



00346  
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

20

EFFECTO DE LA MICOTOXINA FUMONISINA B<sub>1</sub>  
SOBRE LA EXPRESION DE GENES RELACIONADOS  
CON LA RESPUESTA DE HIPERSENSIBILIDAD EN  
EJES EMBRIONARIOS DE MAIZ DURANTE LA  
GERMINACION

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE  
MAESTRA EN CIENCIAS  
(BIOLOGIA CELULAR)  
P R E S E N T A  
ANDREA SANJUAN BADILLO

291292

DIRECTOR DE TESIS: DR. FRANCISCO JAVIER PLASENCIA DE LA PARFA



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Este trabajo fue realizado bajo la dirección del Dr. F. Javier Plasencia de la Parra en el Laboratorio 101 del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química (UNAM) y en el laboratorio 206 Sur de Fisiología Celular (UNAM).

El trabajo de tesis fue financiado por los proyectos DGAPA IN204097, CONACYT 25131-B y DGAPA IN208300. La Bióloga Andrea Sanjuan Badillo recibió beca tesis del proyecto DGAPA IN204097 para el primer año y de CONACYT 25231-B para el segundo año.

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Máxima Casa de Estudios, la UNAM, por prestarme todos los servicios para elaborar esta tesis.

Al Dr. F. Javier Plasencia, por ayudarme en la realización de este trabajo y por tenerme tanta paciencia.

A mi madre, Celia Badillo Hernández, que siempre me ha enseñado el cariño a la vida, a mi misma y a las cosas que hago; por que siempre ha sido un ejemplo de lucha, constancia y trabajo, animándome a concluir esta parte de mi vida, gracias mami.

A mi padre, por el apoyo en la realización de este proyecto.

A la Dra. Rocío Cruz Ortega por su amistad y por que en un momento crítico de mi trabajo me acobijo en su laboratorio.

A Nora A. Gutiérrez Najera por estar siempre dispuesta a ayudarme y a discutir varias cosas acerca de este trabajo y criticar el mismo.

A mis compañeros de laboratorio Luis, Fabi, Manuela, Chelo, Maru y a Sobeida Sanchez Nieto por todos los desvarios de animo por los cuales pase y que a ellos les toco aguantar.

A Tere, Gaby y Toni, estudiantes de Rocío, por que siempre me tendieron la mano en mi estancia en su laboratorio.

A mis compañeras de generación Susana Reyes y Jaquelina Hernández con las cuales pase desveladas, alegrías, tragos amargos y por que siempre estuvieron dispuestas a ayudarme durante la maestría.

A mis hermanos Verónica, Pedro y Martha por que sin su ayuda no habría llegado hasta donde estoy.

A mi hermano Jesús por que una vez más confirmo que siempre, pero siempre me tendrá paciencia y siempre estará ahí cuando lo necesite.

A Jorge, aunque hay cosas que va a pagar muy caro.

Dedico este trabajo a tres personas que son muy importantes en mi vida. Por que en la elaboración del mismo pensaba mucho en ustedes, por que espero que siempre persigan la felicidad y se superen en cualquier cosa que decidan hacer, por que este trabajo sea un aliciente en sus vidas:

Para ustedes Eli, Yeni y Edgar

# RESUMEN

En las interacciones planta-patógeno ocurren un gran número de eventos celulares y moleculares que constituyen la respuesta de la planta al ataque de un microorganismo patógeno con la finalidad de evitar la invasión. Dentro de estas respuestas se encuentran el refuerzo de la pared celular, la inducción de genes que codifican para enzimas líticas, síntesis de compuestos antimicrobianos y generación de especies reactivas de oxígeno.

*Fusarium moniliforme* es un hongo patógeno importante de maíz (*Zea mays* L.) debido a su ubicuidad y su capacidad para infectar varias partes de la planta, reduciendo gran parte de la producción del cultivo. Una de las características principales de este hongo es su capacidad de producir micotoxinas, que se han asociado con ciertas enfermedades en plantas así como en animales y humanos al consumir granos contaminados. Una de las micotoxinas producida por *F. moniliforme* es la fumonisina B1 que es una cadena larga hidrocarbonada con dos grupos metilo, tres grupos hidroxilo, dos ácidos propantricarboxílicos y un grupo amino; esta toxina inhibe la ceramida sintasa en la vía de biosíntesis de esfingolípidos resultando en un aumento en la concentración de bases esfingoideas libres en la célula.

El objetivo de este trabajo fue estudiar los efectos de la FB1 sobre la expresión de genes de defensa en ejes embrionarios de dos variedades de maíz durante la germinación.

Un primer ensayo se realizó para determinar el efecto de la FB1 (10  $\mu$ M) midiendo la elongación radicular en la germinación de ejes embrionarios, donde se observó una inhibición del crecimiento de la radícula en un 68 y 38% para Chalqueño y el Híbrido H-355 respectivamente. La FB1 afectó diferencialmente la expresión de los genes de defensa en las dos variedades de maíz que se probaron. Se encontró inducción de la glicoproteína rica en hidroxiprolina (HRGP) en la variedad Chalqueño durante la germinación observándose un máximo del transcrito a las 12 horas. En contraste el gen de la fenilalanina amonio liasa (PAL), una enzima clave en la producción de fitoalexinas y lignina que se expresa desde las 12 hasta las

48 horas se encontró una represión de la expresión en presencia de la FB1. El mismo efecto se observó en las primeras 12 horas de germinación en el maíz híbrido pero a las 48 horas se observó una inducción causada por FB1. Se encontró una inducción en la expresión del gen de la quitinasa tanto en el maíz Chalqueño como en el híbrido, sin embargo, para el gen de la glucanasa, el cual se ha reportado que se co-expresa con el de la quitinasa en varias interacciones planta-patógeno no se encontró una inducción. No se encontró expresión del gen de la catalasa en los tiempos estudiados por lo que no se pudo estudiar el efecto de la toxina.

La expresión diferencial de genes de defensa en ejes embrionarios de maíz germinando en presencia de FB1 y el modo de acción de la toxina sobre el metabolismo de esfingolípidos sugiere que éstos podrían participar en la regulación de la expresión génica. Tanto las bases esfingoideas, cuya concentración celular aumenta, como la ceramida que probablemente disminuye, son reguladores de diversos eventos celulares en mamíferos y levaduras y podrían así mismo, tener una función regulatoria en células de plantas.

# INDICE

RESUMEN .....	I
INDICE.....	III
ABREVIATURAS.....	VII
I. INTRODUCCIÓN .....	1
1. MAÍZ.....	1
1.1. <i>Importancia de la producción de maíz</i> .....	1
1.2. <i>Taxonomía del maíz</i> .....	4
1.3. <i>Morfología de la planta</i> .....	5
1.4. <i>Estructura de la semilla</i> .....	6
1.5. <i>Embriogénesis</i> .....	10
1.6. <i>Germinación</i> .....	11
1.6.1. <i>Absorción del agua</i> .....	11
1.6.2. <i>Respiración</i> .....	12
1.6.3. <i>Síntesis de ARNm durante la germinación</i> .....	14
1.6.4. <i>Síntesis de ARNr y ARNt durante la germinación</i> .....	15
1.6.5. <i>Biosíntesis de proteínas</i> .....	16
2. HONGOS FITOPATÓGENOS .....	17
2.1. <i>Hongos patógenos de la semilla de maíz</i> .....	17
2.2. <i>Fusarium moniliforme</i> .....	19
2.3. <i>Ciclo de vida de Fusarium moniliforme y toxinas</i> .....	20
3. INTERACCIÓN PLANTA-PATÓGENO .....	23
3.1. <i>Reconocimiento planta-patógeno</i> .....	24

3.2. <i>Mecanismos de Defensa</i> .....	25
3.2.1. Respuesta Hipersensible .....	25
3.2.2. Especies reactivas de oxígeno .....	26
3.2.3. Refuerzo de la pared celular.....	27
3.2.4. Proteínas RP y otras proteínas relacionadas con la defensa .....	29
3.2.5. Fitoalexinas .....	29
3.3. <i>Mecanismos de señalización</i> .....	30
3.3.1. MAPKs en la transducción de señales.....	30
3.3.2. Ácido salicílico.....	31
<b>4. PROTEÍNAS INVOLUCRADAS EN LA RESPUESTA DE DEFENSA A PATÓGENOS</b> .....	<b>34</b>
4.1. <i>Glicoproteínas ricas en hidroxiprolina</i> .....	34
4.2. <i>Fenilalanina amonio liasa</i> .....	36
4.3. <i>Catalasas</i> .....	37
4.4. <i>Proteínas relacionadas con la patogénesis</i> .....	39
4.4.1. Quitinasas .....	39
4.4.2. Glucanasas.....	41
<b>II. ANTECEDENTES</b> .....	<b>43</b>
<b>1. FUMONISINA B1</b> .....	<b>43</b>
1.1. <i>Características de la molécula</i> .....	43
1.2. <i>Efectos de la FB1 a nivel molecular en células animales</i> .....	44
1.3. <i>Efectos de la FB1 en animales y humanos</i> .....	45
1.4. <i>Efectos fitotóxicos de la fumonisina B1</i> .....	47
1.5. <i>Incidencia de Fumonisina B1 en maíz</i> .....	48
<b>III. OBJETIVOS</b> .....	<b>49</b>
<b>IV. HIPÓTESIS</b> .....	<b>50</b>
<b>V. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	<b>51</b>
<i>Material Biológico</i> .....	51

<i>Imbibición</i> .....	51
<i>Extracción de ARN</i> .....	51
<i>Cuantificación espectrofotométrica de ARN</i> .....	52
<i>Integridad y Calibración del ARN</i> .....	53
<i>Detección de ARN por método no radiactivo (Random Primer Fluorescein labeling kit with antifuorescein-HRP, Dupont NEN, NEL201)</i> .....	53
Procedimiento de lavados astringentes: .....	54
Detección de ácidos nucleicos con el reactivo de quimiolumi-nisencia: .....	55
Incubación de la membrana con el sustrato de quimioluminisencia: .....	55
<i>Geles con glioxal</i> .....	56
<i>Geles con Formaldehído</i> .....	57
<i>Transferencia de ARN por capilaridad de difusión pasiva</i> .....	58
<i>Obtención de sondas</i> .....	60
<i>Protocolo para Transcripción Reversa de ARN y la amplificación de ADNc por PCR</i> .....	61
<i>Transcripción Reversa (este protocolo es tomado de GeneAmp<sup>®</sup>, Perkin Elmer)</i> . .....	62
<i>Obtención de los plásmidos (método alcalino)</i> .....	63
<i>Purificación de un fragmento de ADN para usar como sonda</i> .....	64
Digestión de un plásmido. ....	64
Purificación del inserto .....	65
<i>Marcaje de sondas de ADN con dCTP radiactivo por el método de cebadores al azar (Random Primer, Life Technologies, Gibco)</i> .....	66
<i>Prehibridación</i> .....	66
<i>Hibridación</i> .....	67
Lavados Post-hibridación .....	67
<i>Autoradiografía</i> .....	68
<b>V. RESULTADOS</b> .....	69

<i>EFECTO DE LA FBI EN LA TRANSCRIPCIÓN DE GENES RELACIONADOS CON LA DEFENSA</i> .....	70
<i>EXPRESIÓN DE GENES PR Y PAL EN EJES EMBRIONARIOS DE MAÍZ H- 355</i> .....	79
<b>VII. DISCUSIÓN</b> .....	86
<b>VII. CONCLUSIONES</b> .....	98
<b>VIII. APÉNDICE</b> .....	99
<i>Cuidados del material para trabajar con ARN</i> .....	99
<i>SOLUCIONES</i> .....	100
<b>IX. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	103

