar patógenos potencialmente devastadores (Crous *et al.*, 2015).

En la identificación molecular de *Fusarium* spp., el factor de elongación de la traducción 1 α (*TEF-1a*) es uno de los genes unicopia más útiles para discriminar especies del mismo género mediante estudios filogenéticos (Karlsson *et al.*, 2016). Este gen es rico en exones (Geiser, 2004) y

se caracteriza por i) ser altamente informativo a nivel de especie, ii) no haberse detectado individuos no ortólogos del gen en el género y iii) existen bases de datos extensas con las que se pueden comparar las secuencias; además, estos genes muestran una tendencia a evolucionar a un ritmo mayor que el de la región correspondiente al espacio transcrito interno (ITS) del rDNA que es un operón multicopia (O'Donnell *et al.*, 2000). Actualmente la descripción de al menos 50 especies que conforman el complejo *F. fujikuroi* y las bases de datos para la reconstrucción filogenética de nuevos aislamientos se basan principalmente en la información del gen *TEF* (Geiser *et al.*, 2004; O'Donnell *et al.*, 2015), que es una proteína compleja involucrada en el movimiento de los tRNAs con el aminoácido dentro del ribosoma para la síntesis de la cadena polipeptídica (Raja *et al.*, 2017).

En el proceso de selección de germoplasma de maíz tolerante a la pudrición de mazorca se generan líneas segregantes cuyas mazorcas contienen semillas sintomáticas y asintomáticas; particularmente al inicio de la derivación de líneas o de familias, el fitomejorador selecciona aquellas cuyas mazorcas contienen la mayor proporción de semillas asintomáticas, aunque las semillas vecinas muestren síntomas de la enfermedad; en consecuencia, es necesario dilucidar las especies de *Fusarium* y la frecuencia con que éstas se presentan en ambos tipos de semilla.

El objetivo del presente estudio fue verificar la presencia de especies de *Fusarium* del complejo *F. fujikuroi* aisladas de semillas sintomáticas y asintomáticas procedentes de mazorcas enfermas e identificar las especies con base en la amplificación de la secuencia parcial del gen *TEF-1a*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material genético

Se utilizaron 84 mazorcas que procedían de programas de mejoramiento genético para resistencia a pudrición de mazorca cosechadas en el ciclo otoño-invierno 2015, las que se conservaron en un cuarto frío a -10 °C hasta su análisis. Cada mazorca contenía semillas sintomáticas y asintomáticas procedentes de lotes de producción de semilla ubicados en 14 localidades pertenecientes a cinco entidades federativas de México. Se analizaron 28 mazorcas de Chiapas, 16 de Chihuahua, 14 del Estado de México, 10 de Guanajuato y 16 de Jalisco.

Aislamientos y obtención de cultivos monoconidiales

De cada mazorca se seleccionaron 10 semillas sintomáticas y 10 asintomáticas, las cuales se

desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio (NaClO) 1.5 % y se enjuagaron dos veces con agua destilada estéril; después, se cubrieron con papel filtro estéril y se colocaron a temperatura ambiente para eliminar el exceso de humedad. Posteriormente, cada grupo de 10 semillas se colocó en una caja de Petri que contenía medio de cultivo semiselectivo Spezieller-Nährstoff-Agar (SNA) (1 g KH_2PO_4 , 1 g KNO_3 , 0.5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5 g KCl, 0.2 g dextrosa, 0.2 g sacarosa y 20 g agar) (Leslie y Summerell, 2006). Las cajas Petri se colocaron en una cámara de crecimiento a 23 °C por 5 d; posteriormente, una sección del micelio de cada caja se colocó en un tubo Eppendorf de 1.5 mL con agua destilada y Tween 20 0.5 %. Los tubos se mezclaron por inversión y 100 μL de la suspensión se transfirió a un nuevo tubo con 900 μL de agua con Tween 20 0.1 % para obtener diluciones seriadas. De las diluciones 10^{-1} y 10^{-2} se transfirieron 120 μL , por separado, en cajas Petri con medio agar-agua (AA) (18 g de agar, 1000 mL de agua destilada) para germinar los conidios. Transcurridas 12 h, se realizó la micro-manipulación bajo un estereoscopio para seleccionar tres conidios germinados, los que se colocaron por separado en cajas con medio papa-dextrosa-agar (PDA) (20 g de PDA, 2 g de agar). A los 8 d se registró el color del micelio (blanco, morado, salmón, violeta o rojo) que se desarrolló sobre las semillas. Al final del proceso se obtuvieron 439 cultivos monoconidiales (cepas); cada cepa se conservó en papel filtro Wathman #1 (GE Healthcare, Chicago, Illinois, EUA) cubierto con papel aluminio a 4 °C dentro de un recipiente hermético.

