

FUMONISINAS –SÍNTESIS Y FUNCIÓN EN LA INTERACCIÓN *Fusarium verticillioides*-MAÍZ

**Ma. Eugenia de la Torre-Hernández, Diana Sánchez-Rangel,
Eduardo Galeana-Sánchez y *Javier Plasencia-de la Parra**

Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad Universitaria, Deleg. Coyoacán, C.P. 04510, México, D.F. E-mail: *javierp@unam.mx

RESUMEN

Fusarium verticillioides es el principal hongo patógeno que afecta la productividad del maíz en el mundo. Este hongo penetra a la planta por distintas rutas e infecta raíces, tallo y mazorca. El patógeno produce varias toxinas en el tejido y en los granos del maíz, lo que disminuye su calidad. Las fumonisinas son las toxinas mayoritarias excretadas por el hongo. Un grupo de genes forma el locus *FUM* en el cromosoma 1 de *F. verticillioides* y codifica las enzimas responsables de la síntesis de las fumonisinas. Sin embargo, la cantidad de fumonisin producida es altamente variable entre cepas del hongo. La regulación de la síntesis es muy compleja y depende de factores ambientales y nutricionales, así como de múltiples vías de señalización que ejercen tanto regulación positiva como negativa. Las fumonisinas son consideradas factores de virulencia, ya que su producción se asocia con una mayor capacidad de infección de *F. verticillioides* en plántulas de maíz. Sin embargo, este papel no es claro en la infección y pudrición de la mazorca. En maíz, las fumonisinas tienen tres blancos moleculares que son la esfinganina N-acil transferasa, la ATPasa de protones de membrana plasmática y las β-1,3-glucanasas básicas. Las tres enzimas tienen funciones fisiológicas relevantes y participan en la respuesta de defensa de la planta.

Palabras Clave: Fumonisin, *Fusarium verticillioides*, maíz, micotoxina.

ABSTRACT

Fusarium verticillioides is the main fungal pathogen that affects the productivity of maize worldwide. The fungus penetrates the plant by different routes and infects roots, stem and cob. The pathogen produces several toxins in tissue and corn kernels, which affect their quality. Fumonisins are the major toxins produced by this fungus. The ability to produce them depends on the presence of several genes encoding the enzymes responsible for biosynthesis. The regulation of the synthesis is very complex and depends on environmental and nutritional factors, as well as multiple signaling pathways. This is reflected by the high variability in fumonisin production among *F. verticillioides* strains. Fumonisins are virulence factors because their production is associated with a greater capacity to infect maize seedlings. However, this role is not clear for ear infection and rotting. In maize, fumonisins have three molecular targets: sphinganine N-acyl-transferase, plasma membrane proton ATPase and the basic β-1,3-glucanases. These three enzymes have important physiological functions and also participate in the plant defense response against fungal pathogens.

Key Words: Fumonisin, *Fusarium verticillioides*, maize, mycotoxin.

INTRODUCCIÓN

Fusarium *verticillioides* es un ascomiceto perteneciente a la subdivisión Deuteromycota, que agrupa a aquellos hongos en los que no hay descrita una fase sexual o, bien, ésta es muy rara¹. *F. verticillioides* cae en esta última categoría, porque sí presenta una fase sexual llamada teleomorfo, o forma perfecta, muy difícil de encontrar en la naturaleza y se requieren condiciones especiales para observarla *in vitro*. La forma teleomórfica recibe otro nombre de género y especie: para *F. verticillioides* es *Gibberella moniliformis*, que es heterotálico, ya que el apareamiento ocurre entre colonias de distintos grupos. En el estado anamorfo, o de reproducción asexual, hay abundante producción de microconidias; éstas son células ovaladas con la base aplanada y agrupadas en cadenas (Fig. 1A y 1B). Algunas cepas también generan macroconidias con apariencia larga y delgada, y con cinco o seis septos. Muestran dos células: una apical, que es curva, y otra basal, en forma de pie. Este tipo de conidias se producen con estructuras que aparecen racimos denominados esporodoquios. La especie no produce clamidoconidias, pero con frecuencia las células contenidas en una hifa engrosada son confundidas como tales. Las características y la morfología de la colonia de esta especie

varían de acuerdo con el medio de cultivo. Por ejemplo, en agar papa-dextrosa el micelio es blanco, al inicio, y forma pigmentos que van desde gris hasta violeta (Fig. 1C y 1D). En cambio, en algunos cultivos ya envejecidos, la hifa del hongo produce melanina para conformar estructuras llamadas esclerocios².

La taxonomía de *Fusarium* es sumamente compleja. De ahí que haya sido tema de debate durante muchos años, porque el concepto de especies ha cambiado dentro de un género, dependiendo de los grupos de investigadores. Un trabajo nodal en la taxonomía de este género fue el tratado de Wollenweber & Reinking (1935)³, en el que los autores identificaron 65 especies agrupadas en 16 secciones. Cada sección incluía especies con características comunes, y algunas como *F. verticillioides*, *F. thapsinum*, *F. proliferatum* y *F. subglutinans* pertenecen a la sección Liseola. Además, la única diferencia entre *F. verticillioides* y *F. proliferatum* es que en esta última las cadenas de microconidias son más cortas que en la primera⁴.

La especie *F. verticillioides* se distribuye por todo el mundo, y con alta frecuencia es aislada del maíz, prácticamente de

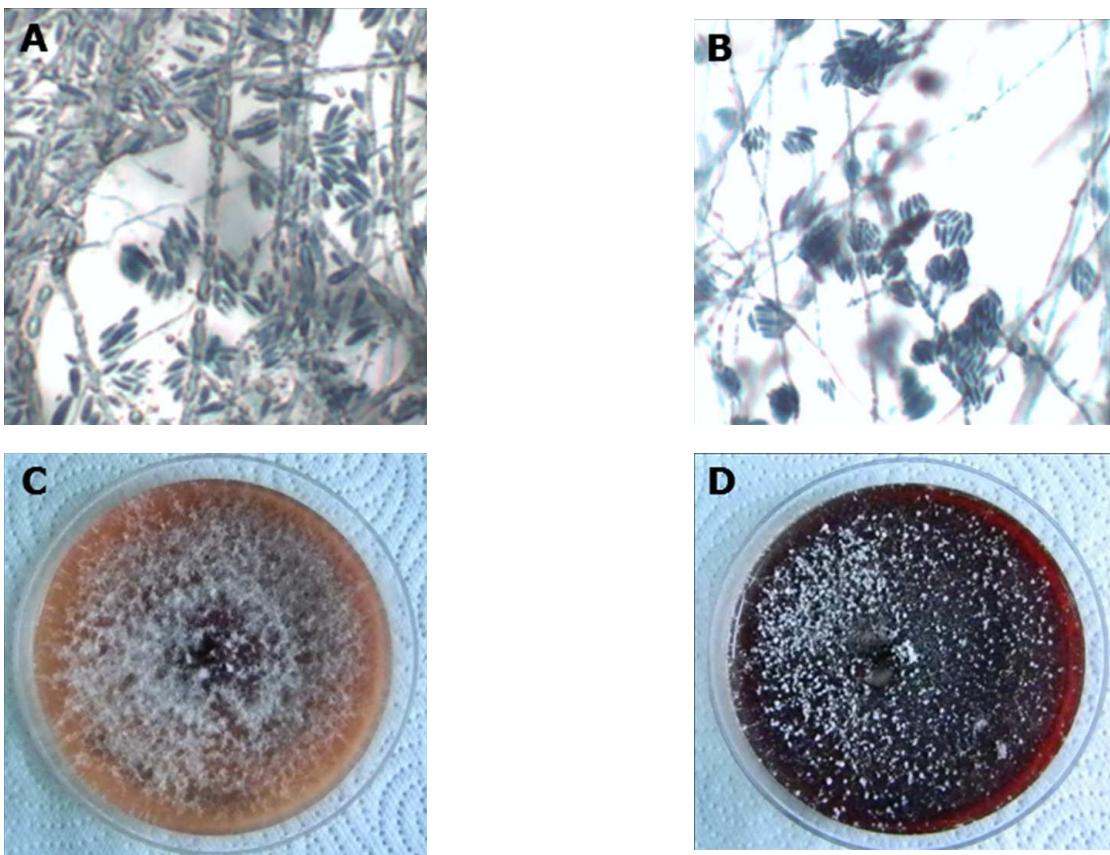


Figura 1. *Fusarium verticillioides*. Microconidias de *F. verticillioides* producidas en esporodoquios (A) y en cadenas (B). Cultivos de *F. verticillioides* en agar papa-dextrosa (C-D).

cualquier órgano de la planta. Es el principal patógeno del cultivo y limitante de la productividad porque ocasiona pérdidas cuantiosas que varían año con año. Se le conoce como un patógeno necrótrofo por la capacidad que tiene de causar la muerte del tejido hospedero y, luego, sobrevive como saprofita en el rastrojo. Sin embargo, durante los períodos tempranos de la infección el hongo adquiere una fase biotrofa, al grado de que puede sobrevivir como endófito en la semilla y en el tallo de las plantas sin causar daños visibles. Cuando las condiciones ambientales son favorables, infecta los tejidos de la planta y es capaz de provocar pudrición en órganos como la raíz, el tallo y la mazorca. Tal circunstancia resulta de la compleja interacción entre varios factores como son la virulencia de la cepa, el genotipo y la etapa del desarrollo del maíz, así como las condiciones ambientales⁵⁻⁷. El clima caliente y húmedo favorece la pudrición de la mazorca durante el periodo de llenado de grano⁸⁻¹⁰.

RUTAS DE ENTRADA Y COLONIZACIÓN DEL PATÓGENO

Uno de los aspectos que favorece la infección y la alta incidencia de *F. verticillioides* en el maíz es que el hongo utiliza múltiples rutas de entrada a la planta para colonizar distintos tejidos y, de esa manera, causa diversas enfermedades a lo largo de su desarrollo (Figura 2). A continuación se describen las principales rutas de infección:

1. Infección sistémica de las plántulas. Ocurre durante y desde la germinación de la semilla, y a lo largo del establecimiento de la plántula. Como el hongo sobrevive –ya sea en la semilla o en el suelo–, se encuentra estratégicamente posicionado para infectar a la planta. *F. verticillioides* penetra de forma directa el pericarpio y a las células de la epidermis de la raíz tres días después de que se siembran las semillas inoculadas. Las hifas colonizan las células del parénquima del escutelo y llegan hasta el córtex. Sin embargo, la colonización de la endodermis y de las regiones vasculares ocurre en raras ocasiones¹¹. Entre 25 y 30 días, las raíces y el mesocotilo ya se hallan colonizados y pueden mostrar síntomas de pudrición, dependiendo de la cantidad de inóculo y de factores ambientales. En el tallo no hay muchas hifas, de ahí que la infección puede cursar de manera asintomática hasta ciertos tejidos¹². Aunque el hongo es capaz de translocarse por el tallo y llegar a la nueva mazorca en desarrollo; el único sitio que parece limitar su paso es el tejido de transición entre la corona de la plántula y el tallo^{5,13}.