# ABREVIATURAS

A <sub>260</sub>	Absorbancia a 260 nanómetros	Kb	kilobases
ADNc	ácido desoxiribonucleico complementario	KCl	cloruro de potasio
AJ	ácido jasmónico	KDa	kilodaltones
ARN <sub>m</sub>	ácido ribonucleico mensajero	MgCl <sub>2</sub>	cloruro de magnesio
ARN <sub>r</sub>	ácido ribonucleico ribosomal	MOPS	3-(N-morfolino) ácido propano-sulfónico
ARN <sub>t</sub>	ácido ribonucleico de transferencia	msum	metros sobre el nivel del mar
AS	ácido salicílico	NaCl	cloruro de sodio
ATP	adenosina trifosfato	NADPH	dinucleótido nicotinamina adenina fosfato en forma reducida
dATP	trifosfato desoxiadenosina	O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	anión superóxido
dCTP	trifosfato desoxicitosina	°C	grados centígrados
DEPC	diethyl pirocarbonato	HO <sub>2</sub> <sup>•</sup>	radical hidroxil libre
dGTP	trifosfato desoxiguanosina	PAL	fenilalanina amonio liasa
DMSO	dimetil sulfoxido	pb	pares de bases
dTTP	trifosfato desoxitimidina	PCR	reacción en cadena de la polimerasa
EDTA	etilen dinitrilotetracetato disódico	RP	relacionado con la patogénesis
EROs	especies reactivas de oxígeno	RH	respuesta hipersensible
EtBr	bromuro de etidio	RNP <sub>m</sub>	partículas ribonucleicas mensajeras
FB1	fumonisina B1	SDS	dodecil sulfato de sodio
GTP	trifosfato guanosina	SSC	citrato de sodio salino
HO <sub>2</sub> <sup>•</sup>	radical hidroperoxil	TBE	Amortiguador tris boratos EDTA
HRGP	hidroxiprolina-rich glicoprotein: glicoproteína rica en hidroxiprolina		

# I. INTRODUCCIÓN

## 1. MAÍZ

### 1.1. Importancia de la producción de maíz

Entre las numerosas especies de plantas cultivadas útiles al hombre, tres son de especial importancia por el área cultivada mundialmente y el volumen de producción. Estas tres especies pertenecen a la familia de las Poaceae y son trigo, arroz y maíz.

Una de las características más relevantes de la planta de maíz (*Zea mays* L.) es su gran capacidad de adaptación, ya que se cultiva desde el Ecuador a diferentes latitudes hacia el norte y sur, al nivel del mar y hasta a más de 3 200 msnm, en suelos y climas muy variables con una tecnología muy diversa. Sin embargo, se adapta mejor en suelos húmedos y fértiles en regiones subtropicales templadas y en regiones subtropicales altas, con temperaturas altas durante el día y bajas durante la noche (Reyes, 1990).

Las principales regiones en el mundo con mayor productividad de acuerdo a Reyes (1990) son:

1. El cinturón o franja maizera en Estados Unidos con localización principal en los estados de Illinois y Iowa.
2. Cuenca del Danubio en Europa, extendiéndose desde el Sudoeste de Alemania hacia el Mar Negro.
3. Las llanuras del Río Po, en el norte de Italia.
4. Las llanuras del Norte de China.
5. Noroeste de Argentina.
6. Sureste de Brasil.
7. América Central.

8. Noreste de América del Sur.

9. México.

Los cereales son la fuente principal de calorías y proteínas en la dieta de la población de grandes grupos humanos en el mundo. En general, el maíz tiene un alto valor nutritivo como fuente de energía por su alto contenido de carbohidratos, pero las proteínas, tienen un bajo valor nutricional al carecer de los aminoácidos esenciales lisina y triptofano. Además, su contenido de la vitamina niacina y minerales es bajo, excepto en México y Centroamérica ya que el consumo en productos nixtamalizados le aporta calcio e incrementa la disponibilidad de la niacina. En México la cantidad de calorías, proteínas y grasas aportadas por gramo de maíz es de 1 096, 28.2 gramos y 12.1 gramos respectivamente.

Además de utilizarse la semilla de maíz directamente como alimento, puede ser industrializado pasando por dos procesos. Uno es la molienda en seco donde se utiliza el germen y la cubierta seminal de la semilla del maíz. El germen se utiliza para obtener aceite comestible de elevada calidad mientras que la cubierta seminal o pericarpio se emplea fundamentalmente como alimento, aunque en los últimos años ha despertado interés como fuente de fibra dietética. El segundo proceso, la molienda húmeda la cual se utiliza fundamentalmente en la aplicación industrial del maíz, aunque el procedimiento de cocción en solución alcalina empleado para elaborar las tortillas también es un ejemplo de operación de molienda húmeda que sólo elimina el pericarpio (Bressani, 1990). La molienda húmeda genera almidón y otros subproductos como el gluten, utilizado como ingrediente alimenticio, mientras que el germen de maíz elaborado para producir aceite da como subproducto harina de germen que se utiliza como alimento seco para ganado. El aumento de los precios del petróleo ha provocado que se intensifique la investigación sobre la fermentación del maíz para producir alcohol combustible, el cual tiene un uso muy difundido en algunas partes de los Estados Unidos. Por último, también tienen importancia las aplicaciones de los residuos de la planta de maíz, que se utilizan, entre otras cosas, como alimento para animales y como base para extraer diversos productos químicos de las panojas, como por ejemplo, furfural y xilosa. Estos residuos también tienen importancia como elementos para mejorar los suelos (FAO, 2000).

Usos de las distintas partes de la planta de maíz.

Grano	Planta	Mazorca
Alimentación humana	Forraje verde	Elote (alimento humano)
Alimentación del ganado	Ensilado	forraje tosco
Materia prima en la industria	Rastrojo, forraje tosco	olote (combustible)
Semilla	Materia orgánica al suelo	

En varios países de Latinoamérica, el maíz se aprovecha directamente como alimento para humanos en forma de tortillas, bollos, arepas, elotes, etc.; o como materia prima en la industria alimentaria para elaboración de harina, fécula, aceite, mieles y otros productos. Se estima que más de 800 artículos comestibles y no comestibles, contienen algún componente del maíz. Ejemplos de estos productos son: hilo dental, insecticidas, lubricantes, antibióticos, jabones, sopas, velas, cerámicas, cereales preparados y quesos entre otros (Reyes, 1990).

La Organización de Alimentación y Agricultura (FAO, 2000) de las Naciones Unidas informó que el promedio anual de la producción de semilla de maíz, en los últimos diez años (1990-1999), alcanzó un volumen mundial de 5, 500 billones de toneladas, producidas en 122 millones de hectáreas (11.4% del área total mundial cultivada). En México de 1990 a 1999 la producción promedio de maíz fue de 429, 547 millones de toneladas.

La estructura del consumo humano del maíz para 1998, en México, se encuentra en las tablas 1 y 2.

Abastecimiento doméstico (toneladas métricas)			
Producción	Importación	Exportación	Total
18 476	5 342	288	22 331

Tabla 1. Abastecimiento de maíz como alimento para México (FAO, 1998).

Utilización doméstica (toneladas métricas)					
Forraje	Semilla	Procesados	Pérdidas	Otros usos	Alimento
4 500	455	1 100	3 862	53	12 381

Tabla 2. Usos domésticos del maíz en México (FAO, 1998).

En resumen de los datos estadísticos sobre la producción de maíz en México se puede indicar lo siguiente:

- En más del 43 % de la superficie cultivada del país se siembra maíz.

- Más del 86% de la superficie cultivada con maíz es de temporal.
- Por su volumen de producción, área cultivada y valor de la producción, el maíz es el cultivo más importante, en el país.
- Existe un alto déficit de maíz para usos industriales que hace que se importen grandes volúmenes.

## 1.2. Taxonomía del maíz

Al maíz le han asignado varias clasificaciones, en términos generales es considerada dentro de los cereales los cuales son descritos como un grupo de plantas anuales, monocotiledóneas de la familia Poaceae que se cultivan normalmente por su forraje o por sus granos; pero la clasificación botánica del maíz es la siguiente:

CATEGORÍA	EJEMPLO	CARÁCTER DISTINTIVO
Reino	Vegetal	Planta anual
División o Phylum	Tracheophyta	Sistema vascular
Subdivisión	Pterapsidae	Producción de flores
Clase	Angiospermas	Semilla cubierta
Subclase	Monocotiledóneas	Cotiledón único (escutelum)
Orden	Graminales	Tallos con nudos prominentes
Familia	Poaceae	Grano-cereal
Tribu	Maydeae	Flores unisexuales
Género	<i>Zea</i>	Único
Especie	<i>mays</i>	maíz común
	<i>mexicana</i>	Teocinte anual
	<i>diploperennis</i>	Teocinte perenne
Raza	Más de 300 razas clasificadas; 30 en México	Adaptadas a regiones bien definidas. Ejemplo: Tuxpeño trópico, Chalqueño mesa central
Variedad	Polinización libre V-7; Híbridos H-507	Clima frío; clima caliente Húmedo
Líneas puras	T2	Intervienen todos los híbridos de clima caliente-húmedo de México

### 1.3. Morfología de la planta

La morfología de la planta madura de maíz se muestra en la figura 1.

**Raíz.** El maíz tiene un sistema radicular de tres estadios. En el 1er estadio, al germinar la semilla, emergen las raíces temporales o embrionales que nacen del primer nudo, las cuales funcionan durante la germinación y desarrollo de la plántula; 2o estadio, se desarrollan las raíces permanentes que nacen del segundo nudo de la plántula, estas raíces son profusamente ramificadas, alcanzando en conjunto un diámetro de 1.8 metros y más de 2 metros de profundidad, las raíces permanentes actúan como sostén y nutren a la planta en el crecimiento activo hasta la madurez fisiológica y en el 3er estadio, las raíces adventicias que emergen de los nudos basales de la planta sirven también de sostén o anclaje y como medio de absorción de nutrientes (Figura 1a).

**Tallo.** El tallo (Figura 1b) es una caña formada por nudos y entrenudos macizos, de longitud variable, gruesos en la base y de menor grosor en los entrenudos superiores. El número de entrenudos es variable con un rango de 8 a 26; en cada entrenudo hay una depresión que se extiende a lo largo del entrenudo, en posición alterna a lo largo del tallo; en la base del entrenudo hay una yema floral que se extiende a lo largo de la depresión (Poethig, 1994).

**Hojas.** Las partes de una hoja constan de una vaina que envuelve el entrenudo y cubre a la yema floral a lo largo y ancho, tiene una nervadura central bien definida, el haz o parte superior presenta pequeñas vellosidades, el envés o parte inferior es liso sin vellosidades; la lígula o lengüeta localizada en la base de la hoja, donde también está la aurícula que envuelve al entrenudo. La aurícula y la lígula como se muestra en la figura 1 c, protegen al entrenudo y drenan el agua que al llover se desliza sobre el limbo y la nervadura central. Las hojas nacen en los nudos en la parte inferior inmediata a las yemas florales femeninas, su tamaño, forma y ancho dependerá de la variedad del maíz (Freeling y Lane, 1994).

**Flores.** El maíz es una planta monoica de flores unisexuales separadas y bien diferenciadas en la misma planta, las flores que producen los granos de polen, en donde está el gameto masculino, se localizan en la inflorescencia terminal comúnmente denominada "panícula", "panoja", "espiga" o "maihuatl", la cual está estructurada por un eje central, ramas laterales primarias, secundarias y terciarias. Las flores pistiladas se localizan en las yemas

florales que emergen en las axilas de las hojas, agrupándose por pares, distribuyéndose a lo largo de la inflorescencia femenina, que es una espiga cilíndrica: ésta consiste de un raquis central u olote en donde se insertan, a lo largo, las espiguillas por pares con glumas, lema y palea rudimentarias; cada espiguilla tiene dos flores, una estéril y otra fértil, y forma hileras de flores paralelas. Las flores pistiladas tienen un ovario único y en el proceso de su desarrollo se le denominan: yema floral pistilada, jilote, elote, elocinte (Figura 1d).

**Fruto.** En términos botánicos es denominado cariósipide, aunque los agricultores lo reconocen como semilla, se conoce comúnmente como granos de maíz (Figura 1e). Biológicamente el fruto es el ovario desarrollado y la semilla es el óvulo fecundado, desarrollado y maduro. En el maíz y en las gramíneas superiores, el ovario se desarrolla al igual que el óvulo hasta alcanzar una sola estructura. El fruto se encuentra insertado en el raquis u olote constituyendo hileras de granos cuyo conjunto forma la mazorca, espiga cilíndrica o infrutescencia, producto del desarrollo de la yema floral axilar de la hoja que nace en el nudo. El número de hileras es par y varía de 8 a 30 hileras (Desai *et al.*, 1997).