Extracción de DNA de las cepas aisladas

Las cepas se reactivaron en medio SNA; después de 8 d se colectó el micelio con una espátula y se colocó en un tubo Eppendorf de 2 mL. La extracción de DNA se basó en una modificación al protocolo de Bromuro de cetil-trimetil-amonio (CTAB) 2 % propuesto por Doyle y Doyle (1990), que consistió en re-suspender la pastilla de DNA en 400 μL de agua HPLC. Los tubos se incubaron a 55 °C por 15 min; posteriormente, se agregaron 34 μL de acetato de sodio ($\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$) 3 M y 1 mL de etanol 95 % frío y éstos se mezclaron suavemente por inversión; los tubos se colocaron a -20 °C durante 1 h y se centrifugaron a $11,500 \times g$ por 5 min. La pastilla se lavó dos veces con 650 μL de etanol 70 % y se centrifugó por 5 min. Finalmente, la pastilla se re-suspendió en 40 μL de agua HPLC y se almacenó a -20 °C. El DNA se cuantificó por espectrofotometría en un NanoDrop 2000 UV-Vis (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA) y se consideró de buena calidad cuando los valores de absorbancia de las relaciones A_{260}/A_{280} y A_{260}/A_{230} se encontraron entre 1.8 y 2.0. Para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) el DNA se preparó en diluciones de 20 ng mL^{-1} .

Amplificación y secuenciación del gen *TEF-1a*

Para la amplificación del gen *TEF-1a* se utilizaron los iniciadores EF-448 (5'-TCACTTGATCTACAAGTGCGGTGG-3') y EF-1251 (5'-CCTCGAACTCACCAGTACCG-3'), que amplifican un fragmento de 650 pares de bases (pb) (Alves *et al.*, 2008). La mezcla de reacción de PCR se preparó en un volumen final de 15 μL que contenía agua HPLC, 1X buffer, 0.2 μM de dNTPs, 10 pmol de cada iniciador, 0.9 U Go *Taq* DNA Polimerasa (Promega, Madison, Wisconsin, EUA) y 60 ng de DNA. Las condiciones de amplificación consistieron en una desnaturalización inicial a 95 °C por 85 s, seguida por 35 ciclos de 95 °C por 35 s, 60 °C por 55 s y 72 °C por 1.5 min, y un ciclo de extensión final a 72 °C por 10 min. La reacción de PCR se llevó a cabo en un termociclador Peltier Thermal Cycler C1000 Touch™ (Bio-Rad, Hercules, California, EUA).

La amplificación de los productos de PCR se verificaron por electroforesis en gel de agarosa Seakem® (Lonza, Alpharetta, Georgia, EUA) 1.5% teñido con GelRed® (Biotium, Fremont, California, EUA) y corrido a 80 V durante 1.5 h. Las bandas se visualizaron en un transiluminador (Vilber Lourmat, Eberhardzell, Alemania) y se documentaron con el sistema Infinity (<http://www.vilber.de/en/products/gel-documentation/infinity/>). Los amplicones se limpiaron con el método enzimático ExoSAP-IT™ (Affymetrix, Santa Clara, California, EUA), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

La reacción de secuenciación se realizó en placas MicroAmp Optical de 96 pozos con el BigDye™ Terminator v 3.0 (Applied Biosystems®, Foster City, California, EUA), en un volumen total de 20 μL que contenía 4.0 μL (2.5 X) de Ready Reaction Premix, 2.0 μL (5X) BigDye sequencing buffer, 4 pM de cada iniciador y 2.0 μL del producto de PCR como molde. Las placas se lavaron con el método de precipitación con acetato de sodio/etanol; posteriormente, se secaron e hidrataron con formamida. Finalmente, las placas se colocaron en un secuenciador Genetic Analyzer modelo 3130 (Applied Biosystems®).

Reconstrucción filogenética mediante inferencia bayesiana

Las secuencias se ensamblaron con el programa bioinformático DNA Baser Sequence Assembler 4.36 (www.DnaBaser.com) para obtener la secuencia consenso correspondiente a cada cepa, las que se compararon con la opción Basic Local Alignment Search Tools Nucleotide (BLASTN) (Zhang *et al.*, 2000) del National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

nih.gov/) para determinar las secuencias relacionadas con base en los porcentajes de máxima identidad. De esta manera se identificaron las secuencias de referencia a incluirse para el análisis conjunto, las que se obtuvieron de la base de datos del Fungal Biodiversity Center's *Fusarium* Multilocus Sequence Typing (<http://www.cbs.knaw.nl/Fusarium>) y del GenBank.

Para la reconstrucción filogenética, las secuencias consenso junto con las secuencias de referencia se compilaron en un archivo Fasta y se alinearon con la opción Muscle (Edgar, 2004), incluido en el programa MEGA 7 (Kumar *et al.*, 2016) con los parámetros por defecto.