2. Infección de la mazorca por medio del estigma. La vía más común para que *F. verticillioides* infecte a la mazorca es a través del estigma. Lo anterior sucede cuando el inóculo aéreo y las conidias transportadas por el agua de lluvia se depositan en el estigma. De esa forma se facilita

el acceso a las células del pericarpio y la hifa del hongo crece en la superficie de la cutícula para poder acceder al grano, a través de la parte inferior del canal estilar, incluso en ausencia de lesiones mecánicas⁷.

3. Infección del tallo y la mazorca por daño mecánico. Al alimentarse, varios insectos –plagas del maíz– horadan las mazorcas y los tallos de la planta. Este daño mecánico funciona como ruta de entrada para las conidias de *F. verticillioides*. Además, hay insectos que actúan como vectores del hongo, ya sea dispersándolo a lo largo de la superficie de la planta hacia los granos –como *Ostrinia spp.*, el gusano barrenador– o, bien, transportándolo a través de grandes distancias –como el gusano de la raíz (*Diabrotica sp.*). Otros vectores descritos son el

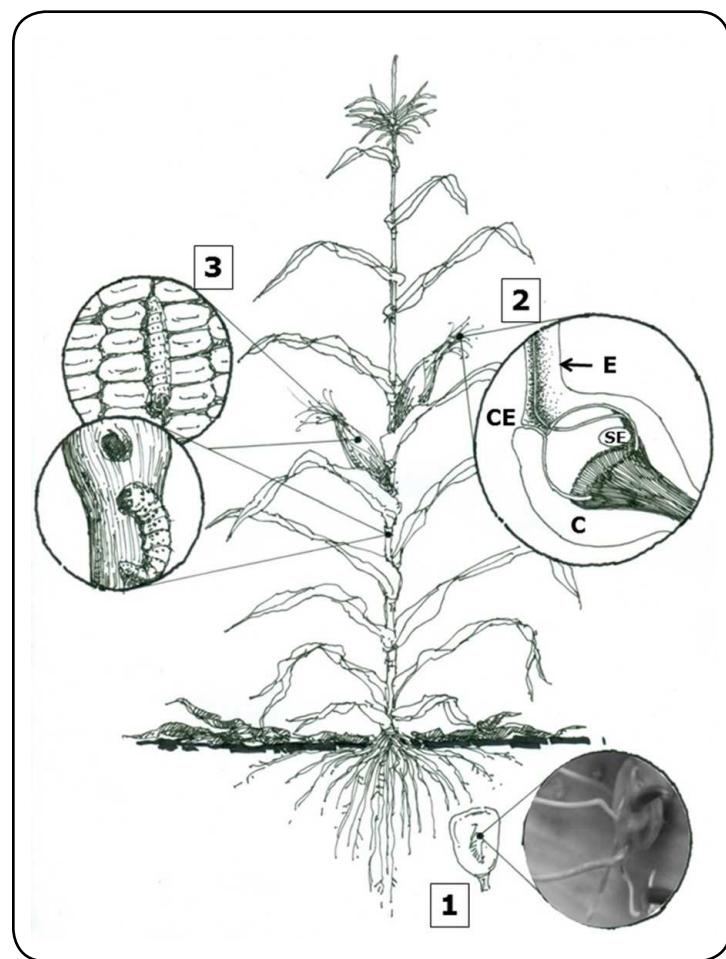


Figura 2. Rutas de entrada de *Fusarium verticillioides* a la planta de maíz. 1. Infección sistémica de plántulas. El hongo sobrevive en la semilla o en el suelo de donde accede a la plántula e infecta las raíces. 2. Infección a través del estigma. Las conidias del hongo son depositadas en el estigma (E) y penetran a través de la parte inferior del canal estilar (CE). C: carpelo, SE: saco embrionario. 3. Infección a través de heridas. El hongo accede al tallo y/o a la mazorca a través de lesiones mecánicas causadas por insectos al alimentarse (Ver detalles en el texto).

gusano elotero –en sus fases de larva y de adulto–, los trips y los gorgojos. La función de vector se apoya en el hecho de que el hongo sobrevive en los órganos externos de los insectos mencionados^{14,15}. Otras evidencias que favorecen el papel de los insectos en la incidencia y severidad de la infección por *F. verticillioides* son: 1) el control de trips con insecticida, que reduce la población de insectos y la enfermedad¹⁶; 2) el maíz genéticamente modificado, que produce la proteína CryIa(b)–la cual confiere resistencia al gusano barrenador europeo–, tiene menor incidencia y severidad de pudrición de la mazorca provocado por *F. verticillioides*¹³.

Evidentemente las rutas de infección mencionadas no son excluyentes y en el campo las plantas son atacadas a través de una o más de estas vías y por distintas cepas del patógeno.

MICOTOXINAS: UN ARSENAL QUÍMICO

A diferencia de otros hongos que son estrictamente biotrofos, *F. verticillioides* no genera estructuras especializadas que faciliten la entrada al tejido y a las células. Sin embargo, es capaz de producir cantidades importantes de enzimas líticas y toxinas que contribuyen al proceso infeccioso. Entre las micotoxinas que sintetiza la especie se hallan el ácido fusárico, la fusarina C, las naftoquinonas, la moniliformina y las fumonisinas. Estas últimas son las más abundantes¹⁷⁻²⁰. La presencia de esos compuestos en productos agrícolas causa gran preocupación, debido a los efectos que ocasionan cuando animales y humanos los consumen. Lo anterior ha fomentado la investigación en torno a los efectos, el modo de acción y el metabolismo de esta micotoxina, así como al desarrollo de métodos analíticos para su detección y cuantificación en maíz y productos derivados de éste^{21,22}. Otro aspecto relevante de la biología de las fumonisinas es su posible papel en la virulencia de *F. verticillioides*, mismo que se revisará más adelante.

LAS FUMONISINAS, UNA FAMILIA DIVERSA DE TOXINAS

En 1988, un grupo de investigadores sudafricanos aislaron y purificaron las fumonisinas de cultivos de *F. verticillioides* cuando buscaban el agente causal de la leucoencefalomalacia equina, que se asociaba con el consumo de maíz mohoso²³. Ese mismo año se dilucidó la estructura química de las toxinas²⁴ y, desde entonces, se han descrito más de 60 moléculas relacionadas estructuralmente con la fumonisina^{25,26}. Sin embargo, sólo ciertas cepas del hongo producen muchas de esas moléculas y en condiciones particulares de cultivo. Las fumonisinas más abundantes de incidencia natural son las del grupo B, derivadas de la mayoría de las cepas de *F. verticillioides*. Las fumonisinas B contienen un esqueleto lineal de 20 carbonos, con un amino en el C-2 y residuos de ácido tricarboxílico esterificados en C-14 y C-15 (Figura 3). Estos compuestos difieren por la presencia o la ausencia de un grupo hidroxilo en los C-5 y C-10. Dentro de esta familia predominan las fumonisinas B1, B2 y B3, pero la B1 (FB1) conforma más del 75% del total de las fumonisinas; asimismo,

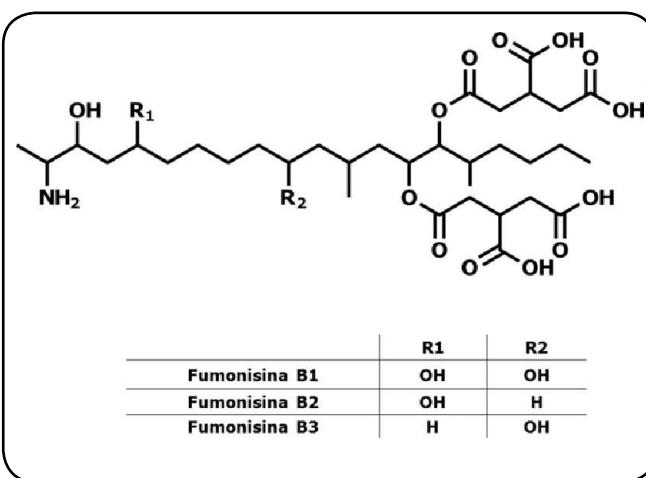


Figura 3. Estructura química de las fumonisinas del grupo B.

es la más estudiada^{27,28}. Los niveles de producción de la toxina FB1 son muy variables entre las cepas de *F. verticillioides*, ya que algunas de ellas no la sintetizan, o bien, lo hacen a niveles muy bajos; en cambio, otras generan grandes cantidades de la toxina. La Tabla I ilustra esa diversidad, pues recopila varios estudios con cepas aisladas en distintas regiones geográficas, las que presentan variaciones de hasta tres órdenes de magnitud en los niveles de FB1.

BIOSÍNTESIS DE FUMONISINAS

La capacidad de sintetizar fumonisinas depende de la presencia de una serie de genes, agrupados en una región de 46 kpb en el cromosoma 1 de *F. verticillioides* y que forman el locus *FUM*²⁹⁻³¹. Los genes codifican las enzimas involucradas en la síntesis de las micotoxinas y de otras proteínas que median la secreción y la resistencia a las mismas.

El análisis de la secuencia de los productos de los genes del locus *FUM* permitió predecir las funciones de estos últimos. También facilitó el diseño de experimentos para comprobar dichas funciones mediante el análisis funcional y la generación de cepas con mutación en alguno de los genes. El trabajo fructificó en la dilucidación de la ruta biosintética de las fumonisinas³². Estas últimas se sintetizan a partir de unidades de acetato para formar un policétido lineal dimetilado, que se condensa con el aminoácido L-alanina, seguido de hasta cinco reacciones de oxigenación y dos esterificaciones. El primer paso es catalizado por una policétido sintasa (PKS), codificada por el gen *FUM1* (Figura 4). Se trata de una enzima modular que tiene varios dominios catalíticos: β-cetoacil sintasa, aciltransferasa y proteína acarreadora de acilos, responsables de la extensión de la cadena del policétido³³. Hacia abajo del gen *FUM1* se ubican otros genes que codifican enzimas participantes en la síntesis de fumonisinas. El producto del gen *FUM8* es una aminotransferasa que acarrea el grupo amino de la alanina al policétido de 18 carbonos, por medio de la condensación descarboxilativa. Despues ocurren

No. de cepas	Origen de las cepas	Medio de producción de fumonisinas	Rango de producción de fumonisinas
40	Colección de cultivos del RINDMRC, Sudáfrica ³⁴	Embriones de maíz	20 - 7100 mg/g
34	Semillas de maíz, México ³⁵	Maíz quebrado	10 - 5810 mg/g
51	Mazorcas de maíz, Irán ³⁶	Maíz quebrado	197 - 9661 mg/g
67	Mazorcas de maíz, México ³⁷	Arroz estéril	0.1 - 4047 mg/g
79	<i>Morogo</i> , Sudáfrica ³⁸	No reportan	114 - 38860 ng/g
12	Semillas de cereales ³⁹	Semillas de sorgo esterilizadas	1.92 - 6.05 mg/g
16	Espárragos, China ⁴⁰	Maíz quebrado	25 - 3850 mg/g
84	Mazorcas de maíz, Alemania ⁴¹	Maíz quebrado	Hasta 21 mg/g
43	Mazorcas de maíz, India ⁴²	Embriones de maíz estériles	133 - 1617 mg/g
16	Mazorcas y rastrojo de maíz, Brasil ⁴³	Maíz quebrado	2.41 - 3996 mg/g
35	Mazorcas de maíz, España ⁴⁴	Medio de composición definida	0.8 - 199 ppm
100	Mazorcas de maíz, Brasil ⁴⁵	Arroz estéril	0.2 - 762 mg/g
26	Embriones de maíz, Italia ⁴⁶	Harina de maíz	0.11 - 82 mg/kg
25	Mazorcas de maíz, Uganda ⁴⁷	Semillas de maíz esterilizadas	19 - 100 mg/kg

Tabla I. Comparación de los niveles de producción de fumonisinas entre diferentes cepas de *F. verticillioides* aisladas de diversas fuentes.

oxidaciones en las posiciones C-14 y C-15, posiblemente por la acción del producto del gen *FUM6*⁴⁸. El intermediario 3-ceto se reduce a un grupo hidroxilo por una reductasa codificada por el gen *FUM1*^{40,49}.