## 1.4. Estructura de la semilla

La semilla de maíz es un fruto simple llamado grano. Este incluye el pericarpio, aleurona, endospermo y embrión (Figura 2).

El pericarpio (cubierta de la semilla) es la pared del ovario transformada, la cual cubre al grano y le proporciona protección a las partes interiores. El pericarpio es de origen materno y tiene un genotipo idéntico al de la planta de la cual nació. El grosor del pericarpio entre genotipos va desde 25 hasta 140  $\mu\text{m}$ . El peso seco del pericarpio es normalmente menos del 2% del peso total del grano. Su color puede ser rojo o incoloro, y si ocurre esto último, entonces el color del grano dependerá de la tonalidad de la aleurona o del endospermo.

El tejido de la aleurona es una sola capa de células localizada inmediatamente por debajo del pericarpio y es la epidermis del endospermo triploide (Zuber y Darrah, 1987; Walbot, 1994). En maíz, la aleurona esta compuesta de una sola capa de células y su contenido es granular en apariencia, pero los gránulos presentes son de proteínas y no de almidón. Las células de este tejido se caracterizan por ser pequeñas, no tienen cuerpos proteicos prominentes, no presentan pigmentación y son ricas en minerales (Walbot, 1994; Bewley y

Black, 1995; Kiesselbach, 1999). Durante la germinación la aleurona secreta hidrolasas que ayudan a la digestión de reservas almacenadas en el interior de las células del endospermo. En los cereales la enzima responsable de la degradación del almidón es la  $\alpha$ -amilasa, sin embargo, ésta es secretada inicialmente por el escutelo pero en maíz es muy probable que en etapas posteriores la hidrólisis sea realizada por isoenzimas de la capa de la aleurona. La  $\beta$ -amilasa también está involucrada en la digestión de almidón en cereales, ésta puede ser sintetizada *de novo* o liberada por el escutelo o en la capa de aleurona y es activada después de la digestión iniciada por la  $\alpha$ -amilasa. La digestión de la amilopectina, uno de los componentes del endospermo, es provocada por enzimas que cortan cadenas laterales, sin embargo, se conoce poco de estas enzimas, así mismo se cree que son sintetizadas *de novo* en la capa de la aleurona (Walbot, 1994; Kiesselbach, 1999).

El endospermo es el tejido de reserva y forma gran parte del peso y volumen del grano, normalmente el 80-85% del peso total. Las células del endospermo están llenas principalmente de granos de almidón. Un tercio de los cromosomas son del progenitor masculino y dos tercios del progenitor femenino; el número de cromosomas es de  $3n$ . El color del endospermo puede ser amarillo o blanco.

El embrión, constituye aproximadamente el 8 al 10% del peso total del grano, y se puede considerar como una planta de maíz latente joven que se activará e iniciará su crecimiento bajo ciertas condiciones externas de temperatura y humedad. En un corte transversal del embrión, las partes rudimentarias de la planta de maíz son evidentes, por ejemplo, la plúmula con el tallo, las hojas y la raíz primaria. El escutelo es conocido como la hoja primaria. Sin embargo, su función no es como la de la hoja sino como órgano de almacenamiento (Reyes, 1990).

El pedicelo es un punto de anclaje de la semilla al olote. El tejido conductivo localizado dentro del pedicelo es referido como la capa hilar en los granos maduros. Cuando se alcanza la madurez fisiológica del grano, no ocurre movilización posterior de nutrientes. A este tiempo la capa hilar toma un color café oscuro o casi negro y es referida como la "capa negra". Esto es comúnmente utilizado como un indicador de la madurez fisiológica (Zuber y Darrah, 1987).

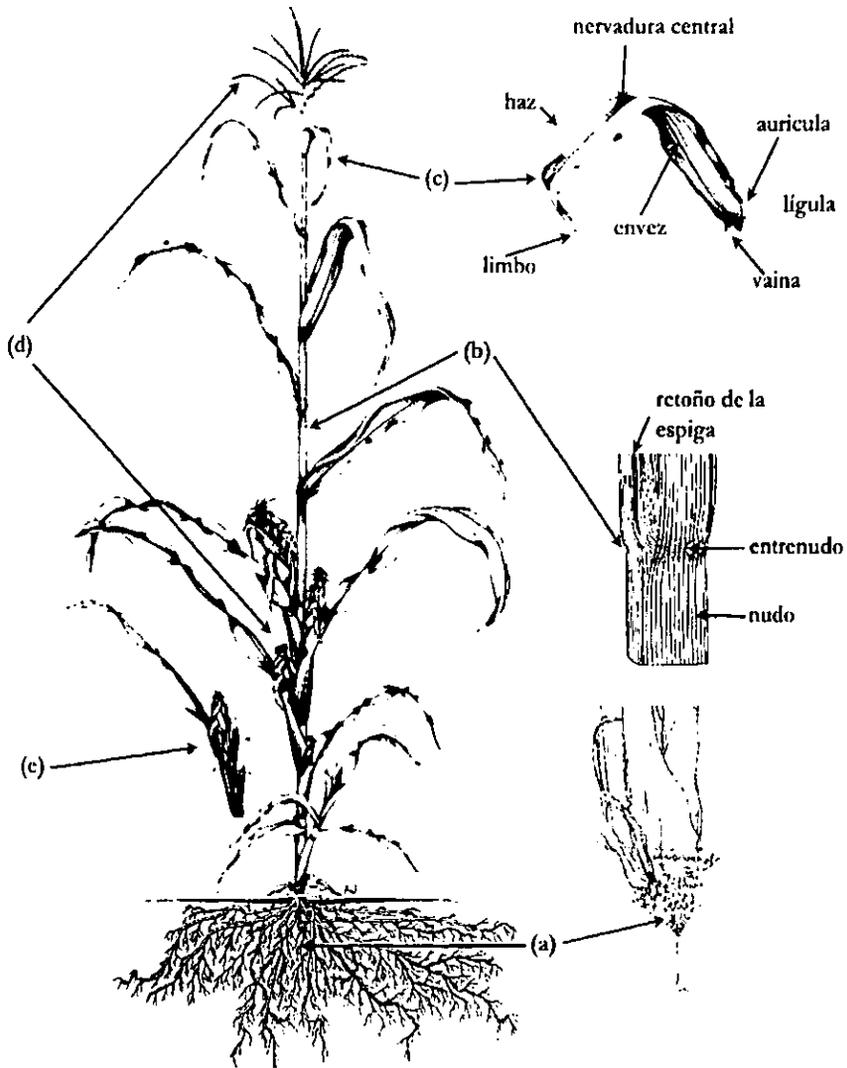


Figura 1. Morfología de la planta de maíz. a) raíz, b) tallo, c) hojas, d) flores y e) fruto y semilla (Feldman, 1994; Neuffer *et al.*, 1997).

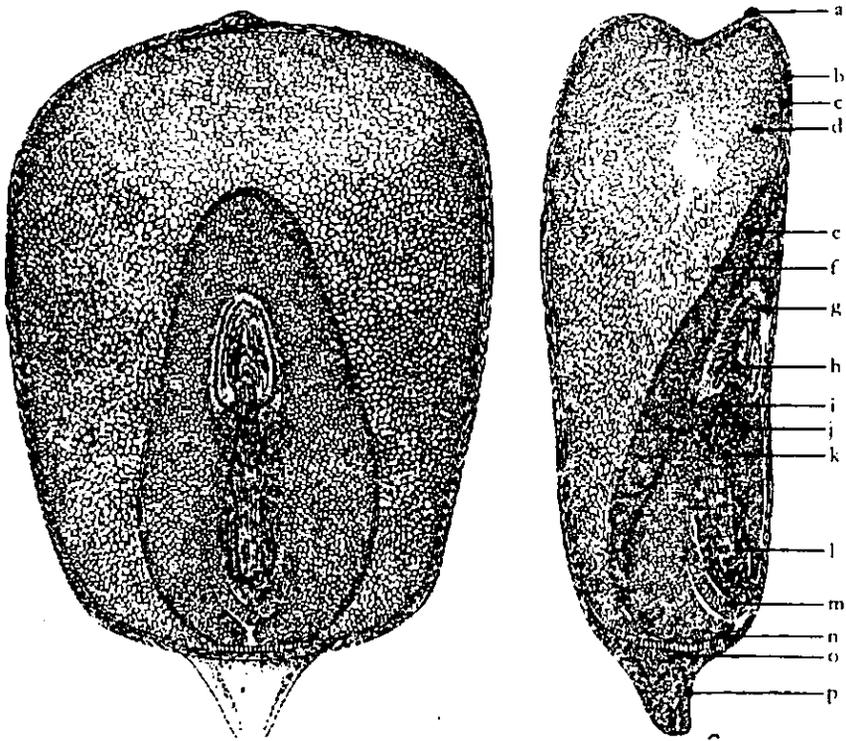


Figura 2. Grano maduro de maíz. Secciones verticales en dos planos, mostrando los órganos y tejidos de la semilla. a) muescas de los estilos, b) pericarpio, c) aleurona, d) endospermo, e) escutelo, f) capa granular del escutelo, g) coleoptilo, h) plúmula con tallo y hojas, i) primer entrenudo, j) raíz seminal lateral, k) nodo del escutelo, l) raíz primaria, m) coleorriza, n) células basales conductoras del escutelo, o) capa de abscisión, p) pedicelo (Kiesselbach, 1999).

## 1.5. Embriogénesis

En las angiospermas, la fecundación es de doble fertilización y requiere los siguientes pasos: polinización, germinación del grano de polen y doble fertilización o singamia. El saco embrionario del maíz es del tipo monosporico. Dependiendo de la temperatura y la longitud de espiga, la fertilización ocurre entre las 16 y 24 horas después de la polinización. Se puede considerar que la embriogénesis del maíz ocurre en tres fases. Durante la primera fase la asimetría basal apical del embrión es establecida y el embrión es regionalizado en suspensor y embrión. Durante la segunda fase, la asimetría radial aparece, el eje embrionario y meristemas son establecidos y durante la tercera fase las estructuras vegetativas son elaboradas (Sheridan y Clark, 1994).

Fase 1. Los estados tempranos de la embriogénesis se caracterizan por presentar patrones irregulares de división celular. A través de su desarrollo el proembrión ovoide es radialmente simétrico a lo largo del eje, posteriormente el embrión cambia su forma ovoide hasta adquirir la forma de garrote. Después del estado de transición medio, el embrión permanece radialmente simétrico.

Fase 2. Alrededor del día 8 ó 9, una región localizada de gran actividad mitótica surge bajo la cara anterior del embrión propio. Esta región extendida de gran actividad meristemática establece un eje meristemático. Este eje convierte el brote del meristemo apical en el meristemo apical de la raíz del eje del embrión en un periodo aproximado entre los 11 a los 13 días después de la polinización. Simultáneamente con la salida de la protuberancia del nuevo meristemo apical del tallo formado, una cordillera de células aparece abajo del meristemo en la cara anterior del embrión en el estado de transición, al mismo tiempo, el embrión se extiende, particularmente en el lado posterior para formar el origen del escutelo. El embrión ahora posee un meristemo apical prominente rodeado por un anillo coleoptilar en su superficie anterior y respaldado por un escutelo, terminando el estado coleoptilar del embrión. En éste estado, el embrión tiene cerca de 1 mm o más de longitud (Sheridan y Clark, 1994).