El árbol filogenético se construyó con el método de inferencia bayesiana con el programa MrBayes v.3.2 (Ronquist *et al.*, 2012). Para el análisis se utilizó el modelo de sustitución nucleotídica Generalized Time Reversible (GTR), que considera que las tasas de sustitución, transiciones y transversiones son diferentes; además, el modelo incorpora diferentes tasas para cada cambio y diferente frecuencia de nucleótidos. En el presente estudio, el valor supuesto de cuatro caracteres implementado por defecto en el programa MrBayes se reemplazó por el valor de 6, que es la tasa de sustitución con la opción *Iset* (Tavaré, 1986); el muestreo de los árboles se realizó cada 1000 generaciones. El análisis concluyó cuando la desviación estándar fue menor que 0.01. Del total de árboles que se generó se eliminó el 25 % con la función *burn-in phase*; la probabilidad posterior se determinó con el resto de los árboles. La visualización del árbol se realizó con el programa FigTree (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>) y las secuencias resultantes se depositaron en la base de datos del GenBank.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento y obtención de cultivos monoconidiales (cepas)

Se obtuvieron 439 cepas procedentes de las 84 mazorcas. El 54 % (237/439) de las cepas provino de semillas sintomáticas y el 46 % (202/439) de semillas asintomáticas (Cuadro 1); es decir, de una misma mazorca se pueden aislar colonias de *Fusarium* de ambos tipos de semillas; en consecuencia, es probable que el fitomejorador seleccione germoplasma susceptible a pudrición de la mazorca cuando elige fenotipos aparentemente sanos; es decir, plantas que producen mazorcas en las que coexisten ambos tipos de semilla.

La distribución de las cepas por entidad fue la siguiente: Chiapas 35.6 % [(70 de semillas asintomáticas + 86 de sintomáticas)/439], Estado de México, Chihuahua y

Jalisco 17.3 % y Guanajuato 12.5 %. Este número de aislamientos guarda paralelismo con la frecuencia de mazorcas provenientes de cada entidad: Chiapas 33.3 %, Estado de México 16.7 %, Guanajuato 12 %, Chihuahua y Jalisco 19 % (Cuadro 1). Lo anterior significa que no hubo una mayor frecuencia de aislamientos entre entidades; sin embargo, como se desconoce la nomenclatura varietal de las mazorcas, persiste la duda de si el número de muestras (mayor en Chiapas que en Guanajuato) se debe a que en la primera entidad existe mayor incidencia de *Fusarium* que en la segunda.

Dentro de cada entidad federativa no hubo predominancia del número de cepas aisladas de semillas asintomáticas con respecto al de semillas sintomáticas (*i.e.* Chiapas 70 vs. 86, Chihuahua 38 vs. 38). De éstas, sólo una de las muestras asintomáticas de mazorca (Cuautenango, Tenango del Valle, Estado de México) no presentó micelio (Cuadro 1).

En cuanto a la pigmentación de las cepas (Cuadro 1); el 49.6 % [*i.e.*, (139 de semillas asintomáticas + 79 de sintomáticas)/439] fueron blancas; 18.0 % color salmón (con mayor incidencia en Chiapas); 15.5 % moradas, con mayor incidencia en Chiapas y sin presencia en Guanajuato; 10.5 % rojas (sin presencia en Chiapas) y 6.4 % de color violeta, con mayor presencia en el Estado de México y ausentes en Jalisco; sin embargo, al agrupar las cepas en función de la sintomatología se observa que, en general, los colores blanco y salmón están presentes, aunque con diferente frecuencia en semillas sintomáticas y asintomáticas en casi todas las entidades, con excepción de las muestras provenientes de Chihuahua, y los colores violeta y rojo predominan en las semillas sintomáticas del Estado de México y Jalisco. En un estudio sobre la pigmentación de los micelios de *Fusarium* provenientes de semillas sintomáticas de maíz se observó predominancia del color morado y blanco, mientras que los de semillas asintomáticas fueron de color violeta, blanco o crema (Solano-Báez *et al.*, 2011).

Reconstrucción filogenética de los aislamientos usando el gen *TEF-1a*

Con base en los resultados de la amplificación del gen *TEF-1a* se observó la presencia de amplicones bien definidos de ~ 650 pb (Figura 1).

El análisis de las secuencias de los 439 aislamientos (202 procedente de semillas asintomáticas y 237 de semillas sintomáticas) indicó la presencia de las especies *F. subglutinans* (GenBank MN517841 y MN517842), *F. temperatum* (GenBank MN517843 y MN517844) y *F. verticillioides* (GenBank MN517845, MN517846 y

Cuadro 1. Número de cepas aisladas de semillas sintomáticas (S) y asintomáticas (A) presentes en la misma mazorca de maíz por entidad federativa desglosadas por la pigmentación del micelio.

Entidad (número de mazorcas)	Localidad	Núm. de aislamientos	color										Tipo de aislamiento	
			Blanco		Salmón		Morado		Violeta		Rojo		A	S
			A	S	A	S	A	S	A	S	A	S		
Chiapas (28)	CI Tuxtla	32	10	6	2	4	2	8	0	0	0	0	14	18
	Estación Chiapa de Corzo	86	23	16	17	18	2	6	0	4	0	0	42	44
	Ayotzintepec	38	12	8	2	0	0	14	0	2	0	0	14	24
	Subtotal	156	45	30	21	22	4	28	0	6	0	0	70	86
Estado de México (14)	Cuautenango, Tenango del Valle	6	0	4	0	0	0	0	0	2	0	0	0	6
	Otzolotepec, Xonacatlán	20	4	4	4	0	0	2	0	6	0	0	8	12
	Fresno Nichi, San Felipe del Progreso	26	4	6	6	2	0	0	2	6	0	0	12	14
	San Pedro El Alto, Temascalcingo	24	10	0	0	0	0	2	0	0	0	12	10	14
	Subtotal	76	18	14	10	2	0	4	2	14	0	12	30	46
Guanajuato (10)	San Francisco del Rincón	8	2	2	2	0	0	0	2	0	0	4	4	
	Victoria	20	8	8	0	4	0	0	0	0	0	8	12	
	Cerrito A. A. Germán Rodríguez	11	2	3	2	4	0	0	0	0	0	4	7	
	Subtotal	55	16	17	4	8	0	0	0	4	4	2	24	31
Chihuahua (16)	Cuauhtémoc	20	4	0	0	0	0	0	0	8	8	12	8	
	Villa Ahumada	56	22	2	2	4	2	18	0	2	0	4	26	30
	Subtotal	76	26	2	2	4	2	18	0	2	8	12	38	38
Jalisco (16)	CI Tlajomulco	76	34	16	4	2	0	14	0	0	2	4	40	36
	Total	439	139	79	41	38	6	64	2	26	14	30	202	237