Los productos de los genes *FUM7*, *FUM10*, *FUM11* y *FUM14* participan en la esterificación de los ácidos tricarboxílicos. Es probable que estos últimos provengan de derivados del ácido cítrico –como el ácido aconítico–, pero aún no se demuestra de manera concluyente^{33,50}. El gen *FUM11* determina un transportador de tricarboxilatos, mismo que podría estar involucrado en la transferencia de sustratos a través de los diferentes compartimentos celulares⁵¹. Además de los genes estructurales, en el locus *FUM* se hallan los genes *FUM19* y *FUM21*. El primero codifica un transportador del tipo ABC, que podría actuar en la excreción de la toxina para evitar su acumulación en la célula del hongo⁵². El producto de *FUM21* es un factor de transcripción del tipo Zn(II)-2Cys6, regulador de la expresión de los genes estructurales del locus. La función de este gen se describe más adelante⁵³.

En la naturaleza sobreviven cepas de *F. verticillioides* incapaces de sintetizar fumonisinas porque tienen una mutación en el gen *FUM1* o, bien, carecen del locus *FUM*^{29,54}. También ocurren mutaciones en otros genes del locus, como aquellos que codifican las oxigenasas responsables de la hidroxilación en C-10 y C-5 del esqueleto; lo anterior provoca que no produzcan FB1 y, entonces, acumulan FB2 y FB3²⁸.

REGULACIÓN DE LA BIOSÍNTESIS DE FUMONISINAS

Como lo ilustra la Tabla I, la producción de fumonisinas por distintas cepas de *F. verticillioides* es muy variable y los rangos pueden abarcar hasta tres órdenes de magnitud, aún cuando las cepas crezcan bajo las mismas condiciones en un sustrato natural –como maíz– o en un medio de cultivo de composición definida. Factores ambientales –por ejemplo, pH, disponibilidad de agua y nutrientes– también regulan la síntesis de fumonisinas. Asimismo, hay genes fuera del locus *FUM* que participan, a distintos niveles, en las vías de señalización que conducen a la expresión de los genes del locus *FUM* y a la generación de fumonisinas^{55,56} (Figura 5).

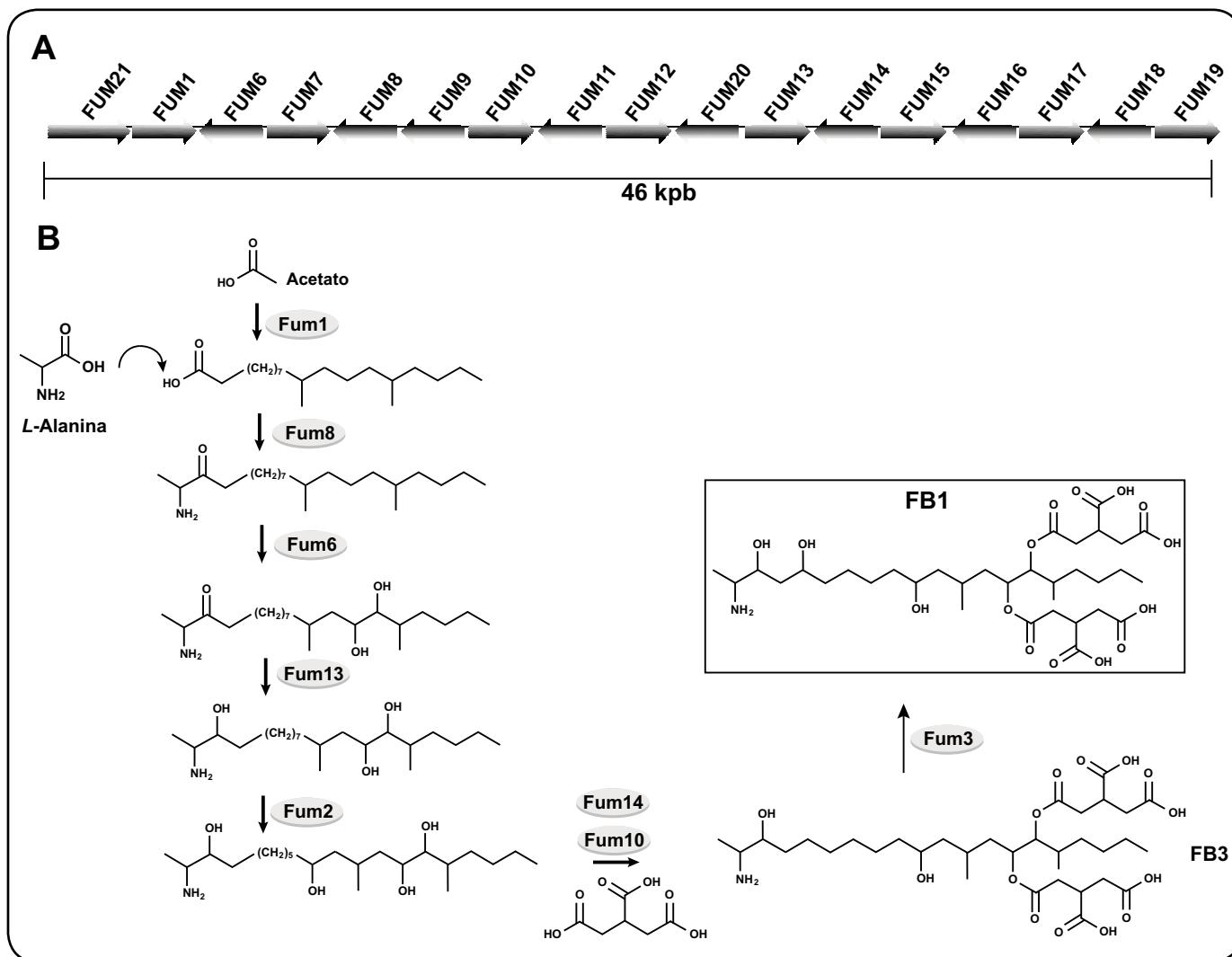


Figura 4. Biosíntesis de fumonisinas. A. Estructura genómica del locus *FUM* en el cromosoma 1 de *F. verticillioides*. B. Ruta biosintética de las fumonisinas. Se indican los pasos en los que participan los productos de los genes del locus *FUM*.

INFLUENCIA DE CONDICIONES AMBIENTALES Y NUTRICIONALES
 El pH influye en la síntesis de fumonisinas; hay una marcada producción de la toxina en pH ácido (4.5), en contraste con el pH alcalino, mayor a 8. La proteína Pac1 de *F. verticillioides* tiene una alta identidad global con otros homólogos de hongos que poseen funciones de activación transcripcional en respuesta al pH ambiental. El gen *PAC1* actúa como represor de la síntesis de fumonisina, pues la mutante en éste produce más toxina que la cepa silvestre, tanto en granos de maíz como en un medio sintético amortiguado a pH ácido (4.5). El gen *FUM1* es un blanco potencial de este regulador porque en la cepa mutante hay niveles mayores del transcripto⁵⁷.

La fuente de nitrógeno constituye un factor nutricional que influye en la síntesis de fumonisinas, ya que el amonio reprime

la producción de la toxina. La relación C:N también afecta la síntesis: si ésta es baja ocurre la supresión. Cuando *F. verticillioides* crece en granos de maíz en estadios tempranos de desarrollo, con bajo contenido de almidón, se da una pobre generación de fumonisina⁵⁸. El gen *AREA* de *F. verticillioides* codifica la proteína que contiene una región altamente conservada entre los reguladores del metabolismo de nitrógeno y que incluye un dominio de unión a la caja GATA en los promotores. Las cepas de *F. verticillioides* con mutación en el gen *AREA* producen menores cantidades de la toxina, por lo que este gen es un regulador positivo de la síntesis de fumonisina⁵⁹.

También el tipo de carbohidratos presentes en los granos de maíz influye en la producción de fumonisina. Por ejemplo, la cantidad de esta toxina es muy baja en un medio de cultivo cuya única