Fase 3, durante el periodo del día 30 al 40 aparecen los primordios de hoja y raíces adicionales, el escutelo se extiende rodeando estas estructuras. En la madurez, el eje embrionario está constituido de una plúmula con cinco o seis primordios de hoja encerrados dentro del coleoptilo y de un primordio de raíz primaria con uno o más primordios de raíz

secundaria: el eje está casi completamente encerrado por el escutelo envolviéndolo con solo la punta del coleoptilo y la coleoriza sobresaliendo en la parte superior del botón, respectivamente. Durante esta fase de la embriogénesis, los productos de almacenamiento se acumulan dentro del embrión, particularmente dentro del escutelo y endospermo. Durante la fase 3 de la embriogénesis la capacidad para resistir la desecación es adquirida por el embrión. Finalmente, la latencia ocurre después de la deshidratación masiva de las células del embrión (Sheridan y Clark, 1994).

## 1.6. Germinación

La germinación comienza con la absorción del agua por la semilla (imbibición) y finaliza con el comienzo de la elongación del eje embrionario, usualmente la radícula. Esto incluye numerosos eventos como la hidratación de proteínas, cambios estructurales, respiración, síntesis macromolecular y elongación celular (Bewley y Black, 1995).

### 1.6.1. Absorción del agua

La rehidratación de la semilla es un paso inicial para la germinación. La cantidad de agua que absorbe la semilla es generalmente pequeña (no excediendo dos o tres veces el peso seco de la semilla) dependiendo de su tamaño y de otras características tales como el potencial de agua de la célula y del suelo, el potencial de la matriz y la presión de turgor. La magnitud de rehidratación depende de la fuerza con la cual el agua es retenida en el suelo y la cantidad de trabajo que realizará la semilla para adquirirla. En el caso del potencial de agua del suelo, solo la concentración de solutos juega un papel importante. Las diferencias entre el potencial de agua de la semilla y del suelo es solo uno de los factores influyentes en la velocidad del flujo del agua, que va del suelo a la semilla. Otros factores que influyen son: la resistencia interna de la matriz del suelo, resistencia externa que es el grado de contacto de la semilla con el agua, así como la resistencia interna dada por la cubierta de la semilla y los espacios de aire (Desai *et al.*, 1997).

Debido a la rápida absorción de agua, las células se expanden aumentando el tamaño de la vacuola hasta que éstas adquieren una gran vacuola central, característica de las células elongadas. La absorción de agua aumenta debido a los cambios del potencial de agua en las células, el cual, en turno, es atribuido a la disminución del potencial del soluto.

## 1.6.2. Respiración

La respiración es uno de los procesos bioquímicos más importantes que ocurren durante la germinación. Tanto las rutas anaeróbicas como las aeróbicas, como son glicólisis, la ruta de la pentosa fosfato y el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (ATC), se piensa que son activados durante la imbibición de la semilla. Estas rutas oxidativas son responsables de la producción de intermediarios claves en el metabolismo celular como son: la energía en forma de ATP y el poder reductor como los nucleótidos adenina reducidos (NADH y NADPH). La glicólisis es catalizada por enzimas citoplásmicas y es operada bajo condiciones tanto anaeróbicas como aeróbicas para convertir glucosa a piruvato, la cual puede ser posteriormente reducida a etanol (en ausencia de oxígeno) o a lactato si no ocurre la descarboxilación. Bajo condiciones aeróbicas el piruvato es posteriormente oxidado, dentro de la mitocondria, después de la descarboxilación de piruvato a coenzima A (acetil CoA) y por último es completamente oxidado a CO<sub>2</sub> y agua a través de del ciclo del ATC, produciendo 28 moléculas netas de ATP por molécula de glucosa respirada. El poder reductor, NADH, requerido para la biosíntesis reductora de lípidos y esteroides es generado y disponible por la ruta de la pentosa fosfato. Los intermediarios de esta ruta, tales como compuestos de 5 y 7 carbonos sirven como precursores para la síntesis de ácidos nucleicos y compuestos aromáticos (Bewley y Black, 1995; Desai *et al.*, 1997).

Experimentalmente se ha demostrado que los requerimientos mínimos de oxígeno para la germinación de la semilla son del 20.9%. El CO<sub>2</sub> a concentraciones mayores del 0.03% retardan la germinación, mientras que el gas nitrógeno no tiene influencia alguna. Cuando los ejes germinando pueden contribuir tan solo el 10% del total de la respiración de la semilla. Kolloffel estudió el patrón de consumo de O<sub>2</sub> en semillas de chícharo en dos fases previas y dos fases posteriores a la germinación. La fase I se caracteriza por un aumento marcado en la respiración, durando cerca de 10 horas, lo cual es asociado con la activación e hidratación de enzimas mitocondriales del ciclo de ATC y la cadena de transporte de electrones. La respiración durante ésta fase aumenta linealmente con el grado de absorción de agua en el tejido del cotiledón. La fase II es caracterizada por un lag (la anaerobiosis parece ser la posible causa de la fase lag en la respiración de algunas, sino es que de todas las semillas) en la respiración entre las 10 y 25 horas después de comenzar la imbibición. El cociente respiratorio, que da cerca de 3.0, indica alguna respiración anaerobia. En este estado la respiración puede ser

impedida por la falta de oxígeno, la cual es restringida por la cubierta de la semilla intacta. La rápida toma de oxígeno en semillas intactas (con testa) durante los primeros estados la imbibición (fase I) y la restricción del oxígeno por la testa en la fase II no han sido explicadas. La radícula penetra la testa entre la fase II y III. La fase III está caracterizada por un segundo incremento en la respiración, atribuido parcialmente a un aumento en la disposición del oxígeno a través de una nueva testa agujerada. La actividad de enzimas recién sintetizadas en la mitocondria y de la respiración en las células en división del eje en crecimiento, también contribuye al aumento de la respiración. La fase IV es marcada por una caída significativa en la respiración que coincide con la desintegración de los cotiledones, seguida de la disminución en las reservas. La duración de las fases de respiración en semillas varía entre las especies (Desai *et al.*, 1997).

Otros factores que influyen en la germinación de la semilla incluyen la temperatura, duración del día, edad de la semilla, periodo de imbibición, temperatura de imbibición y temperatura de germinación (Desai *et al.*, 1997). La germinación es un proceso complejo el cual involucra varias reacciones individuales y fases, cada una de las cuales es afectada por la temperatura. Este efecto puede ser expresado en términos de temperatura mínima, óptima y máxima en la cual la germinación puede ocurrir. La temperatura mínima es algunas veces difícil de definir puesto que la germinación puede realmente proceder a una velocidad tan lenta que su determinación se detecta frecuentemente antes de que la germinación real se complete. La temperatura óptima puede ser definida como la temperatura a la que ocurre el mayor porcentaje de germinación dentro de un tiempo corto. La temperatura máxima está determinada por la temperatura a la cual la desnaturalización de proteínas importantes para la germinación ocurre. En la germinación del maíz, la temperatura mínima es de 10°C, la óptima esta entre 20 y 25°C y la máxima es de 40°C. Hay pocos genotipos de maíz que germinan satisfactoriamente a 10°C y de hecho temperaturas entre 8° y 12°C retardan la germinación y la emergencia de las plántulas que son más susceptibles a daños ocasionados por organismos en el suelo (Reyes, 1990; Copeland y McDonald, 1995).

Mientras que la humedad, el oxígeno y la temperatura favorables son esenciales para la germinación de todas las semillas, ciertas especies requieren de luz. Los mecanismos de control de la luz son muy similares a otros procesos como la fructificación, formación de las hojas, floración, elongación del tallo y la germinación. Tanto la intensidad de la luz (poder lumínico)

como la calidad de la luz (color o longitud de onda) influyen en la germinación y varía enormemente entre especies. La intensidad de luz en la mayoría de semillas se encuentra entre 1 080 y 2 160 lux de luz indirecta. La influencia de la calidad de la luz es importante donde la mayor promoción de la germinación ocurre en el área del rojo (660-700 nm) seguido con una zona de inhibición en el rojo lejano (arriba de 700 nm). Longitudes de onda por debajo de los 290 nm inhiben la germinación. Las semillas de varias especies muestran una respuesta de germinación controlada, por ejemplo algunas especies *Betula* requieren de días largos y otras como *Raphanus* (rábano) son inhibidas por una irradiación prolongada y germinan en total ausencia de luz (Copeland y McDonald, 1995). El maíz es una especie de fotoperiodo corto, aún cuando algunos autores la consideran de fotoperiodo neutro o insensible. Esta discrepancia se puede explicar por la gran variación genética de la especie o a los segregantes posibles en una población de plantas (Reyes, 1990).

La sensibilidad a la luz durante la germinación de la semilla depende de la especie y variedad, así como de factores ambientales antes y durante la germinación. La influencia de la luz es muy fuerte inmediatamente después de almacenar la semilla, disminuye con la edad de la misma y eventualmente se vuelve insensible. Esto puede ser una razón de por que difieren las cantidades de requerimientos de luz para las semillas de la misma especie. En el periodo de imbibición generalmente se requiere de menos luz para estimular la germinación de la semilla cuando se incrementa el tiempo de imbibición (Copeland y McDonald, 1995).

Temperatura de imbibición. El incremento de la temperatura durante la imbibición acelera los eventos metabólicos asociados con la germinación y causa un aumento en la absorción del agua resultando en una hidratación más rápida e incrementando así, la sensibilidad a la luz. La temperatura de germinación es un efecto que es diverso en general, podemos encontrar que la respuesta para cada especie algunas veces puede incrementar, disminuir o cambiar cualitativamente, mientras que en otros casos no, por ejemplo en algunas especies como *Raphanus* si se aumenta la temperatura de germinación y hay suficiente agua el proceso de germinación es mucho más rápido (Copeland y McDonald, 1995).

### 1.6.3. Síntesis de ARNm durante la germinación

Al inicio de la germinación ocurre la expresión de genes que codifican enzimas involucradas en la iniciación del crecimiento axial y subsiguiente movilización de reservas

(Bewley y Black, 1995). En embriones secos de trigo el ARNm sintetizado durante la embriogénesis es conservado y utilizado para alimentar la síntesis de proteínas inicial durante la germinación. Dentro del embrión o del eje embrionario se pueden distinguir dos clases de ARNm: la primera clase son los transcritos residuales sintetizados durante el desarrollo de la semilla y que permanecen intactos durante la maduración tardía y la desecación, pero que son degradados inmediatamente después de la imbibición; la segunda clase de ARN mensajeros son conservados durante el desarrollo y están inmediatamente disponibles cuando se hidrata la semilla. Estos pueden ser rápidamente traducidos a proteínas, constituyendo una parte integral de la germinación y pueden dividirse en transcritos para proteínas esenciales para finalizar la germinación *per se* y enzimas esenciales del metabolismo intermediario (Bewley y Black, 1995).

No se sabe con exactitud la forma de como los ARNm se encuentran en la semilla seca y como es que se traducen selectivamente ciertos ARNm en la célula durante la germinación. Las explicaciones que se han dado son que los transcritos conservados en la semilla seca están protegidos y almacenados en el núcleo durante la maduración, o bien se encuentran ya poliadenilados listos para ser traducidos. Estos ARNm almacenados son liberados del núcleo hacia los sitios de síntesis de proteínas en el citoplasma. Existe evidencia que en embriones de algodón, la localización celular de mensajes poliadenilados está dentro del núcleo. Por otra parte, se ha defendido la idea de la acumulación de ARNm en informosomas, que son complejos constituidos por mensajeros ribonucleoproteicos (mRNPs) asociados a proteínas formados durante el desarrollo de embriones (Bewley y Black, 1995).

#### **1.6.4. Síntesis de ARNr y ARNt durante la germinación**

La síntesis de ARN requiere la intervención de tres polimerasas: la ARN polimerasa I, que es una polimerasa nuclear que transcribe genes que codifican para el ARNr 18 y 25S; la ARN polimerasa II, localizada dentro del nucleoplasma y responsable de la transcripción de los ARNm y la ARN polimerasa III, que se encuentra dentro del nucleoplasma, la cual transcribe genes que codifican el ARNt y ARNr 5S. El inicio y la continuación de la síntesis de ARN son dependientes de la disponibilidad de precursores ribonucleótidos trifosfatos, sin embargo se desconoce la naturaleza de los mecanismos de control cuantitativos y cualitativos de la velocidad de síntesis de ARN (Bewley y Black, 1995).