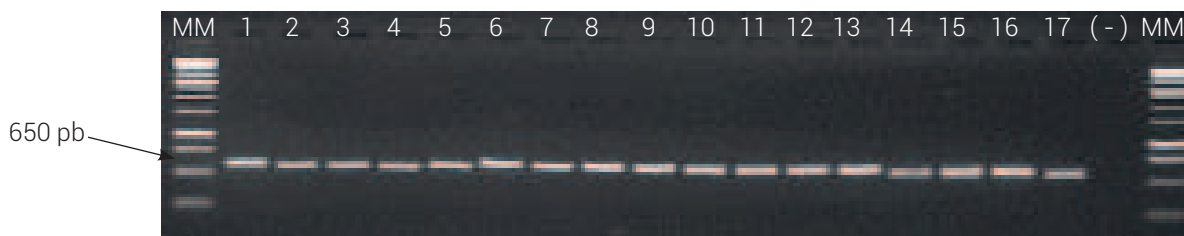


Figura 1. Bandas de 650 pares de bases (pb) correspondientes a la amplificación parcial del factor de elongación de la traducción *1α* de *Fusarium* spp. Carriles 1 a 3: cepas de Chiapas 2.1.1a, 2.2.2s y 3.2.2s; carriles 4 a 6: cepas del Estado de México 26.1.1a, 26.5.1s y 27.3s; carriles 7 a 9: cepas de Guanajuato 32.5.1s, 33.1.1a y 33.5.1s; carriles 10 a 12: cepas de Jalisco 53.2.1s, 55.1.1a y 55.3.1s; carriles 13 a 14: cepas de Chihuahua 33.1.1a y 33.5.1s; carriles 15 a 17: cepas de Sinaloa 21.1.1a, 21.2.1a y 21.4.1s. a: asintomática; s: sintomática; MM: marcador molecular de 1kb.

MN517847); además, para el caso de *F. verticillioides* se detectó la presencia del Haplotipo 10 en las muestras procedentes de Chiapas (27 aislamientos de semillas asintomáticas, 32 de sintomáticas), Estado de México (27 de semillas asintomáticas, 42 de sintomáticas), Chihuahua (12 de semillas asintomáticas, 13 de sintomáticas) y Jalisco (23 de semillas asintomáticas, 20 de sintomáticas); y del Haplotipo 11 en Chiapas (11 aislamientos de semillas asintomáticas, 14 de sintomáticas) y en Chihuahua (3 de semillas asintomáticas, 3 de sintomáticas), los que representan un nuevo registro para México (Figura 2), más un grupo no definido en el mismo clado (Figura 3), que corresponden a lo propuesto por Zhang *et al.* (2016), quienes se basaron en cambios de un solo nucleótido (SNP) en las posiciones 59 a 606 del gen *TEF-1α*. Los cambios en el Haplotipo 10 corresponden a las posiciones 591 (C/T) y 606 (C/T) (GenBank MN025470) y en el Haplotipo 11 en la posición 606 (C/T) (GenBank MN025471) (Cuadro 2). Otras evidencias de la diversidad genética de las poblaciones de *F. verticillioides* se han obtenido mediante el uso de microsatélites (Leyva-Madrigal *et al.*, 2017).

Fusarium temperatum es una subpoblación derivada de *F. subglutinans*, descrita por Scauflaire *et al.* (2011) dentro del complejo *Fusarium fujikuroi*, que se caracteriza por incluir especies que producen toxinas que constituyen un peligro para la bioseguridad agrícola, la inocuidad de los alimentos y la salud de las plantas y animales (O'Donnell *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2014). Asimismo, esta especie se ha reportado causando tizón en plántulas, pudrición de tallo y pudrición de mazorca en España (Pintos *et al.*, 2013), Corea del Sur (Shin *et al.*, 2014), Polonia (Czembor *et al.*, 2014), China (Zhang *et al.*, 2014), América del Norte (Lanza *et al.*, 2016) e Italia (Venturini *et al.*, 2016). En México, *F. temperatum* se ha aislado también de suelo donde se ha cultivado previamente maíz (Robles-Barrios *et al.*, 2015) y *F.*

subglutinans se ha encontrado en Chihuahua, Guanajuato y Estado de México.