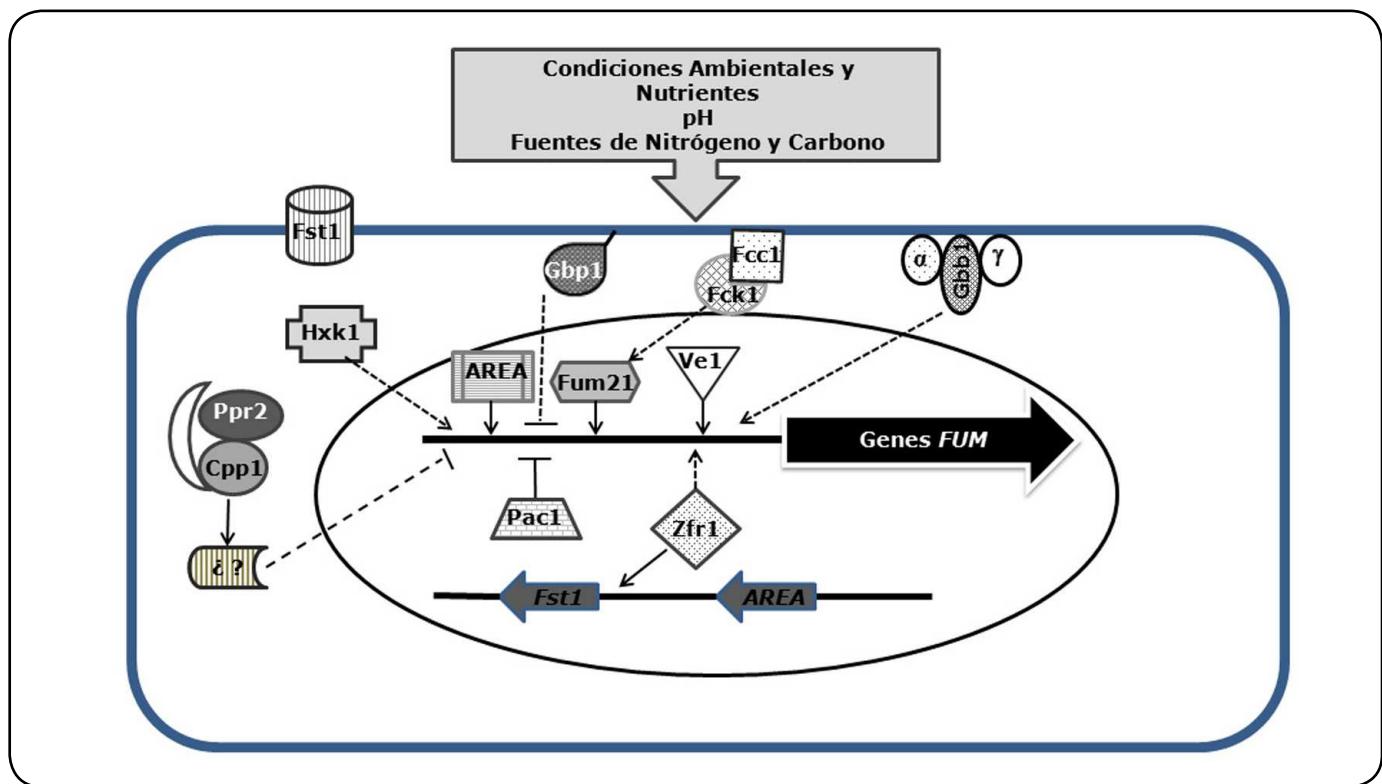


Figura 5. Regulación de la síntesis de fumonisinas. La figura resume los reguladores positivos y negativos de la expresión de los genes *FUM* y la síntesis de fumonisinas e indica su posible localización en la célula. Las flechas continuas indican un efecto positivo mientras que las líneas truncadas un efecto negativo. Las líneas y flechas discontinuas indican una vía que no se ha caracterizado completamente. (Ver detalles en el texto).

fuente de carbono es la amilosa. Sin embargo, aumenta de manera significativa cuando el hongo crece en amilopectina o dextrina; esta última es producto de la hidrólisis de la amilopectina. Del mismo modo, la transcripción de los genes *FUM8* y *FUM12* aumenta durante el desarrollo del grano, conforme se acumula amilopectina y alcanza un máximo en el estado dentado⁵⁸. *HXK1* es otro gen que participa en la percepción de azúcares y contribuye en la regulación de la síntesis de fumonisinas. Codifica una hexocinasa, enzima del metabolismo primario que participa en el crecimiento, el desarrollo y la patogénesis. La mutación de *HXK1* afecta el crecimiento del hongo en presencia de varias fuentes de carbono como fructosa, glucosa, sacarosa o maltotriosa y también ocurre la reducción del 80% en la síntesis de la fumonisinina B1⁶⁰.

El análisis de mutantes en el gen *FST1*, que codifica un transportador de carbohidratos, también apoya el papel de los azúcares en la síntesis de FB1. Las cepas con mutación en *FST1* no se ven afectadas en el crecimiento ni en la colonización del grano, pero sí en la producción de FB1⁶¹. Es posible que la percepción o toma de carbohidratos sea un factor que contribuya en la biosíntesis de la micotoxina. La expresión del gen *FST1* se halla controlada por el factor

transcripcional Zfr1, que es un regulador positivo de la síntesis de fumonisinas y entre sus blancos podrían estar incluidos los genes del locus *FUM*. Las cepas mutantes del gen *ZFR1* muestran crecimiento y desarrollo normal en granos de maíz, pero menor nivel de fumonisinina: apenas un 10% con respecto a la cepa silvestre⁶². Asimismo, el factor transcripcional Sda1 –requerido para el catabolismo del sorbitol– participa negativamente en la regulación de la síntesis de fumonisina. La cepa mutante en este gen produce mayor cantidad de FB1 que la cepa silvestre y es incapaz de crecer en sorbitol como única fuente de carbono⁶³. Otro factor transcripcional que regula positivamente la síntesis de fumonisinas es el producto del gen *FUM21*. Las cepas de *F. verticillioides* con mutación en *FUM21* producen muy poca fumonisinina y alcanzan niveles bajos del transcripto de los genes *FUM1* y *FUM8*, los que son esenciales para la síntesis de la micotoxina⁵³. Fum21 podría unirse al promotor del gen *FUM1* que tiene sobrerepresentada la secuencia CGGATA, donde la triada CGG es reconocida por los factores transcripcionales del tipo Zn(II)-2Cys6. Asimismo, la mutación de esta secuencia *cis* en el promotor de *FUM1* causa menor transcripción del gen cuando el hongo crece *in planta* o *in vitro*⁶⁴.

CASCADAS DE SEÑALIZACIÓN QUE REGULAN LA SÍNTESIS DE FUMONISINAS

La percepción del medio ambiente y los nutrientes que resultan en la expresión de genes del locus *FUM* y en la síntesis de fumonisinas requiere de una señalización celular. Hay varios genes cuyos productos participan en estas rutas de señalización y regulan la producción de la micotoxina. Entre ellos se encuentra *FCCI*, el que codifica una proteína tipo ciclina C pues contiene tres dominios conservados de ciclinas: una caja de ciclina, una región rica en PEST y una caja de destrucción. *FCCI* se expresa de manera constitutiva durante el crecimiento y es un regulador positivo de la síntesis de fumonisinina, pues cepas mutantes en este gen presentan reducción en la expresión del gen *FUM1* y en los niveles de FB1. Parece que *FCCI* participa en la señalización de la percepción ambiental, ya que cuando la mutante crece en medio mínimo a pH 3 la conidiación y producción de FB1 son restablecidas⁶⁵. El modo de acción de las ciclinas es a través de su interacción física con una cinasa dependiente de ciclina (CDK). El gen *FCK1* codifica la proteína que contiene un motivo de unión a ciclina y un dominio de cinasa Ser/Thr homólogo a otras CDKs. La protetina Fck1 forma un complejo con Fcc1 y la mutación del gen *FCK1* también resulta en menor producción de FB1. Para definir la vía en la que participa el complejo Fcc1/Fck1 es necesario descubrir el blanco de esta cinasa. Es posible que FCK1 actúe directamente sobre algún regulador transcripcional del cluster *FUM* –como *FUM21*–, o bien, sobre un regulador global de la expresión génica, y los efectos en la expresión de genes *FUM* sean secundarios⁶⁶.

Otras vías de señalización importantes en hongos filamentosos –asociados con virulencia y metabolismo secundario– son aquellas en las que participan las proteínas G. El gen *GBP1* de *F. verticillioides* codifica una proteína de 368 aminoácidos, con alta similitud a las proteínas G monoméricas de hongos filamentosos. El gen se expresa fuertemente durante la biosíntesis de FB1 y su mutación causa un incremento discreto (58%) en la producción de FB1, con respecto a la cepa silvestre. Se asocia con la elevada expresión de los genes *FUM1* y *FUM8* y los datos indican que *GBP1* es un regulador negativo de la biosíntesis de FB1⁵⁵.

La transducción de señales, mediada por las proteínas G heterotriméricas, también participa en la regulación de la síntesis de fumonisinas. Las cepas mutantes de *F. verticillioides* en el gen *GBB1*, que codifica la subunidad β de una proteína G heterotrimérica, producen 14 veces menos FB1 que las cepas silvestres, y en las primeras ocurre la reducción sustancial de la expresión de los genes *FUM1* y *FUM8*. Lo anterior revela que la vía de señalización en la que participa la proteína G regula positivamente la síntesis de FB1. Esta ruta de señalización podría ser específica de la síntesis de la micotoxina, ya que parámetros de desarrollo –como el crecimiento radial y la masa de micelio– no cambian con respecto a la cepa silvestre⁶⁷.

Debido a que la fosforilación/desfosforilación de proteínas es clave en la mayoría de las cascadas de señalización, también se ha estudiado el papel de proteínas fosfatases en la regulación de la biosíntesis de fumonisinas. El gen *CPP1* codifica la subunidad catalítica de la fosfatasa 2A de *F. verticillioides* y los niveles de transcripto de este gen se incrementan en las cepas mutantes que producen menos FB1. La actividad represora se confirmó, ya que cepas mutantes en este gen presentan una elevación en la expresión de genes *FUM* y de producción de FB1, con respecto a la cepa silvestre⁶⁸. Dado que las fosfatases de proteínas tienen especificidad amplia –que depende, en parte, de la subunidad regulatoria–, también se ha investigado el papel de los genes que codifican esta subunidad. El genoma de *F. verticillioides* contiene dos genes: *PPR1* y *PPR2*; ambos codifican subunidades regulatorias y el análisis de mutantes reveló funciones diferenciales entre ellas, pues solamente en la mutante *PPR2* aumenta la síntesis de FB1, similar a lo que se observa con la mutante *CPP1*. Los resultados sugieren que las dos subunidades regulatorias tienen acciones distintas, que inciden sobre el desarrollo y la producción de FB1⁶⁹.

REGULACIÓN EPIGENÉTICA DE LA SÍNTESIS DE FUMONISINAS

Como en otros eucariontes, en el control de la expresión genética del metabolismo secundario de los hongos también contribuye el estatus de la cromatina, a través de la acetilación/desacetilación de histonas. En presencia de tricostatina A –un inhibidor de la desacetilasa de histonas–, suben los niveles de transcripto de los genes *FUM1* y *FUM21* y, en menor grado, de *FUM8*, así como los de las fumonisinas. Los resultados son consistentes con el hecho de que el grado de acetilación de las histonas en los genes *FUM1* y *FUM21* es mayor en condiciones de inducción de síntesis de FB1. Lo anterior confirma que la remodelación de la cromatina juega un papel claro y diferencial en la regulación de los genes *FUM*⁷⁰.

Esta regulación epigenética también se sustenta en la función de la proteína LaeA, la que tiene actividad de metiltransferasa y contribuye al control de la biosíntesis de esterigmatocistina en *Aspergillus nidulans*⁷¹. La enzima se encuentra en el núcleo y ahí su actividad es regulada por su interacción con las proteína “velvet”, las que, a su vez, controlan el desarrollo y el metabolismo secundario, altamente conservados en hongos. En *F. verticillioides*, el homólogo *FvVE1* es esencial para la producción de las toxinas, ya que la mutación suprime por completo la síntesis de fumonisinas. Además, *FvVE1* es necesario para la expresión del gen *FUM21* y otros genes estructurales del locus *FUM*⁷².

ASOCIACIÓN ENTRE LA PRODUCCIÓN DE FB1 Y LA VIRULENCIA EN MAÍZ

Debido a que las fumonisinas se consideran metabolitos secundarios, en un principio se asumió que la FB1 se producía durante la fase tardía de la interacción *Fusarium*-maíz, es decir, en la etapa saprofítica del hongo. Sin embargo, evidencias

recientes muestran que la expresión de los genes *FUM* y la síntesis de fumonisina ocurren en los períodos tempranos de la infección *in planta*⁷³⁻⁷⁵ e, incluso, durante la fase endofítica en la plántula de maíz⁸.