### **1.6.5. Biosíntesis de proteínas**

La síntesis de proteínas comienza después de que las células de la semilla están completamente hidratadas, permitiendo que la subunidad 80S de los ribosomas se asocie con el ARNm. En embriones de trigo, la síntesis de proteínas se inicia con la unión de la unidad ribosomal 40S al ARNt iniciador (ARNt metionil). El gran complejo de iniciación (60S) es establecido en el punto de inicio en el ARNm para comenzar la síntesis de proteínas. La formación del complejo de iniciación requiere varios factores, incluyendo enzimas, las cuales están presentes en el citoplasma de embriones secos de trigo, y el consumo de energía en la forma de GTP y ATP. Otras proteínas como los factores de elongación y factores de termino así como la organización de la cadena polipeptídica sintetizada son también esenciales (Bewley y Black, 1995).

El tiempo requerido para comenzar la síntesis de proteínas después de la imbibición varía entre especies desde unos pocos minutos hasta horas. En embriones de trigo los poliribosomas son formados en los primeros 15 minutos después de la imbibición. Se presume que los componentes citoplásmicos esenciales para la síntesis de proteínas, factores de iniciación y de elongación, ARNt, amino ácidos y enzimas (aminoacil-ARNt sintetasa) están presentes en la semilla en cantidades suficientes para permitir la reanudación de la síntesis de proteínas de la semilla en imbibición (Kermode, 1995).

## 2. HONGOS FITOPATÓGENOS

### 2.1. Hongos patógenos de la semilla de maíz

Los hongos son organismos heterótrofos que dependen de los autótrofos o sus productos como su fuente de carbono. Si el hongo obtiene su alimento de materia orgánica muerta se le denomina saprófito; pero si el hongo puede obtener su alimento directamente de otro organismo vivo (un hospedero) se le denomina parásito.

Los hongos están extraordinariamente adaptados para parasitar a las plantas y constituyen el grupo de microorganismos más numeroso como fitopatógenos. Los hongos que se introducen al tejido a través de heridas o aberturas naturales, como estomas, para colonizar a la planta se les llama parásitos oportunistas, estas especies de hongos se caracterizan por tener un amplio rango de hospederos pero relativamente baja virulencia, ésto quiere decir que solo causan algunos síntomas de la enfermedad. Si los hongos dependen de la planta viva para crecer, ocasionando enfermedades, pero bajo ciertas condiciones o circunstancias pueden vivir fuera de su hospedero se les llama patógenos facultativos; varios de los patógenos importantes en plantas están a este nivel y son altamente virulentos teniendo un número limitado de hospederos. Por último, existen los patógenos obligados, éstos son de una gran complejidad, para los cuales la planta hospedera viva es un absoluto requisito para completar su ciclo de vida (Agrios, 1988; Deacon, 1988).

Los patógenos pueden atacar a las plantas en cualquier etapa de su ciclo de vida, la severidad de la enfermedad dependerá de la edad de la planta en el momento de la infección, así como de los factores ambientales. De esta manera los patógenos infectan hojas, tallo, fruto, raíz y semillas, provocando una disminución en el valor y la producción del cultivo. En maíz, todas las partes de la planta son susceptibles a un número de enfermedades provocadas por hongos patógenos, los cuales reducen la producción y calidad del cultivo; se estima que la reducción mundial en la producción de semilla de maíz por estas enfermedades es de un 9.4% (Shurtleff, 1980).

La mazorca del maíz es muy susceptible al ataque de hongos, lo que ocasiona la infección de las semillas y por lo tanto se afecta la producción. Enfermedades en la mazorca son causadas por una gran diversidad de hongos que producen síntomas distintos. En la tabla 3

se muestran las características y los hongos causantes de las principales enfermedades en mazorcas y granos de maíz.

NOMBRE DE LA ENFERMEDAD	ORGANISMO CAUSANTE	SINTOMAS
Putridión de la mazorca por <i>Diplodia</i>	<i>Diplodia maydis</i> y <i>D. macrospora</i> .	La cáscara de los granos tienen la apariencia blanquecina, roja o color paja. Si la infección ocurre después de la polinización, toda la mazorca se torna café grisáceo, reduciendo su tamaño, su peso y finalmente se pudre. La infección normalmente comienza en la base de la mazorca, moviéndose desde la parte superior hasta la parte inferior.
Putridión roja de la mazorca por <i>Giberella</i>	<i>Giberella zeae</i>	Un moho rojizo, frecuentemente comienza en la punta de la mazorca. Éstas pueden pudrirse completamente con las cáscaras adheridas estrechamente a la mazorca y un moho de rosado a rojizo creciendo entre la cáscara de la mazorca; peritecios blancos-negros son algunas veces encontrados en la cáscara y en la punta de la mazorca.
Putridión de la mazorca por <i>Nigrospora</i>	<i>Nigrospora oryzae</i> . El estado perfecto es <i>Khuskia oryzae</i>	Los síntomas no son conspicuos hasta que la mazorca es almacenada. La característica distintiva es la pulverización de los granos en la mazorca. Los granos pueden mostrar un micelio gris y estar salpicados de masas de esporas pequeñas redondas de color negro. Las mazorcas afectadas son ligeras, con granos delgados blanquecinos o rayados.
Putridión gris de la mazorca	<i>Botryosphaeria zeae</i> , estado asexual <i>Macrophoma zeae</i> .	Forma un moho blanco grisáceo en y entre los granos cerca de la base de la mazorca. Mazorcas recién infectadas tienen cáscara estrechamente adherida y blanquecina. Los granos severamente infectados tienen manchas o bandas de gris a negras debajo del pericarpio.
Putridión de <i>Penicillium</i>	<i>Penicillium oxalicum</i> P. <i>chrysogenum</i> , <i>P. glaucum</i> , y <i>P. funiculosum</i>	La pudrición por <i>Penicillium</i> se presenta principalmente en mazorcas dañadas por insectos o mecánicamente. La señal característica es el moho verde o verde-azul entre los granos, normalmente en la punta de la mazorca. La pudrición del "ojo azul" ocurre en los granos almacenados con alto contenido de humedad.
Putridión negra del grano	<i>Botryodiplodia theobromae</i>	Durante los primeros estadios de la infección, los granos muestran una decoloración café. Durante el progreso de la enfermedad, los granos se vuelven negros con pequeñas erupciones que pueden contener picnidios. Una pudrición seca se desarrolla después.
Putridión de Cladosporium	<i>Cladosporium herbarum</i> y <i>C. cladosporoides</i>	La pudrición es identificada por bandas oscuras, negro-verdosas y manchas dispersas sobre la mazorca. La decoloración aparece primero donde los granos se unen a la mazorca. Después las manchas aparecen hacia arriba pero rara vez aparecen en la parte superior. Posteriormente la pudrición ocurre durante el almacenaje. Cuando las mazorcas son colonizadas completamente son de color oscuro y ligeras.

Tabla 3. Determinadas enfermedades causadas por hongos patógenos que afectan a la mazorca y a los granos de maíz (tomado de Shurtleff, 1980).

## 2.2. *Fusarium moniliforme*

El género *Fusarium* pertenece a los Hyphomycetes, formalmente clasificado en los Deuteromycetes y ahora considerado un género anamórfico asociado con los Hypocreales (Ascomycetes). Este género se caracteriza por la producción de macroconidios septados, hialinos y cenagosos en forma de canoa, que en muchas especies son producidos en estructuras de racimo llamadas esporodoquias. Además de esta característica, algunas especies producen diferentes conidias en el micelio aéreo frecuentemente referidas como microconidios. La clasificación taxonómica de *Fusarium* es sumamente compleja y el género se ha dividido en 12 secciones que abarcan a distintas especies. *Fusarium moniliforme* Sheldon (figura 3) pertenece a la sección Liseola y corresponde a una de las seis especies biológicas (o poblaciones de apareamiento) que forman el telemorfo (estado sexual) *Cibarella fujikuroi*. Dos de estas seis especies biológicas denominadas A y D, son productoras de toxinas importantes (fumonisinas), que se discutirán más adelante. Las cepas de la población de apareamiento A crecen como endófitas en maíz y constituyen un 90% de las cepas de *Fusarium* aisladas de semillas de maíz, aún cuando éstas sean asintomáticas. Es posible distinguir entre las seis poblaciones utilizando una serie de características como isoenzimas, fertilidad sexual, caracteres morfológicos y secuencias de las regiones espaciadoras internas transcritas del ADN ribosomal.

*Fusarium* spp. es un hongo que está distribuido en todo el mundo en una variedad de hospederos incluyendo espárragos, plátano, higo, maíz, mango, pino, piña, arroz, sorgo y caña. Aunque estos hongos son ampliamente distribuidos en plantas cultivadas y nativas, *Fusarium moniliforme* es más comúnmente asociado con la pudrición de tallo y raíz, en maíz y sorgo (Leslie, 1996).

Un hongo patógeno que es comúnmente aislado del maíz, dondequiera que se haya cultivado la planta, es *Fusarium moniliforme* el cual es capaz de atacar distintos tejidos de la planta causando grandes pérdidas anuales en varias partes del mundo. Este patógeno, es causante de la pudrición de tallo, raíz y espiga en el maíz. El tejido de plantas infectadas puede pudrirse o permanecer asintomático debido a que no hay condiciones para la proliferación del hongo. La infección de la semilla puede resultar del crecimiento interno en las plantas

infectadas, a través de daños en el grano producidos por insectos, pájaros o granizo (Leslie, 1996).

Estudios de microscopía electrónica han mostrado que *F. moniliforme* se localiza en el pedicelo del grano. Esta localización del hongo ha llevado a algunos investigadores a la hipótesis de que *F. moniliforme* llega al grano por la vía del crecimiento que ocurre en o dentro de la mazorca y que la infección de una mazorca entera puede comenzar en un solo punto de infección. Si la infección es sistémica, entonces las cepas que lleva el grano podrían tener una ventaja para infectar cuando la semilla germine al formar una nueva planta. *F. moniliforme* produce macroconidios y abundantes microconidios los cuales se dispersan por el viento en el campo de maíz. Las microconidios también pueden facilitar el movimiento dentro de la planta; el hongo no produce clamidosporas pero puede producir hifas espesas o gruesas que aparentemente prolongan su supervivencia.

### 2.3. Ciclo de vida de *Fusarium moniliforme* y toxinas

*Fusarium moniliforme* es un patógeno facultativo comúnmente asociado al maíz dependiendo en gran medida de la planta viva para completar su ciclo de vida. El ciclo de vida de este hongo presenta dos estados, uno parasítico y el otro saprofitico. En el estado parasítico el hongo infecta y coloniza a la planta ya sea vía mazorca o raíz para posteriormente producir estructuras de infección así como de latencia en tejido seco pasando a su estado saprofitico. En este estado causa la pudrición de materia del tejido seco para entrar en ciclos de conidiación (macroconidios y microconidios) infectando a otras plantas con estas estructuras, siendo su medio de dispersión el aire, iniciando nuevamente el ciclo de vida (figura 4). Este hongo puede vivir también como saprobio facultativo durante el resto de su ciclo de vida y producir estructuras infectivas para el establecimiento primario y secundario de la enfermedad, sirviendo como estructuras latentes. Solamente durante su estado saprofitico es que la fase anamórfica de *Cibberella fujikuroi* ha sido observada. A diferencia de muchos otros patógenos obligados, el modo de nutrición de *F. moniliforme* es difícil de estudiar por el hecho de que un gran porcentaje de cepas toman sus nutrientes de células hospederas vivas después de establecer un estrecho contacto con ellas. Los síntomas de la enfermedad y la muerte de plantas de maíz

infectadas pueden resultar ya sea de la implicación directa o indirecta de factores bióticos o abióticos y/o de la reducción de nutrientes (Bacon y Hinton, 1996).