En semillas sintomáticas procedentes de razas e híbridos de maíz en los Valles Altos Centrales de México, además de *F. temperatum*, *F. subglutinans* y *F. verticillioides*, se ha demostrado la presencia de *F. chlamydosporum*, *F. napiforme*, *F. poae* y *F. pseudonygamai* (Morales-Rodríguez *et al.*, 2007; Rivas-Valencia *et al.*, 2011). En semillas procedentes de Sinaloa se obtuvieron 63 aislamientos de *F. verticillioides*, cuatro de *F. andiyazi*, dos de *F. thapsinum* y dos de *F. nygamai* (Leyva-Madrigal *et al.*, 2015). El mayor número de especies de *Fusarium* que estos autores mencionan, con respecto al número de especies del mismo género observado en el presente estudio, podría atribuirse a que las mazorcas aquí analizadas fueron producto de programas de mejoramiento genético enfocados a la selección de líneas resistentes a pudrición de mazorca; sin embargo, cuando estas líneas se siembran en localidades con presencia de haplotipos de *F. verticillioides* diferentes de los que fueron seleccionados, es posible observar el crecimiento micelial de nuevos linajes.

CONCLUSIONES

El porcentaje de las cepas de *Fusarium* aisladas en semillas asintomáticas y sintomáticas de maíz es similar, lo que indica que pueden aislarse colonias de hongos en ambos tipos de semillas cuando se encuentran en una misma mazorca. No hubo predominancia en el número de aislamientos fúngicos entre ambos tipos de semillas en entidad federativa alguna. Las especies de *Fusarium* identificadas mediante amplificación y secuenciación de la secuencia parcial del gen *TEF-1α* pertenecen a *Fusarium verticillioides* Haplotipos 10 y 11, *F. subglutinans* y *F. temperatum*, miembros del complejo *F. fujikuroi*.

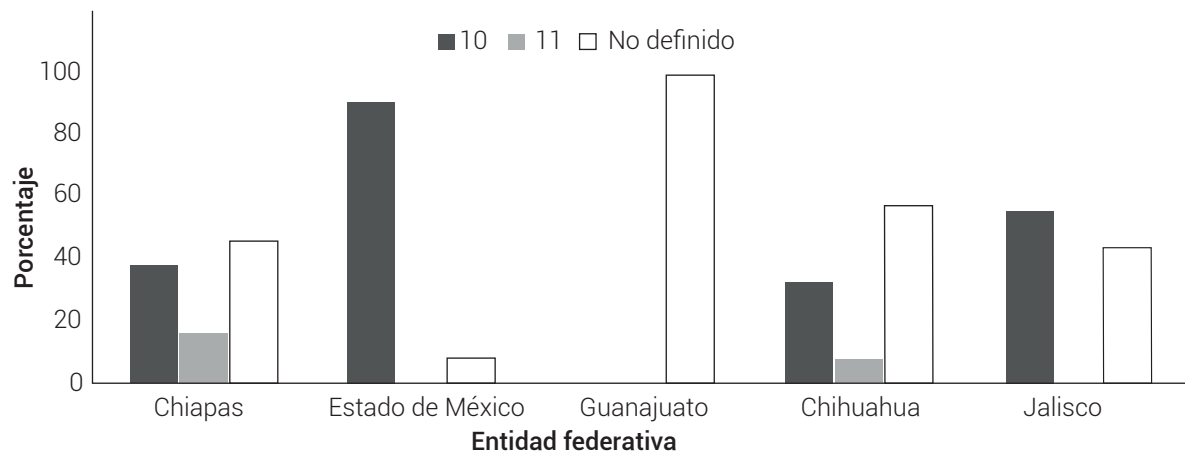


Figura 2. Porcentaje de los Haplotipos 10 y 11 de *Fusarium verticillioides* aislados de semilla de maíz por entidad federativa. Ambos haplotipos representan nuevos registros para México.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el financiamiento para los estudios de Maestría de la primera autora y al Laboratorio de Investigación de Dupont-Pioneer en Tlajomulco de Zúñiga por proporcionar el material genético y por las facilidades para el aislamiento de las especies de *Fusarium*. Al Laboratorio de Biotecnología y Patología de Semillas del PREGEP-Producción de Semillas del Colegio de Posgraduados, por el financiamiento parcial para la secuenciación través del proyecto PS17-4011.