El papel de la FB1 como elemento de virulencia en la infección por *F. verticillioides* se ha debatido durante muchos años. Un factor de virulencia es una molécula producida por un patógeno, el cual incrementa su capacidad para causar enfermedad al interferir con funciones específicas de la célula hospedera y, entonces, promueve la colonización del microorganismo en el tejido vegetal. Las pruebas para sustentar su papel en la virulencia son: 1) evidencias bioquímicas del efecto fitotóxico de la fumonisina en células y tejidos de maíz, y 2) evidencias genéticas que describen el fenotipo de cepas de *F. verticillioides*; estas últimas tienen una limitada o nula capacidad de producir fumonisina.

EVIDENCIAS BIOQUÍMICAS DEL PAPEL DE LA FUMONISINA EN LA VIRULENCIA

Varios trabajos documentan los efectos fitotóxicos de la FB1 en distintos tejidos de maíz y diversas etapas del desarrollo. En cultivos de callos de maíz, una dosis de FB1 13 µM causa la reducción del 50% en su crecimiento⁷⁶, y hasta 75% de inhibición en la elongación radicular de semillas de maíz durante la germinación⁷⁷. En plántulas de maíz tratadas con las concentraciones de 0.1, 1, 10 y 100 µM de FB1, la toxina provoca la disminución en la longitud de la raíz y el tallo, según la cantidad de toxina. Con las dosis más altas ocurre hasta 80% de inhibición del crecimiento de la raíz y 95% del tallo⁷⁸. La FB1, aplicada en el agua de riego a una concentración 29 µM, ocasiona la reducción del 23% en la altura del tallo y del 59% en el peso de la raíz, así como la aparición de lesiones necróticas en las hojas⁷⁴. Aparentemente, esos efectos dependen del modo de aplicación de la micotoxina, ya que cuando la FB1 se asperja en plántulas de maíz, no se observan los mismos síntomas de fitotoxicidad⁷⁹.

EVIDENCIAS GENÉTICAS DEL PAPEL DE LA FUMONISINA EN LA VIRULENCIA

Para estudiar la contribución de las fumonisinas en la virulencia de *F. verticillioides* se han utilizado cepas que varían en la producción de la toxina e, inclusive, variantes incapaces de sintetizarla. También, se han incluido cepas con una mutación en el gen *FUM1*, incapaces de generar la micotoxina.

Se aprovecha el ciclo sexual del hongo y una cruce realizada entre dos cepas: una *fum1+* con otra *fum1-*, genera una progenie con amplio rango de virulencia y de capacidad de sintetizar fumonisinas. En ensayos en plántulas de maíz, sólo las cepas productoras de fumonisina son virulentas y aquellas que no sintetizan la toxina son incapaces de infectar a las plantas⁶. Los estudios apoyan la hipótesis de que la generación de fumonisinas es necesaria para la virulencia en plántulas de maíz.

Sin embargo, su papel en la virulencia no se ha extrapolado al evaluar la pudrición del tallo. Las cepas de *F. verticillioides*, con cantidades variables de fumonisina, también causan lesiones de diversas magnitudes en el mismo tejido. Sin embargo, no existe correlación entre la capacidad de producir fumonisinas *in vitro* y la severidad de la enfermedad⁸⁰.

En otro estudio comparativo entre cepas de *F. verticillioides* que generan o no distintas fumonisinas, se evaluó la capacidad del hongo de causar infección y pudrición de mazorcas. Las cepas se inocularon por el canal estilar y todas las cepas que no producen FB1 fueron capaces de infectar y causar pudrición de manera similar a la cepa productora de las tres micotoxinas⁸¹. Del mismo modo, en un estudio distinto se comparó una cepa de *F. verticillioides* productora de FB1 con otra cepa isogénica mutante, cuya sola diferencia es que tiene interrumpido el gen *FUM1* y, por eso, no produce fumonisinas. Ensayos en campo muestran que la cepa mutante posee un comportamiento similar a la cepa silvestre en su habilidad para infectar las mazorcas y causar su pudrición. La evidencia confirma que las fumonisinas son dispensables para causar infección y pudrición de la mazorca⁸².

En contraste con el estudio anterior, la transformación con el locus completo *FUM* de cepas que no lo contienen dentro de su genoma, aporta evidencia genética robusta sobre el papel fisiológico de la fumonisina en la virulencia de *F. verticillioides*. La especie *Fusarium musae* se halla estrechamente relacionada con *F. verticillioides*, pero es incapaz de infectar el maíz y no produce fumonisina. La complementación de esta especie con una secuencia genómica que contiene el locus *FUM* íntegro genera una cepa productora de FB1 capaz de colonizar plántulas de maíz, causando todos los síntomas de la infección: lesiones necróticas, atrofia y blanqueamiento del tejido⁵⁴.

Las evidencias presentadas sugieren que las fumonisinas sí contribuyen a la virulencia en los procesos de infección y colonización de plántulas de maíz, pero son dispensables para la infección y pudrición del tallo y la mazorca. Es importante resaltar, sin embargo, que para todos los ensayos de pudrición en el tallo y la mazorca se utilizan métodos de inoculación muy agresivos, como la inyección de las conidias directamente en el tejido o a través del estigma. Lo anterior impide evaluar la capacidad del hongo patógeno para superar barreras físicas y otras respuestas inducidas de la planta hospedera. Nuevas evidencias que apoyan el papel de la FB1 en la virulencia de *F. verticillioides* son la alta incidencia de cepas toxigénicas en tejidos de maíz sintomáticos y los niveles elevados de FB1 presentes en tejidos de maíz^{83,84}.

BLANCOS MOLECULARES DE LA FUMONISINA B1

El principal modo de acción de la toxina FB1 es la inhibición de la enzima esfinganina N-acil transferasa, la cual participa en la biosíntesis *de novo* de esfingolípidos. La enzima cataliza la

reacción de condensación entre la base esfingoidea de cadena larga (BCL) esfinganina (ESN) y palmitoil Co-A, para generar ceramida; de ahí que su inhibición desencadena la acumulación de esfinganina y otras BCL⁸⁵. El incremento y el desbalance de estos lípidos bioactivos explican muchos de los efectos de la FB1 en células animales^{86,87}. En plantas, la FB1 también inhibe la esfinganina N-acil transferasa y causa acumulación de BCL⁸⁸⁻⁹⁰. Además, en maíz la FB1 tiene otros dos blancos moleculares: la ATPasa de protones de membrana plasmática⁹¹ y las β-1,3-glucanasas básicas⁷⁵. A continuación se muestran con mayor detalle estos efectos y su posible papel en la virulencia de *F. verticillioides* en maíz.

1. La esfinganina N-acil transferasa como blanco celular de la FB1

Los esfingolípidos son moléculas anfifílicas cuya estructura fundamental se conforma con una base de cadena larga (BCL), la cual es un aminoalcohol de cadena hidrocarbonada (2-amino-1,3-hidroxialcano). Hay gran diversidad en la estructura de BCLs, ya que pueden contener insaturaciones en las posiciones C4-C5 o C8-C9 y/o hidroxilación en la posición C4. Los esfingolípidos son componentes esenciales del sistema de endomembranas en plantas y otros eucariontes, pues constituyen más del 40% de los lípidos de la membrana plasmática^{92,93}. Además de proporcionar integridad estructural, la evidencia reciente revela que los esfingolípidos muestran funciones multifacéticas. Por ejemplo, se hallan enriquecidos en las balsas lipídicas o microdominios membranales –regiones de membrana altamente ordenadas, importantes para la organización y función de las proteínas de señalización en la superficie de las células vegetales, para el tráfico transmembranal y tráfico intracelular–^{94,95}. Asimismo, los esfingolípidos y sus intermediarios biosintéticos son mediadores de procesos celulares en plantas, por ejemplo, la muerte celular programada y la transducción de señales dependientes del ácido abscísico (ABA)⁹⁶⁻¹⁰⁰.

La biosíntesis *de novo* de los esfingolípidos complejos comienza con la formación de la BCL en el retículo endoplásmico a partir de la condensación de la serina con palmitoil-CoA, para formar la 3-cetoesfinganina. Esta molécula sufre una reducción y la esfinganina generada se acila con un ácido graso activado por CoA para producir ceramida. La esfinganina N-aciltransferasa, enzima blanco de la toxina FB1, cataliza la reacción. La inhibición causa la acumulación de BCL, principalmente esfinganina y fitoestigosina (PSN), que son las más abundantes en células vegetales (Figura 6). La aplicación de FB1 10 μM en embriones de maíz ocasiona el incremento de hasta seis veces en los niveles de ESN y PSN a las 48 horas, que es el mismo lapso en el que ocurren la degradación del ADN genómico, la muerte del tejido y la producción de ácido salicílico (AS). Esta última es una fitohormona que activa diferentes vías de señalización, mismas que pueden desembocar en muerte celular, como aquella que se observa en la reacción de hipersensibilidad, característica de las reacciones de defensa en las plantas. Tanto la FB1 como

la ESN y el AS inducen la activación de una nucleasa en tejidos de maíz, que puede ser la responsable de la degradación del ADN genómico durante los eventos de muerte celular. Los resultados establecen que la FB1 provoca la acumulación de BCL. Lo anterior, activa alguna vía que conduce a la muerte celular y en la que participa el AS; además, provoca la activación de diversas hidrolasas, entre ellas, la nucleasa⁸⁹. Debido a que la toxina FB1 activa vías de señalización de defensa en maíz, la inducción de éstas con la consecuente muerte celular del tejido vegetal favorece al hongo, que es un buen saprofito.

Efectos similares también suceden en plantas de maíz irrigadas con una solución de FB1 28 μM pues induce la aparición de lesiones necróticas en las hojas, reducción en el tamaño de la planta, así como de la masa radicular. De igual manera, los niveles de PSN y ESN aumentan 3 y 8 veces, respectivamente, en relación con las plantas no tratadas⁷⁴. Muchos de los efectos se reproducen cuando se inoculan las plantas de maíz con cepas de *F. verticillioides* productoras de fumonisinas. La severidad de los síntomas se correlaciona con la cantidad de FB1 detectada en la raíz, así como con los niveles de esfinganina y fitoestigosina en el tejido vegetal^{74,75,90}.

El efecto sistémico que se observa por la irrigación con FB1 o infección por *F. verticillioides* se puede explicar por qué los niveles de esfinganina y fitoestigosina, y sus derivados fosforilados, son translocados a las hojas de las plantas⁹⁰. Entonces, es posible que los síntomas –como deformación y lesiones necróticas en las hojas– se deban a la presencia y al desbalance de las BCL en este tejido. Lo anterior también explicaría por qué no se observan estos síntomas por aspersión de la micotoxina directamente en las hojas⁷⁹.