Además de su capacidad como patógenos, cepas de este grupo de hongos son capaces de producir una variedad de metabolitos secundarios. Estos compuestos incluyen fusarinas ( $C_{23}H_{29}O_7$ ) que son mutágenos potentes; moniliformina una potente fitotoxina; neptasarina un pigmento complejo, un grupo de aromáticos lineares; ácido fusárico, 1-carboxi-4-butano piridina; beauvericina un depsipéptido cíclico con actividad de ionóforo; fusaroproliferina, un sesquiterpeno tóxico; los tricotecénos: como deoxinivalenol; diacetoxircipenol y la toxina T2, así como el estrógeno zearalenona. Con excepción de los tricotecenos y la zearalenona, la toxicidad de la mayoría de estos metabolitos ha sido poco estudiada, y su papel en la toxicosis animal y el riesgo de exposición en humanos, si es que hay alguno, permanecen inciertos (Plattner *et al.*, 1996). Durante los últimos diez años la atención se ha enfocado en las funonisinas una nueva familia de toxinas producidas por *F. moniliforme*, que tienen un amplio espectro de actividades sobre animales y vegetales.

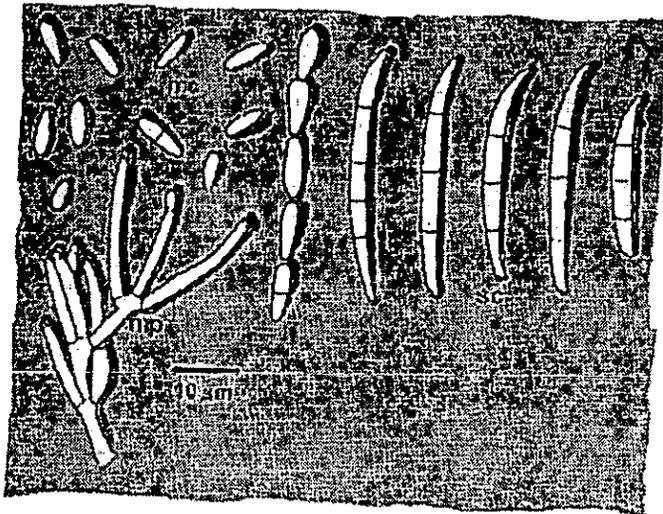


Figura 3. *Fusarium moniliforme*, microconidios (mc), monofialidas (mp) y macroconidios (sc) (Nelson *et al.*, 1983).

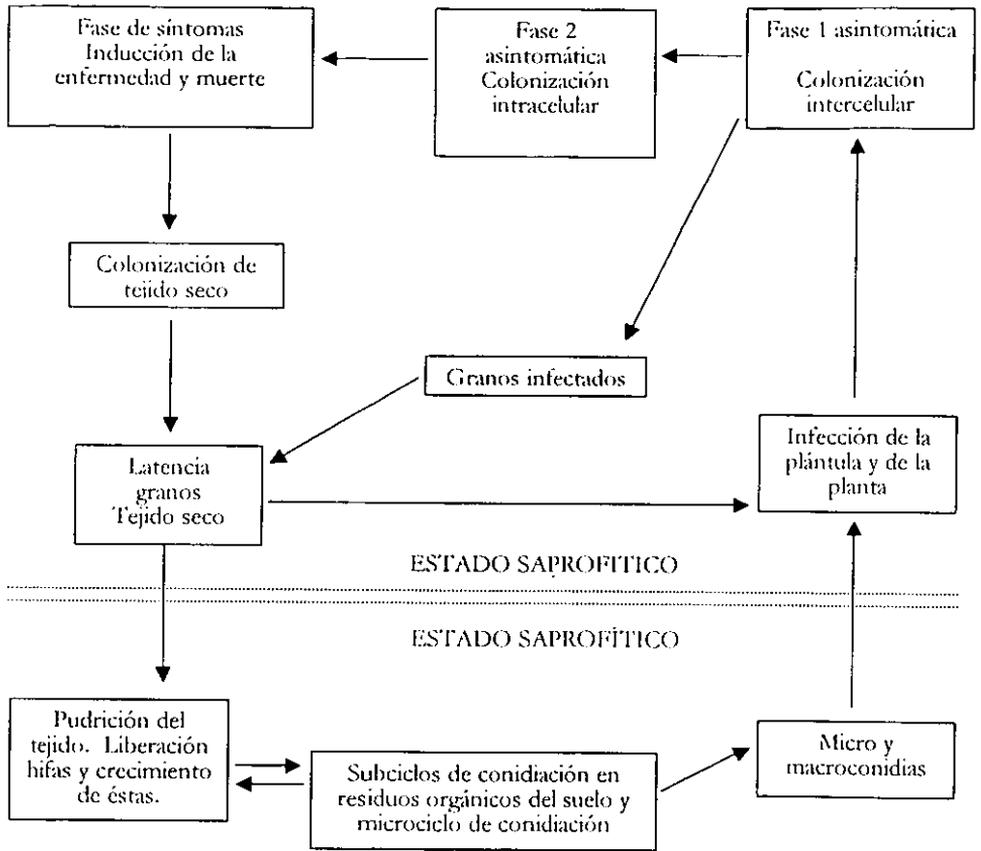


Figura 4. Ciclo de vida de *Fusarium moniliforme* como saprófito y como patógeno de maíz. La ruta sistémica de infección puede resultar en la colonización endofítica. El portal de infección puede ser por la semilla o por la raíz de la plántula. (Bacon y Hinton, 1996).

### 3. INTERACCIÓN PLANTA-PATÓGENO

Las plantas son susceptibles a infecciones por un amplio rango de parásitos, incluyendo virus, bacterias, hongos, nemátodos, insectos e incluso otras plantas. Prácticamente cualquier órgano de la planta puede ser invadido durante distintas etapas de su desarrollo y dependiendo de la severidad se puede tener una pérdida total de la planta (McDowell y Dangl, 2000).

Las bacterias pueden ser patógenos necrotróficos, que infectan a la planta macerando el tejido a través de secreción de enzimas que degradan pectina, causando una pudrición blanda en varios tejidos. Muchas bacterias (*Pseudomonadaceae* y *Enterobacteriaceae*) son colonizadoras y permanecen en la pared celular; las especies que son intracelulares en los diferentes órganos de la planta causan la muerte de las células donde se encuentran (Jackson y Taylor, 1996; Alfano y Collmer, 1996).

En el caso de los hongos tanto los inferiores (*Plasmodiophoromycetes*, *Chitridomycetes* y *Oomicetes*) como los hongos superiores (*Ascomycetes*, *Basidiomycetes* y *Deuteromycetes*), son patógenos de las plantas. Éstos presentan varias formas de vida, desde parásitos obligados hasta parásitos facultativos que son capaces de atacar a las plantas solo bajo ciertas condiciones ambientales (Jackson y Taylor, 1996). Por otro lado, los nemátodos pueden también tener profundos efectos en el metabolismo de la planta y en algunos casos pueden afectar la arquitectura de la raíz. Todos los nemátodos son parásitos obligados que obtienen los nutrientes del citoplasma de las células vivas de la planta. Algunos nemátodos son ectoparásitos que viven fuera del hospedero y al infectar causan severos daños a la raíz y pueden ser importantes vectores de virus. Otras especies son endoparásitas las cuales se mueven a través de la raíz causando una necrosis celular masiva (Williamson y Hussey, 1996; Jackson y Taylor, 1996).

A pesar de que las plantas están expuestas a todo tipo de patógenos, muchas resisten a la invasión de microorganismos ya que pueden detectar la llegada de éstos y responder al ataque mediante una serie de eventos bioquímicos intracelulares inducidos como la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs), refuerzo de la pared celular, producción de proteínas RP y producción de compuestos antimicrobianos que restringen el paso hacia las demás células. Todos estos eventos conforman lo que se les denomina respuesta de hipersensibilidad.

### 3.1. Reconocimiento planta-patógeno

Las plantas son capaces de responder a la presencia de un microorganismo patógeno cuando éste secreta algún compuesto o genera una herida en el tejido. Estas señales químicas que genera el patógeno o la planta en respuesta a éste, se denominan elicitores. Se cree que algunos elicitores interactúan con receptores por unión específica iniciando la transmisión de la señal intracelular. La conversión de esta señal a través de una cascada de transducción, resulta en la inducción de una respuesta celular caracterizada por la activación transcripcional de varios genes de defensa. Se ha demostrado la presencia de receptores de alta afinidad en la membrana plasmática de la célula vegetal que se unen a varios tipos de elicitores derivados de hongos fitopatógenos. Algunos de los eventos intracelulares que se generan en respuesta son cambios en la permeabilidad de la membrana plasmática, generación de especies reactivas de oxígeno y alteraciones en el estado de fosforilación de varias proteínas (Boller, 1995).

La naturaleza química de los elicitores es muy diversa y se han caracterizado oligosacáridos, proteínas, glicoproteínas, lípidos como el ácido araquidónico y cerebrosidos, o compuestos lipofílicos (nistatina, amfotericina b y digitonina). Dentro de los oligosacáridos se han identificado oligoglucanos, oligoquitina y oligoquitosan de hongos y oligogalacturónidos de origen vegetal. Los elicitores glucanos son compuestos de residuos de 3-, 6- y 3,6-unioniones de  $\beta$ -glucosil. Los  $\beta$ -glucanos de composición similar, son de los principales componentes de la pared celular de varios hongos filamentosos y también han sido aislados de extracto de levaduras (Ebel, 1998).

Las glicoproteínas o glicopéptidos de hongos que actúan como elicitores presentan una actividad que radica en sus cadenas laterales de carbohidratos y no en la secuencia de sus aminoácidos. Los glicopéptidos que presentan cadenas laterales de las cuales contienen ocho residuos de manosil presentan poca actividad como elicitores, pero los que presentan cadenas laterales de 9 a 11 residuos de manosil son potentes (Ebel, 1998).

Existe un gran número de elicitores proteínicos que son derivados de diferentes fitopatógenos, como las elicinas aisladas del oomiceto *Phytophthora* sp. las cuales inducen necrosis en tabaco a una concentración de  $\sim 2 \times 10^{-9}$  M y las xilanasas de *Trichoderma viride*. También bacterias del género *Pseudomonas*, *Xanthomonas* y *Erwinia* producen elicitores de origen peptídico siendo la más común y abundante las harpinas. Algunos polipéptidos producidos por

hongos fitopatogénicos producen una respuesta hipersensible sólo en cultivos específicos de plantas. El péptido NIP1 (necrosis-inducing peptides) producido por *Rhynchosporium secalis* (deuteromiceto) induce una reacción de defensa en cebada y los péptidos AVR en la interacción de *Cladosporium fulvum* con la planta de tomate. En ambas interacciones se produce necrosis (Boller, 1995).

Las sustancias lipofílicas pueden acumularse en membranas y afectar el metabolismo y, además pueden ser percibidas por un mecanismo específico quimiosensorio. La nistatina, anfotericina B y digitonina a concentraciones  $\sim 1 \times 10^{-5}$  M, inducen flujo de iones, producción de fitoalexinas y otras respuestas de defensa. Sin embargo, ciertas sustancias lipofílicas parecen ser percibidas de una manera selectiva y específica, como por ejemplo el ácido araquidónico el cual es un ácido graso importante en lípidos de *Phytophthora infestans*, un patógeno de papa, el cual elicitó la acumulación de fitoalexinas en el tejido del tubérculo de la papa, posiblemente la señal percibida por la planta no es el ácido araquidónico por sí mismo sino un metabolito generado por la lipooxigenasa; entre otras sustancias lipofílicas se encuentran los siringólidos y el ergosterol (Boller, 1995). Recientemente, se ha encontrado que ciertos esfingolípidos (cerebrosido A y cerebroside B) tienen actividad elicitora. Estos esfingolípidos son secretados por un hongo patógeno de arroz, *Magnaporthe grisea*, provocando la producción de fitoalexinas y muerte celular en hojas de la planta. Estos compuestos contienen un grupo metilo en el C-9 y un doble enlace en la mitad de la base esfingoidea tanto para el cerebroside A como para el cerebroside B, los cuales son elementos claves que determinan su actividad como elicitores (Koga *et al.*, 1998).