BIBLIOGRAFÍA

- Alves A., P. W. Crous, A. Correia and A. J. L. Phillips (2008) Morphological and molecular data reveal cryptic speciation in *Lasiodiplodia theobromae*. *Fungal Diversity* 28:1-13.
- Briones-Reyes D., F. Castillo-González, J. L. Chávez-Servia, V. H. Aguilar-Rincón, C. de León-García-de Alba y A. Ramírez-Hernández (2015) Respuesta del maíz nativo del altiplano mexicano a pudrición de mazorca, bajo infección natural. *Agronomía Mesoamericana* 26:73-85, <https://doi.org/10.15517/am.v26i1.16922>
- Crous P. W., D. L. Hawksworth and M. J. Wingfield (2015) Identifying and naming plant-pathogenic fungi: past, present, and future. *Annual Review of Phytopathology* 53:247-267, <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080614-120245>
- Czembor E., L. Stepień and A. Waśkiewicz (2014) *Fusarium temperatum* as a new species causing ear rot on maize in Poland. *Plant Disease* 98:1001, <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-13-1184-PDN>
- Doyle J. J. and J. L. Doyle (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12:13-15.
- Edgar R. C. (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* 32:1792-1797, <https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>
- FAOSTAT, The Food and Agriculture Organization Corporate Statistical Database (2017) Food and agriculture data. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome. <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC/visualize> (March 2018).
- Geiser D. M. (2004) Practical molecular taxonomy of fungi. In: *Advances in Fungal Biotechnology for Industry, Agriculture, and Medicine*. J. S. Tkacz and L. Lange (eds.). Springer. Boston, Massachusetts, USA. pp:3-14, https://doi.org/10.1007/978-1-4419-8859-1_1
- Geiser D. M., M. M. Jiménez-Gasco, S. Kang, I. Makalowska, N. Veeraraghavan, T. J. Ward, N. Zhang, G. A. Kuldau and K. O'Donnell (2004) FUSARIUM-ID v. 1.0: a DNA sequence database for identifying *Fusarium*. *European Journal of Plant Pathology* 110:473-479, <https://doi.org/10.1023/B:EJPP.0000032386.75915.a0>
- Karlsson I., V. Edel-Hermann, N. Gautheron, M. B. Durling, A. K. Kolseth, C. Steinberg, P. Persson and H. Friberg (2016) Genus-specific primers for study of *Fusarium* communities in field samples. *Applied and Environmental Microbiology* 82:491-501, <https://doi.org/10.1128/AEM.02748-15>
- Kumar S., G. Stecher and K. Tamura (2016) MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33:1870-1874, <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
- Lanza F. E., D. A. Mayfield and G. P. Munkvold (2016) First report of *Fusarium temperatum* causing maize seedling blight and seed rot in North America. *Plant Disease* 100:1019, <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-15-1301-PDN>
- Leslie J. F. and B. A. Summerell (2006) *The Fusarium Laboratory Manual*. Wiley-Blackwell. Ames, Iowa, USA. 388 p.
- Leslie J. F. and B. A. Summerell (2013) An overview of *Fusarium*. In: *Fusarium: Genomics, Molecular and Cellular Biology*. D. W. Brown and R. H. Proctor (eds.). Caister Academic Press. Norfolk, UK. pp:1-11.
- Leyva-Madrigal K. Y., C. P. Larralde-Corona, M. A. Apodaca-Sánchez, F. R. Quiroz-Figueroa, P. A. Mexía-Bolaños, S. Portillo-Valenzuela, J. Ordaz-Ochoa and I. E. Maldonado-Mendoza (2015) *Fusarium* species from the *Fusarium fujikuroi* species complex involved in mixed infections of maize in northern Sinaloa, Mexico. *Journal of Phytopathology* 163:486-497, <https://doi.org/10.1111/jph.12346>
- Leyva-Madrigal K. Y., E. Sandoval-Castro, C. L. Calderón-Vázquez, C. P. Larralde-Corona and I. E. Maldonado-Mendoza (2017) Pathogenic and genetic variability of *Fusarium verticillioides* from maize in northern Mexico. *Canadian Journal of Plant Pathology* 39:486-496, <https://doi.org/10.1080/07060661.2017.1378726>
- Mancini V., S. Murolo and G. Romanazzi (2016) Diagnostic methods for detecting fungal pathogens on vegetable seeds. *Plant Pathology* 65:691-703, <https://doi.org/10.1111/ppa.12515>
- Morales-Rodríguez I., M. J. Yañez-Morales, H. V. Silva-Rojas, G. García-de-los-Santos and D. A. Guzmán-de-Peña (2007) Biodiversity of *Fusarium* species in Mexico associated with ear rot in maize, and their identification using a phylogenetic approach. *Mycopathologia* 163:31-39, <https://doi.org/10.1007/s11046-006-0082-1>
- O'Donnell K., H. I. Nirenberg, T. Aoki and E. Cigelnik (2000) A multigenic phylogeny of the *Gibberella fujikuroi* species complex: detection of additional phylogenetically distinct species. *Mycoscience* 41:61-78, <https://doi.org/10.1007/BF02464387>