2. La ATPasa de H⁺ de membrana plasmática como blanco celular de la FB1

La ATPasa de H⁺ es una enzima membranal que transporta protones del citoplasma al apoplasto; hidroliza ATP para energizar este transporte. Su función es fundamental para mantener un potencial membranal negativo y un gradiente transmembranal de pH, el que se requiere para la elongación del tejido y otros procesos fisiológicos¹⁰¹.

La FB1 inhibe *in vitro* la actividad de la ATPasa de H⁺, aislada de vesículas de membrana plasmática de embriones de maíz con 24 horas de germinación. De acuerdo con los datos cinéticos, la inhibición es de naturaleza no competitiva y reversible con una K_i de 17.5 μM (Figura 6). Se halla asociada con dos situaciones: la disminución *in vivo* en la elongación radicular del 44% y 47% a 10 y 40 μM de FB1, respectivamente, y con la reducción de hasta el 78% en la acidificación del medio⁹¹. La inhibición de esta enzima podría contribuir a acortar la elongación de la raíz y el tallo, observada en plantas infectadas con *F. verticillioides* o tratadas con FB1.

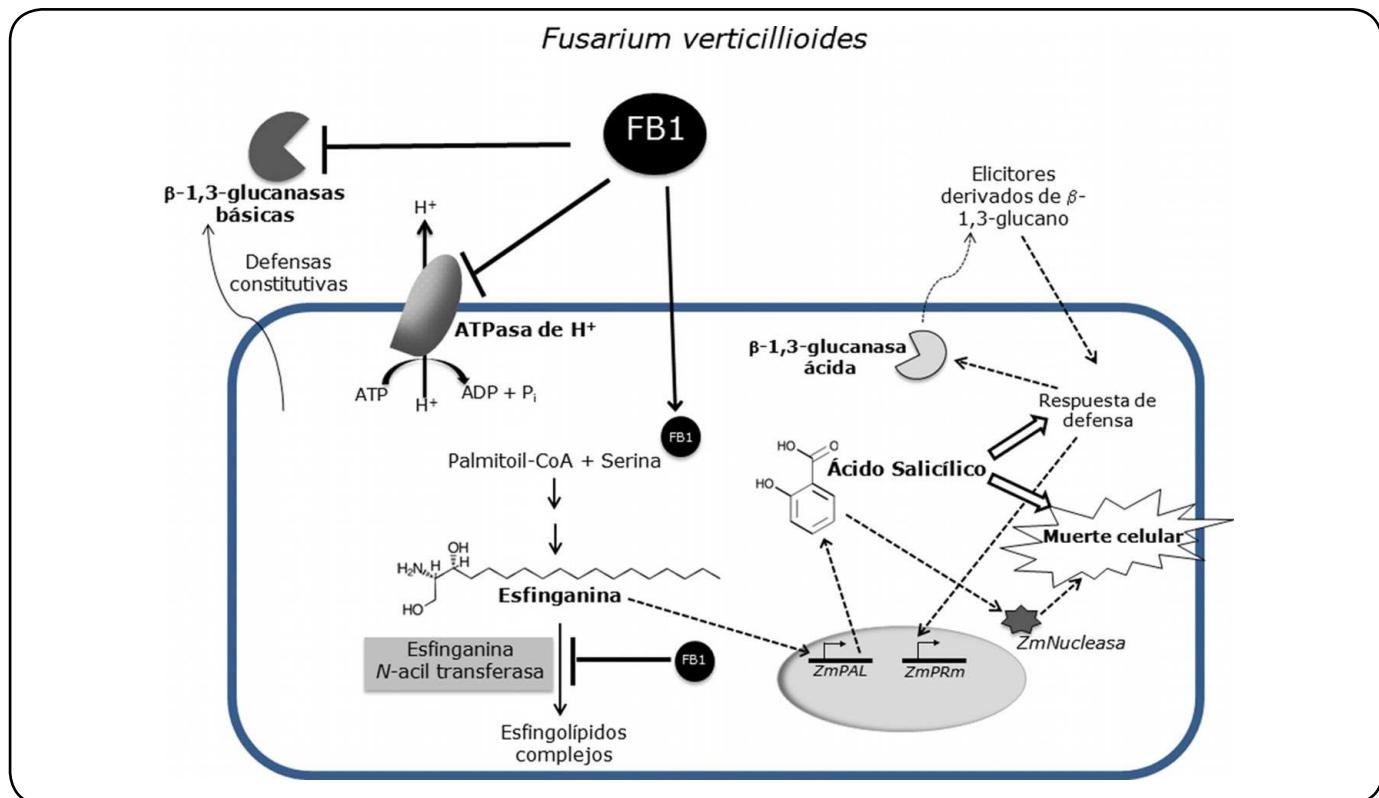


Figura 6. Blancos moleculares de la fumonisina en células de maíz. La FB1 secretada por el hongo durante la infección ejerce acción inhibitoria en tres blancos moleculares en la planta hospedera: la ATPasa de H^+ , la esfinganina N-acil transferasa y las β -1,3-glucanasas básicas. La inhibición en la esfinganina N-acil transferasa causa acumulación de BCLs que activa la vía del SA. El SA induce a su vez la actividad de una isoforma ácida de β -1,3-glucanasa, probablemente responsable de la generación de elicidores derivados del glucano. También el SA induce la actividad de nucleasas que contribuyen a la degradación del ADN genómico y muerte celular. Finalmente, la FB1 podría inhibir directamente la actividad de las isoformas básicas de β -1,3-glucanasa en el espacio extracelular facilitando la colonización. Flechas sólidas: indican activación, inducción o acumulación de compuestos o transcritos, mientras que la flecha no continua representan interacciones hipotéticas.

Además de la acidificación del espacio apoplástico, la ATPasa de H^+ también participa en la respuesta de defensa de las plantas contra microorganismos. La enzima actúa en la percepción de algunos patógenos fúngicos pues se activa en los primeros minutos posteriores al tratamiento con ciertas moléculas derivadas de hongos¹⁰². Asimismo, la ATPasa de H^+ interactúa en la membrana con otras proteínas involucradas en la respuesta de defensa¹⁰³. Debido a la importancia de la ATPasa de H^+ en la fisiología de la planta y en su defensa, constituye un blanco contra el cual varios patógenos han evolucionado para sintetizar moléculas que interfieran con su actividad¹⁰¹.

3. Las β -1,3-glucanasas como blanco celular de la FB1

Las β -1,3-glucanasas son enzimas con actividad hidrolítica que se inducen durante la respuesta de defensa de las plantas, principalmente ante el ataque de hongos filamentosos. El blanco de las enzimas es el glucano, el polisacárido estructural más

importante de la pared celular fúngica, que representa entre el 50%-60% del peso seco. Además de esta actividad que inhibe el crecimiento del hongo, las glucanasas liberan de la pared celular oligosacáridos que actúan como elicidores y activan respuestas de defensa^{104,105}.

La fumonisina B1 modula la actividad de tres β -1,3-glucanasas de maíz mediante dos mecanismos independientes (Figura 6). Experimentos *in vitro* demuestran que la FB1 exógena inhibe la actividad de dos β -1,3-glucanasas básicas con una IC_{50} de 53 μ M. *In vivo*, la FB1 induce la actividad de una β -1,3-glucanasa ácida. Esta misma enzima se activa también con un análogo del ácido salicílico (AS). Lo anterior sugiere que una vía de señalización, mediada por el AS, se induce con la FB1, probablemente precedida por la acumulación de bases esfingoideas. La infección por *F. verticillioides* en tejidos de maíz causa efectos similares en la actividad de las β -1,3-glucanasas ácidas y básicas, que se correlacionan con la expresión de genes *FUM* y la producción de FB1 *in vivo*⁷⁵.

CONCLUSIONES

De acuerdo con la evidencia generada hasta ahora, es razonable deducir que la FB1 es un factor de virulencia de *F. verticillioides*: existe una relación positiva entre el desarrollo de síntomas en plántulas de maíz, la presencia de la toxina y la acumulación de BCL. La FB1 inhibe la biosíntesis *de novo* de esfingolípidos y genera el desbalance en los niveles endógenos de estos importantes metabolitos, específicamente, en la acumulación de bases esfingoideas de cadena larga. Lo anterior conduce a cascadas de señalización que derivan en muerte celular, por lo que *F. verticillioides* puede tomar ventaja para proliferar en un estado parasítico. La FB1 tiene blancos moleculares en diferentes compartimentos celulares, hecho que podría ser suficiente para generar un escenario en el cual las respuestas de defensa de la planta son suprimidas o evadidas, facilitando la colonización del hongo necrótrofo.

AGRADECIMIENTOS

El trabajo de investigación del autor responsable Javier Plasencia está apoyado por el Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (Convenio IMIC). Asimismo, se agradece el apoyo de los proyectos CONACYT (50503-Z) y DGAPA-PAPIIT (IN220010). Se agradece al Mtro. Felipe de la Torre por la elaboración de la Figura 2.