## 3.2. Mecanismos de Defensa

### 3.2.1. Respuesta Hipersensible

Las respuestas incompatibles son frecuentemente asociadas con la aparición de manchas necróticas contenidas en células muertas de la planta, en sitios donde el patógeno intentó penetrar. Clásicamente esta respuesta hipersensible (RH) es definida como la muerte de células hospederas dentro de unas pocas horas del contacto con el patógeno, pero es fenotípicamente muy diversa, y se observa desde una sola célula hasta áreas necróticas más grandes que delimitan la colonización del patógeno.

La RH es un proceso intrínseco programado. Sin embargo, por número de eventos que provoca y morfologías de la muerte celular, existen probablemente varias vías por las cuales la célula puede morir. La célula atacada y las vecinas probablemente no reciben la misma señal tanto en cantidad como en calidad. En animales la severidad de la señal inicial puede determinar si las células entran a necrosis o apoptosis y lo mismo puede ser verdad en el caso de la RH. Así, tanto apoptosis como necrosis pueden presentarse en una sola región de RH. La RH también resulta de un conjunto interno de señales tanto de la planta como del patógeno.

Se ha propuesto que la RH juega un papel causal en la resistencia a las enfermedades. Sin embargo, existen algunos ejemplos donde la RH no es causal para la resistencia. En la interacción con patógenos biotróficos obligados que forman asociaciones haustoriales íntimas con células hospederas, la muerte celular puede privar al patógeno el acceso a los demás nutrientes. Bioquímicamente, la RH involucra la activación coordinada de eventos complejos; uno de los eventos detectados en los primeros minutos es la generación de especies reactivas de oxígeno que incluyen peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), anión superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) y radical hidropéroxil ( $HO_2^{\bullet}$ ). Se cree que éstos dirigen las siguientes respuestas: entrecruzamiento oxidativo de la pared celular, acumulación de compuestos fenólicos y fitoalexinas, inducción de un amplio rango de proteínas relacionadas con la patogénesis y la activación de proteasas e inhibidores de proteasas dando como consecuencia final la muerte de una o un grupo de células hospederas en el sitio de infección (Piffanelli *et al.*, 1999).

### 3.2.2. Especies reactivas de oxígeno

La producción de EROs probablemente juega un papel clave en la defensa de la planta. Frecuentemente es la primera respuesta activada en muchas de las interacciones incompatibles y esto puede provocar que se inicie la RH. Se ha demostrado que las plantas tienen un mecanismo para la producción de  $O_2^{\bullet-}$  que involucra un homólogo de la NADPH óxidasas de mamíferos. El  $O_2^{\bullet-}$  generado es rápidamente dismutado, ya sea por una vía no enzimática o por la acción de la superóxido dismutasa generando  $H_2O_2$ . Debido a que el  $H_2O_2$  no tiene electrones desapareados, puede cruzar la membrana plasmática fácilmente, mientras que las especies  $O_2^{\bullet-}$  cargadas lo hacen muy lentamente (Wojtaszek, 1997).

Tanto el  $H_2O_2$  como el  $O_2^{\bullet-}$  son moderadamente reactivos, sin embargo, el daño celular por EROs parece ser debido a su conversión a especies más reactivas. La protonación de  $O_2^{\bullet-}$ ,

favorecida a pH bajo, produce  $\text{HO}_2^\bullet$ , que es menos polar que el  $\text{O}_2^{\bullet-}$  por lo tanto capaz de cruzar membranas biológicas. A diferencia del  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , el  $\text{HO}_2^\bullet$  puede reaccionar con los ácidos grasos directamente y se ha mostrado que es capaz de peroxidar a los ácidos linolénico, linoleico y araquidónico. Así, bajo condiciones apropiadas, la generación de  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , lleva a la formación de  $\text{HO}_2^\bullet$  que resulta en el daño de la membrana y la formación de un arreglo de lípidos peroxidados como moléculas señal (Wojtaszek, 1997).

En presencia de  $\text{Fe}^{2+}$ , el  $\text{H}_2\text{O}_2$  entra a la reacción de Fenton generando  $\text{HO}_2^\bullet$ , el cual es extremadamente destructivo, y puede iniciar la peroxidación autoperpetuante de lípidos. Si el  $\text{H}_2\text{O}_2$  que entra al citoplasma de la célula permanece a una concentración suficiente para enriquecer el núcleo del patógeno o de la planta, éste puede reaccionar con iones metálicos intracelulares para producir  $\text{HO}_2^\bullet$ , éste puede fragmentar al ADN por un ataque sitio específico. Así la producción de EROs puede resultar en un daño considerable tanto para el hospedero como para el patógeno y es requerido por las células de la planta para activar una serie de mecanismos de protección (Dat *et al.*, 2000).

Se han propuesto diversas funciones de los EROs en la defensa de la planta. Por ejemplo, el  $\text{H}_2\text{O}_2$  puede ser directamente tóxico a microbios a niveles que se producen en los tejidos vegetales y también puede contribuir al reforzamiento de la pared celular de la planta. El  $\text{H}_2\text{O}_2$  es esencial para la formación de precursores del polímero de lignina vía actividad peroxidasa y se ha demostrado que glicoproteínas ricas en hidroxiprolina o prolina son rápidamente oxidadas en pared celular después del tratamiento con elicitores de hongos. Un papel en la señalización de algunos EROs también es posible; el  $\text{H}_2\text{O}_2$  incrementa la actividad enzimática de la 2-ácido benzoico hidroxilasa (BA2-H), la cual es requerida en la biosíntesis de ácido salicílico (Hammond-Kosack y Jones, 1996).

### 3.2.3. Refuerzo de la pared celular

Los patógenos pueden atravesar la cutícula y/o la pared celular de la planta para llegar al interior de la célula, aunque a veces la penetración ocurre a través de una apertura natural hecha por algún daño mecánico. El refuerzo de la pared celular de la planta puede aumentar la resistencia de varias maneras, por ejemplo, para biótropos\* extracelulares, el sellado de la pared

---

\* Aplicable al parásito que se nutre a expensas de las células vivas del hospedante.

puede impedir la salida de contenido citoplásmico, de ese modo reducen la disponibilidad de nutrientes para el patógeno (Cassab, 1998).

Los patógenos producen cutinasas y enzimas hidrolíticas, tales como pectinasas, celulasas, xilanasas y poligalacturonasas que atacan varios de los polímeros de pared celular del hospedero. La presión mecánica también puede facilitar la entrada del microbio. Ninguna de las enzimas anteriormente mencionadas, por si solas, son cruciales para la patogénesis, pero su actividad produce fragmentos de la pared celular (oligómeros de ácido galacturónico) los cuales pueden inducir respuestas de defensa adicionales o amplificar la original.

Dentro de los mecanismos de refuerzo de pared celular se encuentran la producción de papilas, producción de calosa, síntesis de proteínas ricas en hidroxiprolina y producción de lignina. Las papilas se forman inmediatamente por debajo del sitio de penetración y son heterogéneas en composición (compuestas principalmente de calosa y lignina); se piensa que éstas bloquean físicamente la penetración del hongo a las células hospederas. Sin embargo también es posible que su formación sea requerida para proporcionar un soporte adecuado para el subsiguiente desarrollo del haustorio, en tal caso éstas podrían ser esenciales para la patogénesis.

La rápida deposición de calosa en pared celular está frecuentemente asociada a sitios de incompatibilidad del patógeno. La deposición de calosa se ha observado en cultivos celulares de plantas expuestos a elicitores derivados de patógenos, o cuando el tejido de la planta es dañado mecánicamente así como en la infección de plantas completas. La enzima sintasa de calosa constitutiva está localizada en la membrana plasmática y cataliza la formación del polímero  $\beta$ -1,3-glucano y requiere niveles elevados tanto del cebador  $\beta$ -furfuril- $\beta$ -glucósido como de  $\text{Ca}^{2+}$  para su actividad. El bloqueo de los plasmodesmata con la calosa es un componente esencial de la respuesta de defensa requerida para impedir el movimiento de virus de célula a célula. Se piensa que las glicoproteínas ricas en hidroxiprolina básica juegan un papel clave en la organización de la arquitectura primaria de la pared celular y que pueden actuar como el foco para la iniciación de la polimerización de la lignina. Un grupo de genes de HRGP son también lentamente inducidos en respuesta a la invasión de un patógeno incompatible, indicando que la síntesis *de novo* de HRGP es una respuesta relativamente tardía. En contraste, el entrecruzamiento oxidativo rápido de proteínas HRGPs y RP por las uniones inter o intramoleculares de isoditrosina pueden constituir una de las respuestas de defensa

tempranas acompañada de la explosión oxidativa. Las extensinas pueden también servir como un tipo de estructuras atrayentes de pared celular, capaces de inmovilizar ciertos patógenos de plantas. Un mecanismo adicional pero lento que hace a la pared celular más impermeable es el aumento del contenido de lignina local (Hammond-Kosack y Jones, 1996).

#### **3.2.4. Proteínas RP y otras proteínas relacionadas con la defensa**

El término proteínas RP (relacionadas con la patogénesis) fue usado en un principio para describir numerosas proteínas extracelulares acumuladas en respuesta a la infección por el virus del mosaico del tabaco en un genotipo susceptible. Subsecuentemente en las interacciones planta-patógeno se encontró una rápida inducción de diferentes genes RP asociados con la incompatibilidad. Más recientemente, la definición de proteínas RP se ha extendido para incluir proteínas localizadas intra y extracelularmente que se acumulan en tejido intacto de plantas o en cultivo de células después del ataque del patógeno o del tratamiento con algún elicitador (Kitajima y Sato, 1999).

Varias proteínas RP poseen actividad antifúngica o antibacterial *in vitro* y ahora se conoce la identidad de algunas de ellas como quitinasas, glucanasas o de unión a quitina. La degradación de polisacáridos estructurales, o la alteración de la arquitectura de la pared celular de hongos puede impedir o reducir severamente el crecimiento de éstos. Se ha reportado que las proteínas RP básicas, encontradas en la vacuola, presentan una actividad antifúngica más efectiva que las proteínas RP ácidas las cuales son secretadas por la célula de la planta. Todo esto sugiere que la actividad coordinada de varios genes RP es necesaria para la resistencia (Hammond-Kosack y Jones, 1996).

#### **3.2.5. Fitoalexinas**

Las fitoalexinas son compuestos antimicrobianos, lipofílicos, de bajo peso molecular que se acumulan rápidamente en los sitios alrededor de infecciones de patógenos incompatibles y en respuesta a una gran variedad de elicitores bióticos y abióticos. La biosíntesis de fitoalexinas puede ocurrir a partir de tres rutas metabólicas: la ruta de acetato-malonato, la de acetato-mevalonato y la ruta de ácido shiquímico. Esta diversificación proviene de la inducción *de novo* de enzimas tales como la fenilalanina amonio liasa (PAL), que controlan puntos claves de ramificación en la ruta biosintética. Sin embargo, debido a que la síntesis de muchas fitoalexinas requiere de la actividad de numerosas enzimas, los eventos de señalización

altamente coordinados son necesarios para que en las células atacadas puedan establecer exitosamente este tipo de respuesta.

Las fitoalexinas son compuestos que no se les ha asignado un papel específico de entre ser un compuesto de defensa o ser solo una respuesta a la infección. Sin embargo, de acuerdo a Hammerschmidt (1999) existen varias líneas de evidencia que apoyan el papel de las fitoalexinas en la resistencia a la enfermedad y éstas son:

1. La localización y tiempo de acumulación en el tejido infectado con relación al desarrollo del patógeno.
2. La fuerte correlación positiva de la producción rápida de fitoalexinas con las interacciones incompatibles en sistemas de planta-patógeno gen por gen.
3. La asociación de la acumulación rápida de fitoalexinas con genes de resistencia que determinan la restricción rápida del desarrollo del patógeno.
4. El uso de inhibidores metabólicos que bloquean la producción de fitoalexinas e incrementan la susceptibilidad al patógeno.
5. La capacidad de algunos patógenos de metabolizar fitoalexinas, incrementa su virulencia.
6. Cuando se estimula la producción de fitoalexinas en el tejido de la planta antes de inocular al patógeno, este tejido incrementa su resistencia.