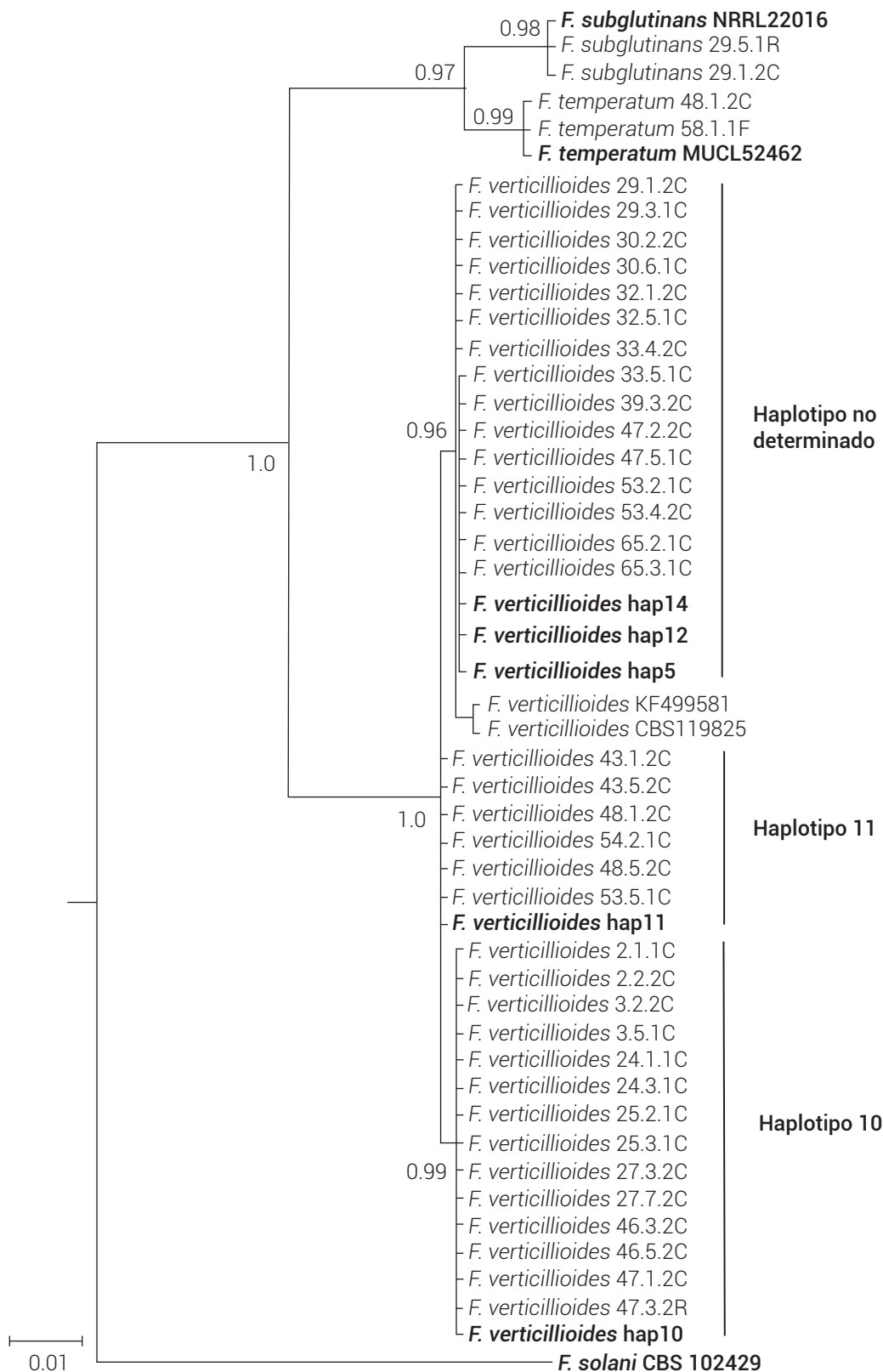


Figura 3. Árbol filogenético construido mediante inferencia bayesiana con secuencias parciales del factor de elongación de la transcripción *1α*, representativas de los Haplotipos 10 y 11 de *Fusarium verticillioides*. *Fusarium solani* cepa CBS 10229 se incluyó como grupo externo. La barra inferior (0.01) indica sustituciones por sitio.

Cuadro 2. Ubicación de los cambios en un solo nucleótido en la secuencia parcial del factor de elongación de la traducción 1a que permitieron la diferenciación de haplotipos de *Fusarium verticillioides*.

Haplotipo	Posición y tipo de nucleótido [†]													
	59	74	81	124	129	230	246	306	322	356	381	425	591	606
	C	C	A	G	C	C	A	A	C	C	A	C	C	C
1	G	T	.	.	.
2	.	.	.	A	T
3	A	T	.	.	.
4	.	.	.	A	T	A
5
6	T	.	.	.
7	G	G	.	.	G	.	.
8	G	G
9	T
10	T	T
11	T
12	.	.	C
13	C	T	T
14	.	A	.	A	T

[†]Haplotipos 1 al 14, descritos por Zhang *et al.* (2016).

O'Donnell K., T. J. Ward, V. A. R. G. Robert, P. W. Crous, D. M. Geiser and S. Kang (2015) DNA sequence-based identification of *Fusarium*: current status and future directions. *Phytoparasitica* 43:583-595, <https://doi.org/10.1007/s12600-015-0484-z>

O'Donnell K., S. P. McCormick, M. Busman, R. H. Proctor, T. J. Ward, G. Doehring, D. M. Geiser, J. F. Alberts and J. P. Rheeder (2018) Marasas *et al.* 1984 "Toxigenic *Fusarium* species: identity and mycotoxicology" revisited. *Mycologia* 110:1058-1080, <https://doi.org/10.1080/00275514.2018.1519773>

Pintos V. C., O. Aguín C., M. Chaves P., V. Ferreiroa M., M. J. Sainz O., J. Scauflaire, F. Munaut, M. J. Bande C. and J. P. Mansilla V. (2013) First report of *Fusarium temperatum* causing seedling blight and stalk rot on maize in Spain. *Plant Disease* 97:1252, <https://doi.org/10.1094/PDIS-02-13-0167-PDN>

Raja H. A., A. N. Miller, C. J. Pearce and N. H. Oberlies (2017) Fungal identification using molecular tools: a primer for the natural products research community. *Journal of Natural Products* 80:756-770, <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.6b01085>

Rivas-Valencia P., J. Virgen-Vargas, I. Rojas M., A. Cano S. y V. Ayala E. (2011) Evaluación de pudrición de mazorca de híbridos de maíz en Valles Altos. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 2:845-854.