REFERENCIAS

1. Deacon, J.W. Modern Mycology (Blackwell, Boston, 1997).
2. Leslie, J.F & Summerell, B.A. The *Fusarium* Laboratory Manual (Blackwell Publishing, Ames, 2006). 1st Edition.
3. Wollenweber, H. & Reinking, O.A. Die *Fusarien*, ihre Beschreibung, Schadwirkung und Bekämpfung (Paul Parey, Berlin, 1935).
4. Nelson, P.E., Toussoun, T.A. & Marasas, W.F.O. *Fusarium* species: An illustrated manual for identification (The Pennsylvania State University Press, Pennsylvania, 1983).
5. Kedera, C.J., Leslie, J.F. & Claflin, L.E. Genetic diversity of *Fusarium* Section Liseola (*Gibberella fujikuroi*) in individual maize stalks. *Phytopathology* **84**, 603-607 (1994).
6. Desjardins, A.E., Plattner, R.D., Nelson, T.C. & Leslie, J.F. Genetic analysis of fumonisin production and virulence of *Gibberella fujikuroi* mating population A (*Fusarium moniliforme*) on maize (*Zea mays*) seedlings. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 79-86 (1995).
7. Duncan, K.E. & Howard, R.J. Biology of maize kernel infection by *Fusarium verticillioides*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **23**, 6-16 (2010).
8. Bacon, C.W., Yates, I.E., Hinton, D.M. & Meredith, F. Biological control of *Fusarium moniliforme* in maize. *Environ. Health Persp.* **109**, 325-332 (2001).
9. Torres, M.R., Ramos, A.J., Soler, J., Sanchis, V. & Marín, S. SEM study of water activity and temperature effects on the initial growth of *Aspergillus ochraceus*, *Alternaria alternata* and *Fusarium verticillioides* on maize grain. *Int. J. Food Microbiol.* **81**, 185-193 (2003).
10. Samapundo, S., De Meulenaer, B., Atukwase, A., Debevere, J. & Devlieghere, F. The influence of modified atmospheres and their interaction with water activity on the radial growth and fumonisin B1 production of *Fusarium verticillioides* and *F. proliferatum* on corn. Part I: The effect of initial headspace oxygen concentration. *Int. J. Food Microbiol.* **114**, 160-167 (2007).
11. Murillo, I., Cavallarin, L. & San Segundo, B. Cytology of infection of maize seedlings by *Fusarium verticillioides* and immunolocalization of the pathogenesis-related PRms protein. *Phytopathology* **89**, 737-747 (1999).
12. Oren, L., Ezrati, S., Cohen, D. & Sharon, A. Early events in the *Fusarium verticillioides* maize interaction characterized by using green fluorescent protein-expressing transgenic isolate. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 1695-1701 (2003).
13. Munkvold, G.P., McGee, D.C. & Cariton, W.M. Importance of different pathways for maize kernel infection by *Fusarium moniliforme*. *Phytopathology* **87**, 209-217 (1997).
14. Gilbertson, R.L., Brown, M. Jr., Ruppel, E.G. & Capinera, J.L. Association of corn stalk rot *Fusarium* spp. and western corn rootworm beetles in Colorado. *Phytopathology* **76**, 1309-1314 (1986).
15. Munkvold, G.P. & Desjardins, A.E. Fumonisins in Maize. Can we reduce their occurrence? *Plant Dis.* **81**, 556-565 (1997).
16. Farrar, J.J. & Davis, R.M. Relationships among ear morphology, western flower thrips and *Fusarium* ear rot of corn. *Phytopathology* **81**, 661-666 (1991).
17. Rabie, C.J., Marasas, W.F.O., Thiel, P.G., Lübben, A. & Vleggaar, R. Moniliformin production and toxicity of different *Fusarium* species from Southern Africa. *Appl. Environ. Microbiol.* **43**, 517-521 (1982).
18. Bacon, C.W., Marijanovic, D.R., Norred, W.P. & Hinton, D.M. Production of fusarin C on cereal and soybean by *Fusarium moniliforme*. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**, 2745-2748 (1989).
19. Bacon, C.W., Porter, J.K., Norred, W.P. & Leslie, J.F. Production of fusaric acid by *Fusarium* species. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 4039-4043 (1996).
20. Desjardins, A.E. *Fusarium* mycotoxins: chemistry, genetics and biology (American Phytopathological Society, St. Paul, MN, 2006).
21. Reddy, K.R.N. et al. Mycotoxin contamination of commercially important agricultural commodities. *Toxin Rev.* **28**, 154-168 (2009).
22. Reddy, K.R.N. et al. An overview of mycotoxin contamination in foods and its implications for human health. *Toxin Rev.* **29**, 23-26 (2010).
23. Gelderblom, W.C. et al. Fumonisins--novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 1806-1811 (1988).
24. Bezuidenhout, S. C. et al. Structure elucidation of the fumonisins, mycotoxins from *Fusarium moniliforme*. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **11**, 743-745 (1988).
25. Bartók, T., Szécsi, A., Szekeres, A., Mesterházy, A. & Bartók, M. Detection of new fumonisin mycotoxins and fumonisin-like compounds by reversed-phase high-performance liquid chromatography/electrospray ionization ion trap mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* **20**, 2447-2462 (2006).
26. Rheeder, J.P., Marasas, W.F.O. & Vismer, H.F. Production of fumonisin analogs by *Fusarium* species. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 2101-2105 (2002).
27. Marín, S.V., Sanchis-Vinas, I., Canela, R. & Magan, N. Effect on water activity and temperature on growth and fumonisin B1 and B2 production by *Fusarium proliferatum* and *F. moniliforme*

- in grain. *Lett. Appl. Microbiol.* **21**, 298-301 (1995).
28. Proctor, R.H., Plattner, R.D., Desjardins, A.E., Busaman, M. & Butchko, R. Fumonisin production in the maize pathogen *Fusarium verticillioides*: genetic basis of naturally occurring chemical variation. *J. Agric. Food Chem.* **54**, 2424-2430 (2006).
29. Proctor, R.H., Desjardins, A.E., Plattner, R.D. & Hohn, T.M. A polyketide synthase gene required for biosynthesis of fumonisin mycotoxins in *Gibberella fujikuroi* mating population A. *Fungal Genet. Biol.* **27**, 100-112 (1999).
30. Proctor, R.H., Brown, D.W., Plattner, R.D. & Desjardins, A.E. Co-expression of 15 contiguous genes delineates a fumonisin biosynthetic gene cluster in *Gibberella moniliformis*. *Fungal Genet. Biol.* **38**, 237-249 (2003).
31. Seo, J.A., Proctor, R.H. & Plattner, R.D. Characterization of four clustered and coregulated genes associated with fumonisin biosynthesis in *Fusarium verticillioides*. *Fungal Genet. Biol.* **34**, 155-165 (2001).
32. Du, L. et al. Biosynthesis of sphinganine-analog mycotoxins. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **35**, 455-464 (2008).
33. Huffman, J., Gerber, R. & Du, L. Recent advancements in the biosynthetic mechanisms for polyketide-derived mycotoxins. *Biopolymers* **93**, 764-776 (2010).
34. Thiel, P.G. et al. Survey of fumonisin production by *Fusarium* species. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 1089-1093 (1991).
35. Desjardins, A.E., Plattner, R.D. & Nelson, P.E. Fumonisin production and other traits of *Fusarium moniliforme* strains from maize in northeast Mexico. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 1695-1697 (1994).
36. Ghiasian, S.A. et al. Fumonisin production by *Fusarium* species isolated from freshly harvested corn in Iran. *Mycopathologia* **159**, 31-40 (2005).
37. Sánchez-Rangel, D., SanJuan-Badillo, A. & Plasencia, J. Fumonisin production by *Fusarium verticillioides* strains isolated from maize in México and development of a polymerase chain reaction to detect potential toxicogenic strains in grains. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 8565-8571 (2005).
38. van der Walt, A.M. et al. Fumonisin-producing *Fusarium* strains and fumonisins in traditional African vegetables (morogo). *South African J. Sci.* **102**, 151-155 (2006).
39. Prom, L.K., Isakeit, T., Wheeler, M., Puckhaber, L.S. & Liu, J. Mycotoxicigenic potential of ten *Fusarium* species grown on sorghum and *in vitro*. *Plant Pathol. J.* **7**, 183-186 (2008).
40. Wang, J., Wang, X., Zhou, Y., Du, L. & Wang, Q. Fumonisin detection and analysis of potential fumonisin-producing *Fusarium* spp. in asparagus (*Asparagus officinalis* L.) in Zhejiang Province of China. *J. Sci. Food Agric.* **90**, 836-842 (2010).
41. Goertz, A. et al. *Fusarium* species and mycotoxin profiles on commercial maize hybrids in Germany. *Eur. J. Plant Pathol.* **128**, 101-111 (2010).
42. Nayaka, S.C. et al. Detection and quantification of fumonisins from *Fusarium verticillioides* in maize grown in southern India. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **26**, 71-78 (2010).
43. Ono, E.Y.S. et al. *Fusarium verticillioides* strains isolated from corn feed: characterization by fumonisin production and RAPD Fingerprinting. *Braz. Arch. Biol. Technol.* **53**, 953-960 (2010).
44. Jurado, M. et al. Genetic variability and fumonisin production by *Fusarium proliferatum*. *Food Microbiol.* **27**, 50-57 (2010).
45. de Oliveira Rocha, L. et al. Molecular characterization and fumonisin production by *Fusarium verticillioides* isolated from corn grains of different geographic origins in Brazil. *Int. J. Food Microbiol.* **145**, 9-21 (2011).
46. Covarelli, L. et al. Characterization of *Fusarium verticillioides* strains isolated from maize in Italy: fumonisin production, pathogenicity and genetic variability. *Food Microbiol.* **31**, 17-24 (2012).
47. Atukwase, A., Muy, C. & Kaaya, A.N. Potential for fumonisin production by strains of *Gibberella fujikuroi* species complex isolated from maize produced in Uganda. *J. Biol. Sci.* **12**, 225-231 (2012).
48. Uhlig, S. et al. Identification of early fumonisin biosynthetic intermediates by inactivation of the *FUM6* gene in *Fusarium verticillioides*. *J. Agric. Food Chem.* **60**, 10293-10301 (2012).
49. Butchko, R.A., Plattner, R.D. & Proctor, R.H. *FUM13* encodes a short chain dehydrogenase/reductase required for C-3 carbonyl reduction during fumonisin biosynthesis in *Gibberella moniliformis*. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 3000-3006 (2003).
50. Blackwell, B.A., Edwards, O.E., Fruchier, A., ApSimon, J.W. & Miller, J.D. NMR structural studies of fumonisin B1 and related compounds from *Fusarium moniliforme*. *Adv. Exp. Med. Biol.* **392**, 75-91 (1996).
51. Bojja, R.S., Cerny, R.L., Proctor, R.H. & Du, L. Determining the biosynthetic sequence in the early steps of the fumonisin pathway by use of three gene-disruption mutants of *Fusarium verticillioides*. *J. Agric. Food Chem.* **19**, 2855-2860 (2004).
52. Stergiopoulos, I., Zwiers, L.H. & De Waard, M.A. Secretion of natural and synthetic toxic compounds from filamentous fungi by membrane transporters of the ATP-binding cassette and major facilitator superfamily. *Europ. J. Plant Pathol.* **108**, 719-734 (2002).
53. Brown, D.W., Butchko, R.A., Busman, M. & Proctor, R.H. The *Fusarium verticillioides* FUM gene cluster encodes a Zn(II)2Cys6 protein that affects FUM gene expression and fumonisin production. *Eukaryot. Cell* **6**, 1210-1218 (2007).
54. Glenn, A.E., et al. Transformation mediated complementation of a FUM gene cluster deletion in *Fusarium verticillioides* restores both fumonisin production and pathogenicity on maize seedlings. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **21**, 87-97 (2008).
55. Sagaram, U.S., Butchko, R.A.E. & Shim, W.B. The putative monomeric G-protein GBP1 is negatively associated with fumonisin B1 production in *Fusarium verticillioides*. *Mol. Plant Pathol.* **7**, 381-389 (2006).
56. Picot, A., et al. Factors of the *Fusarium verticillioides*-maize environment modulating fumonisin production. *Crit. Rev. Microbiol.* **36**, 221-231 (2010).
57. Flaherty, J.E., Pirtil, A.M., Bluhm, B.H. & Woloshuk, C.P. PAC1, a pH regulatory gene from *Fusarium verticillioides*. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 5222-5227 (2003).
58. Bluhm, B.H. & Woloshuk, C.P. Amylopectin induces fumonisin B1 production by *Fusarium verticillioides* during colonization of maize kernels. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **18**, 1333-1339 (2005).
59. Kim, H. & Woloshuk, C.P. Role of AREA, a regulator of nitrogen metabolism, during colonization of maize and fumonisin biosynthesis in *Fusarium verticillioides*. *Fungal Genet. Biol.* **45**, 947-953 (2008).
60. Kim, H., Smith, J.E., Ridenour, J.B., Woloshuk, C.P. & Bluhm, B.H. *HXK1* regulates carbon catabolism, sporulation, fumonisin B1 production and pathogenesis in *Fusarium verticillioides*. *Microbiology* **157**, 2658-2669 (2011).