Robles-Barrios K. F., M. G. Medina-Canales, A. V. Rodríguez-Tovar and N. O. Pérez (2015) Morphological and molecular characterization, enzyme production and pathogenesis of *Fusarium temperatum* on corn in Mexico. *Canadian Journal of Plant Pathology* 37:495-505, <https://doi.org/10.1080/07060661.2015.1113445>

Ronquist F., M. Teslenko, P. van der Mark, D. L. Ayres, A. Darling, S. Höhna, B. Larget, L. Liu, M. A. Suchard and J. P. Huelsenbeck (2012) MrBayes 3.2: efficient bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology* 61:539-542, <https://doi.org/10.1093/sysbio/sys029>

Scauflaire J., M. Gourgue and F. Munaut (2011) *Fusarium temperatum* sp. nov. from maize, an emergent species closely related to *Fusarium subglutinans*. *Mycologia* 103:586-597, <https://doi.org/10.3852/10-135>

Shin J. H., J. H. Han, J. K. Lee and K. S. Kim (2014) Characterization of the maize stalk rot pathogens *Fusarium subglutinans* and *F. temperatum* and the effect of fungicides on their mycelial growth and colony formation. *The Plant Pathology Journal* 30:397-406, <https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.08.2014.0078>

SIAP, Servicio de Información Agropecuaria y Pesquera (2016) Anuario estadístico de la producción agrícola. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Ciudad de México. <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/> (Abril 2016).

Solano-Báez A. R., C. De León-García De Alba, G. Valdovinos-Ponce, H. V. Silva-Rojas y L. Soto-Rojas (2011) La pigmentación de *Fusarium verticillioides* (Sacc.) como factor de virulencia en plántulas de maíz. *Agronomía Mesoamericana* 22:297-307.

Tavaré S. (1986) Some probabilistic and statistical problems in the analysis of DNA sequences. In: *Lectures on Mathematics in the Life Sciences. DNA Sequence Analysis*. Vol. 17. Some Mathematical Questions in Biology. R. M. Miura (ed.). American Mathematical Society. Providence, Rhode Island, USA. pp:57-86.

Tsedaley B. (2015) Review on seed health tests and detection methods of seedborne diseases. *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare* 5:176-184.

Venturini G., S. L. Toffolatti, A. Passera, R. Pilu, F. Quaglino and P. Casati (2016) First report of *Fusarium temperatum* causing ear rot on maize in Italy. *Journal of Plant Pathology* 98:686, <https://doi.org/10.4454/JPP.V98I3.016>

Walcott R. R. (2003) Detection of seedborne pathogens. *HortTechnology* 13:40-47, <https://doi.org/10.21273/HORTTECH.13.1.0040>

Wang J. H., J. B. Zhang, H. P. Li, A. D. Gong, S. Xue, R. S. Agboola and Y. C. Liao (2014) Molecular identification, mycotoxin production and comparative pathogenicity of *Fusarium temperatum* isolated from maize in China. *Journal of Phytopathology* 162:147-157, <https://doi.org/10.1111/jph.12164>

Wigmann É. F., J. Behr, R. F. Vogel and L. Niessen (2019) MALDI-TOF MS fingerprinting for identification and differentiation of species within the *Fusarium fujikuroi* species complex. *Applied*

- Microbiology and Biotechnology* 103:5323-5337, <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09794-z>
- Young K. J. and S. P. Long (2000)** Crop ecosystem responses to climatic change: maize and sorghum. *In: Climate Change and Global Crop Productivity*. K. R. Reddy and H. F. Hodges (eds.). CABI Publishing. Wallingford, UK. pp:107-131.
- Zhang Z., S. Schwartz, L. Wagner and W. Miller (2000)** A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *Journal of Computational Biology* 7:203-214, <https://doi.org/10.1089/10665270050081478>
- Zhang H., B. Brankovics, W. Luo, J. Xu, J. S. Xu, C. Guo, ... and C. Waalwijk (2016)** Crops are a main driver for species diversity and the toxigenic potential of *Fusarium* isolates in maize ears in China. *World Mycotoxin Journal* 9:701-715, <https://doi.org/10.3920/WMJ2015.2004>
- Zhang H., W. Luo, Y. Pan, J. Xu, J. S. Xu, W. Q. Chen and J. Feng (2014)** First report of *Fusarium temperatum* causing Fusarium ear rot on maize in Northern China. *Plant Disease* 98:1273, <https://doi.org/10.1094/PDIS-02-14-0124-PDN>