61. Bluhm, B.H., Kim, H., Butchko, R.A. & Woloshuk, C.P. Involvement of *ZFR1* of *Fusarium verticillioides* in kernel colonization and the regulation of *FST1*, a putative sugar transporter gene required for fumonisin biosynthesis on maize kernels. *Mol. Plant Pathol.* **9**, 203–211 (2008).
62. Flaherty, J.E. & Woloshuk, C.P. Regulation of fumonisin biosynthesis in *Fusarium verticillioides* by a zinc binuclear cluster-type gene, *ZFR1*. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 2653–2659 (2004).
63. Malapi-Wight, M., Smith, J., Campbell, J., Bluhm, B.H. & Shim, W.B. Sda1, a Cys2-His2 Zinc finger transcription factor, is involved in polyol metabolism and fumonisin B1 production in *Fusarium verticillioides*. *PLoS ONE* **8**, e67656 (2013).
64. Montis, V., Pasquali, M., Visentin, I., Karlovsky, P. & Cardinale, F. Identification of a *cis*-acting factor modulating the transcription of *FUM1*, a key fumonisin-biosynthetic gene in the fungal maize pathogen *Fusarium verticillioides*. *Fungal Genet. Biol.* **51**, 42–49 (2013).
65. Shim, W.B. & Woloshuk, C.P. Regulation of fumonisin B1 biosynthesis and conidiation in *Fusarium verticillioides* by a cyclin-like (C-type) gene, *FCC1*. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 1607–1612 (2001).
66. Bluhm, B.H. & Woloshuk, C.P. Fck1, a C-type cyclin-dependent kinase, interacts with Fcc1 to regulate development and secondary metabolism in *Fusarium verticillioides*. *Fungal Genet. Biol.* **43**, 146–154 (2006).
67. Sagaram, U.S. & Shim, W.B. *Fusarium verticillioides GBB1*, a gene encoding heterotrimeric G protein B subunit, is associated with fumonisin B1 biosynthesis and hyphal development but not with fungal virulence. *Mol. Plant Pathol.* **8**, 375–384 (2007).
68. Choi, Y.E. & Shim, W.B. Functional characterization of *Fusarium verticillioides* CPP1, a gene encoding a putative protein phosphatase 2A catalytic subunit. *Microbiology* **154**, 326–336 (2008).
69. Shin, J.H. et al. Protein phosphatase 2A regulatory subunits perform distinct functional roles in the maize pathogen *Fusarium verticillioides*. *Mol. Plant Pathol.* **14**, 518–529 (2013).
70. Visentin, I. et al. Transcription of genes in the biosynthetic pathway for fumonisin mycotoxins is epigenetically and differentially regulated in the fungal maize pathogen *Fusarium verticillioides*. *Euk. Cell* **11**, 252–259 (2012).
71. Bayram, O. & Braus, G.H. Coordination of secondary metabolism and development in fungi: the velvet family of regulatory proteins. *FEMS Microbiol. Rev.* **36**, 1–24 (2012).
72. Myung, K., et al. FvVE1 regulates biosynthesis of the mycotoxins fumonisins and fusarins in *Fusarium verticillioides*. *J. Agric. Food Chem.* **57**, 5087–5094 (2009).
73. Williams, L.D., Glenn, A.E., Bacon, C.W., Smith, M.A. & Riley, R.T. Fumonisin production and bioavailability to maize seedlings grown from seeds inoculated with *Fusarium verticillioides* and grown in natural soils. *J. Agric. Food Chem.* **54**, 5694–5700 (2006).
74. Williams, L.D., et al. Fumonisin disruption of ceramide biosynthesis in maize roots and the effects on plant development and *Fusarium*. *J. Agric. Food Chem.* **55**, 2937–2946 (2007).
75. Sánchez-Rangel, D., Sánchez-Nieto, S. & Plasencia, J. Fumonisin B1, a toxin produced by *Fusarium verticillioides*, modulates maize β-1,3glucanase activities involved in defense response. *Planta* **235**, 965–978 (2012).
76. vanAsch, M.A.J., Rijkenberg, F.H.J. & Coutinho, T.A. Phytotoxicity of fumonisin B1, moniliformin, and T-2 toxin to corn callus cultures. *Phytopathology* **82**, 1330–1332 (1992).
77. Doeblert, D.C., Knutson, C.C. & Vesonder, R.F. Phytotoxic effects of fumonisin B1 on maize seedling growth. *Mycopathologia* **127**, 117–121 (1994).
78. Lamprecht, S.C., et al. Phytotoxicity of fumonisins and TA-toxin to corn and tomato. *Phytopathology* **84**, 383–391 (1994).
79. Abbas, H.K. & Boyette, C.D. Phytotoxicity of fumonisin B1 on weed and crop species. *Weed Technol.* **6**, 548–552 (1992).
80. Jardine, D.J. & Leslie, J.F. Aggressiveness to mature maize plants of *Fusarium* strains differing in ability to produce fumonisin. *Plant Dis.* **83**, 690–693 (1999).
81. Desjardins, A.E. & Plattner, R.D. Fumonisin B1-nonproducing strains of *Fusarium verticillioides* cause maize (*Zea mays*) ear infection and ear rot. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 5773–5780 (2000).
82. Desjardins, A.E., Munkvold, G.P., Plattner, R.D. & Proctor, R.H. *FUM1*—a gene required for fumonisin biosynthesis but not for maize ear rot and ear infection by *Gibberella moniliformis* in field tests. *Mol. Plant-Microbe Int.* **15**, 1157–1164 (2002).
83. Desjardins, A.E. & Plattner, R.D. Distribution of fumonisins in maize ears infected with strains of *Fusarium moniliforme* that differ in fumonisin production. *Plant Dis.* **82**, 953–958 (1998).
84. Nascimento, V., et al. Characterization and genetic variability of *Fusarium verticillioides* strains isolated from corn and sorghum in Brazil based on fumonisins production, microsatellites, mating type locus, and mating crosses. *Can. J. Microbiol.* **52**, 798–804 (2006).
85. Wang, E., Norred, W.P., Bacon, C.W., Riley, R.T. & Merrill, A.H. Jr. Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins. *J. Biol. Chem.* **266**, 14486–14490 (1991).
86. Ryland, L.K., Fox, T.E., Liu, X., Loughran, T.P. & Kester, M. Dysregulation of sphingolipid metabolism in cancer. *Cancer Biol. Ther.* **11**, 138–149 (2011).
87. Hla, T. & Dannenberg, A.J. Sphingolipid signaling in metabolic disorders. *Cell Metabol.* **16**, 420–434 (2012).
88. Abbas, H.K., et al. Fumonisin- and AAL-toxin-induced disruption of sphingolipid metabolism with accumulation of free sphingoid bases. *Plant Physiol.* **106**, 1085–1093 (1994).
89. de la Torre-Hernández, M.E., Rivas-San Vicente, M., Greaves-Fernández, N., Cruz-Ortega, R. & Plasencia, J. Fumonisin B1 induces nuclease activation and salicylic acid accumulation through long-chain sphingoid base build-up in germinating maize. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **74**, 337–345 (2010).
90. Zitomer, N.C., et al. Translocation of sphingoid bases and their 1-phosphates, but not fumonisins, from roots to aerial tissues of maize seedlings watered with fumonisins. *J. Agric. Food Chem.* **58**, 7446–7481 (2010).
91. Gutiérrez-Nájera, N., et al. Fumonisin B1, a sphingoid toxin, is a potent inhibitor of the plasma membrane H⁺-ATPase. *Planta* **221**, 589–596 (2005).
92. Sperling, P., Franke, S., Luthje, S. & Heinz, E. Are glucocerebrosides the predominant sphingolipids in plant plasma membranes? *Plant Physiol. Biochem.* **43**, 1031–1038 (2005).
93. Chen, M., Cahoon, E.B., Saucedo-García, M., Plasencia, J. & Gavilanes-Ruiz, M. Plant sphingolipids: structure, synthesis

- and function. In: Wada, H., Murata, N., eds. Lipids in photosynthesis: essential and regulatory functions. (2009). Dordrecht, the Netherlands Springer; 77-115.
94. Mongrand, S., et al. Lipid rafts in higher plant cells: purification and characterization of Triton X-100-insoluble microdomains from tobacco plasma membrane. *J. Biol. Chem.* **279**, 36277–36286 (2004).
95. Borner, G.H., et al. Analysis of detergent-resistant membranes in *Arabidopsis*. Evidence for plasma membrane lipid rafts. *Plant Physiol.* **137**, 104–116 (2005).
96. Ng, C.K. & Hetherington, A.M. Sphingolipid-mediated signalling in plants. *Ann. Bot.* **88**, 57–65 (2001).
97. Coursol, S., Fan, L.M., LeStunff, H., Spiegel, S., Gilroy, S., Assman, S.M. Sphingolipid signalling in *Arabidopsis* guard cells involves heterotrimeric G proteins. *Nature* **423**, 651–654 (2003).
98. Townley, H.E., McDonald, K., Jenkins, G.I., Knight, M.R. & Leaver, C.J. Ceramides induce programmed cell death in *Arabidopsis* cells in a calcium-dependent manner. *Biol. Chem.* **386**, 161-166 (2005).
99. Pata, M.O., Hannun, Y.A. & Ng, C.K.Y. Plant sphingolipids: decoding the enigma of the Sphinx. *New Phytol.* **185**, 611–630 (2010).
100. Saucedo-García, M., et al. MPK6, sphinganine and LCB2a gene from serine palmitoyltransferase are required in the signaling pathway that mediates cell death induced by long chain bases in *Arabidopsis*. *New Phytol.* **191**, 943-957 (2011).
101. Elmore, J.M. & Coaker, G. The role of plasma membrane H⁺-ATPase in plant-microbe interactions. *Mol. Plant.* **4**, 416-427 (2011).
102. Vera-Estrella, R., Barkla, B.J. Higgins, V.J. & Blumwald, E. Plant defense response to fungal pathogens (activation of host-plasma membrane H⁺-ATPase by elicitor-induced enzyme dephosphorylation). *Plant Physiol.* **104**, 209-215 (1994).
103. Liu, J. et al. RIN4 functions with plasma membrane H⁺-ATPases to regulate stomatal apertures during pathogen attack. *PLoS Biol.* **7**, e1000139 (2009).
104. Ferreira, R. et al. The role of plant defence proteins in fungal pathogenesis. *Mol. Plant Pathol.* **8**, 677-700 (2007).
105. Leubner-Metzger, G. & Meins, F. Functions and regulation of plant β -1,3-glucanases (PR-2) in Pathogenesis-related proteins in plants (eds. in Datta, S.K. & Muthukrishnan, S.) 49–76 (CRC Press, Boca Raton, 1999).