No obstante, aun con todos estos datos, todavía no esta claro el papel que puedan tener las fitoalexinas y más estudios definitivos son necesarios para determinar el papel de éstas en la defensa de la planta.

### **3.3. Mecanismos de señalización**

Dentro de los eventos de respuesta a patógenos, un aspecto importante son los mecanismos de señalización que transmitirán la señal inicial de percepción del patógeno hasta la activación de genes específicos, donde están involucradas moléculas con función de segundos mensajeros o moléculas clave que forman parte en las rutas de señalización específicas para activar a los diferentes genes de respuesta a patógenos.

#### **3.3.1. MAPKs en la transducción de señales**

Las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPKs) son encontradas en todos los eucariotes y su activación se basa en la fosforilación por otra MAPK cinasa, denominada

MAPKK, de residuos de treonina y tirosina conservadas. Solo una MAPKK puede activar a una MAPK específica. Asimismo, una MAPKK es activada por fosforilación a través de una cinasa que pertenece a una clase de proteínas MAPKK cinasa (MAPKKK). Este grupo de tres proteínas cinasas funcionalmente interconectadas (MAPK, MAPKK, MAPKKK) constituye el módulo de la ruta de las MAPKs. En el último paso de la activación MAPK citoplásmica se induce la traslocación de la MAPK hacia el núcleo, donde la cinasa activa cierto grupo de genes a través de fosforilar factores de transcripción específicos. En otros casos las cinasas pueden translocarse a otros sitios en el citoplasma para fosforilar enzimas específicas (lipasas, fosfatasa) o componentes del citoesqueleto. Por una estrecha regulación entre la localización de MAPK y a través de la expresión de ciertos componentes de señalización y sustratos en células, tejidos y órganos en particular, las rutas de MAPK pueden mediar la señalización de una multitud de estímulos extracelulares y provocar una variedad de respuestas específicas (Jonak *et al.*, 1999).

La fosforilación y desfosforilación de proteínas en las plantas se ha implicado en la activación de respuestas de defensa, donde se ha demostrado que en células de tabaco expuestas a un elicitador se activa una proteína cinasa con características de MAPK, que es idéntica a SIPK, una MAPK que fue previamente identificada y la cual se activa con ácido salicílico (Jonak *et al.*, 1999; Klessig *et al.*, 2000). En células de perejil un elicitador activa a ERMK (MAPK regulada por un elicitador), esta cinasa es rápidamente translocada hacia núcleo después del tratamiento con el elicitador, sugiriendo un papel directo de ERMK en la regulación de la transcripción de genes inducidos por elicitadores (Jonak *et al.*, 1999).

### 3.3.2. Ácido salicílico

Los patógenos incompatibles como hongos, virus o bacterias frecuentemente provocan la acumulación de concentraciones muy altas en la vecindad inmediata del sitio de infección tanto de ácido salicílico (AS) como de ácido benzoico (AB) y sus respectivos glucósidos conjugados. La inducción de estos compuestos es comúnmente asociada con la RH. La ruta bioquímica responsable de la biosíntesis de éstos compuestos durante la respuesta de defensa está relativamente bien establecida, pero su regulación puede diferir entre especies de plantas. El AS es derivado de la ruta de los fenilpropanoides pero al parecer la síntesis de éste no es regulada a nivel de la transcripción de PAL. En lugar de eso, la liberación de AB a partir de

conjugados preformados de AB induce a la citocromo P450 monooxigenasa (BA2-H) soluble que convierte AB en AS. La actividad enzimática es fuertemente inducida antes de la aparición de la RH. Sin embargo, en plantas como *Arabidopsis* sp. por ejemplo, el conjugado AB preexistente puede estar ausente. En estos casos, los niveles de AS requieren incrementos de la actividad de PAL (Hammond-Kosack y Jones, 1996).

No está claro si la biosíntesis de AS es causa o consecuencia de RH, pero ambas hipótesis pueden ser válidas. Por ejemplo, a altas concentraciones, el AS se ha reportado que inhibe la actividad de la catalasa. Esto puede exacerbar el estrés oxidativo como resultado del incremento de la síntesis de EROs. Sin embargo, las interacciones entre el AS y la catalasa y/o ascorbato peroxidasa pueden provocar daño por el radical libre de AS. La inhibición de catalasa por AS se piensa que ocurre vía incremento de un intermediario de catalasa a partir de una rápida reacción de reciclaje, la cual restaura la función de la enzima, dentro de muchas de las reacciones lentas de peroxidación del ciclo, lo cual resulta en atrapar a la catalasa en un estado inactivo y parcialmente reducido. Como el AS dona un electrón al compuesto I de catalasa, éste se convierte en una forma oxidada, AS. Este radical libre de AS puede iniciar la peroxidación de lípidos y puede modificar otras macromoléculas. Sin embargo, el radical libre de AS no inhibe a las peroxidasas involucradas en la biogénesis de lignina (Ryals *et al.*, 1996; Klessig *et al.*, 2000).

Otro papel para el AS en la defensa de la planta, es que puede ser un compuesto antimicrobiano. Además, la aplicación exógena de AS induce la coordinación de la expresión de un grupo de genes RP en numerosas especies de plantas. Los niveles elevados de AS pueden también inhibir la expresión de genes inducidos por daño, bloqueando la biosíntesis de ácido jasmónico (AJ). Así, en sitios de incompatibilidad microbiana mediada por genes R-Avr, niveles elevados de AS deben asegurar que la respuesta de defensa requerida para la detención del crecimiento microbiano es activada, mientras aquellas contra las mordidas de insectos y la migración de nemátodos no sean inducidas innecesariamente (Hammond-Kosack y Jones, 1996).

Durante la última década, mucha de la investigación en las interacciones de planta-patógeno se ha enfocado en determinar el papel del AS como molécula de señalización en la activación de varias respuestas de defensa en la planta. Éstas respuestas incluyen la inducción local y sistémica de resistencia en la enfermedad y la activación de la muerte celular

programada. Los mecanismos a través de los cuales el AS media este efecto son variados e involucra cambios en la actividad o síntesis de ciertas enzimas, incrementando la expresión de genes de defensa y la potenciación de varias respuestas de defensa (Hammond-Kosack y Jones, 1996).

## 4. PROTEÍNAS INVOLUCRADAS EN LA RESPUESTA DE DEFENSA A PATÓGENOS

La activación de ciertas enzimas en éstos eventos de señalización es importante y característica para la defensa en plantas. Algunas de estas proteínas son claves en el metabolismo activado durante una interacción planta-patógeno como por ejemplo 1) la fenilalanina amonio liasa, enzima clave en la ruta de fenil propanoides, 2) la catalasa la cual tiene un papel importante en el estrés oxidativo, y por otra parte 3) enzimas y proteínas que son secretadas para la defensa directa de la planta como la proteína rica en hidroxiprolina que refuerza la pared celular, las quitinasas y glucanasas, enzimas líticas que degradan la pared celular de los hongos.

### 4.1. Glicoproteínas ricas en hidroxiprolina

La pared celular es una entidad molecular compleja compuesta de polisacáridos, lignina, suberina, ceras, proteínas, enzimas, calcio, boro y agua que tienen la habilidad de autoensamblarse. Su complejidad es indispensable para la adaptación de las plantas a los diversos ambientes ya que protege a las células del ataque de patógenos y les proporciona rigidez. La superestructura de la pared celular también tienen propiedades de asociación con el sistema núcleo-citoplásmico vía plasmodesmos, membrana plasmática y citoesqueleto estableciendo una comunicación del medio externo con el interno (Cassab, 1998).

Durante los periodos de crecimiento y desarrollo o por efectos de estrés ambiental y/o infección, la pared celular se modifica continuamente por acción enzimática. Las proteínas localizadas en la pared celular son ubicuas y relativamente abundantes en plantas y en algas verdes. Estas proteínas son ricas en uno o dos aminoácidos, dependiendo de la familia, tienen dominios de secuencias altamente repetitivos y algunas de ellas se encuentran glicosiladas. Entre las proteínas más abundantes se encuentran las glicoproteínas ricas en hidroxiprolina (HRGP: hydroxyproline-rich glycoproteins) o extensinas, las proteínas arabinogalactanos, las proteínas ricas en glicina, las proteínas ricas en prolina, y las proteínas quiméricas que contienen dominios parecidos a las extensinas (McNeil *et al.*, 1984).

La secuencia de las HRGPs está constituida por elementos altamente repetidos, que en las dicotiledóneas tienen la secuencia: SPPPP, donde los residuos de prolina se modifican a hidroxiprolina y son codificadas por una familia multigénica. En contraste, para maíz, las HRGPs son codificadas por un solo gen y la principal parte de la secuencia de su proteína tiene una estructura repetitiva formada por el hexapéptido (PPIYTP) seguido por otros dos o tres pentapéptidos (SPKPP-TPKPT o SPKPP-ATKPP-TPKPT, respectivamente). La secuencia del ADNc de la HRGP de maíz abarca 1.8 Kb. Hacia el extremo 5' de la caja TATA, se encuentran varias secuencias repetitivas y segmentos de polipurina-polipirimidina. La región 5' no es interrumpida por intrones, sin embargo un intrón está presente en la región 3' no traducible (Raz *et al.*, 1992). La estructura primaria de la proteína deducida a partir de la secuencia de nucleótidos incluye varios bloques que pueden tener diferentes funciones estructurales en la pared. Una secuencia señal hidrofóbica está presente en el extremo amino y ausente en la proteína madura, presumiblemente debido a un procesamiento durante su paso del retículo endoplásmico hacia la pared. La proteína madura comienza con una región de ocho aminoácidos ricos en glicina y tirosina (Stiefel *et al.*, 1990).

Las HRGPs muestran un alto grado de conservación entre todos los elementos repetidos a lo largo de su secuencia. Estas secuencias varían entre especies de dicotiledóneas y monocotiledóneas, y/o a gimnospermas, y/o algas verdes, aunque existen notables similitudes entre ellas. Sin embargo, todas las extensinas son ricas en Hyp y Ser y en alguna combinación de los aminoácidos Val, Tyr, Lys e His; muchos de los residuos de Hyp son glicosilados de uno a cuatro residuos y presentan uniones covalentes con otras proteínas de pared a través de una unión de isoditrosina (Cassab, 1998).

Las extensinas parecen contribuir a la defensa de la planta, ayudando a protegerla contra el ataque de los patógenos, elicitación, o daño mecánico. Estudios inmunoquímicos han mostrado que las extensinas se acumulan en la pared celular cerca de los sitios donde el crecimiento microbiano es restringido por la planta. Existen evidencias que muestran que las extensinas actúan como barreras físicas impenetrables o quizá inmovilizando a los patógenos por unión a sus superficies; esto último probablemente resulta de la interacción iónica de las moléculas de extensinas cargadas positivamente con las superficies de los patógenos cargados negativamente. Además, se ha demostrado que cuando se incuba pared celular con elicitores fúngicos por 30 minutos, su estructura se modifica y presentan una mayor refracción a enzimas

de digestión. Elicitores y supresores que se acumulan de las extensinas son degradados de la pared celular por la endopoligalacturonasa purificada de patógenos. También los pequeños galacturónidos pueden provocar la expresión de genes de extensinas y elicitan un incremento del 40 al 70% en el contenido de Hyp de la pared celular. En contraste, fragmentos pépticos de alto peso molecular, compuestos de ácido galacturónico, con pocos constituyentes de RG II, tienen la habilidad de suprimir la deposición de Hyp en la pared celular y la expresión de genes de extensinas. Además de la defensa, fragmentos pépticos, probablemente juegan un papel importante durante el desarrollo de la planta en situaciones donde la célula necesita ser distendida o reforzada, por ejemplo en la germinación del polen, la maduración de la fruta, la elongación celular y respuestas al daño mecánico. La regulación de las extensinas por supresores endógenos en ciertos estados del crecimiento celular y en el desarrollo puede explicar la relación inversa ampliamente reportada entre los niveles de extensina en la pared celular y el alcance de la elongación celular. Así, la pared celular lleva su propia información, por ejemplo señales que regulan su propia biogénesis (McNeil *et al.*, 1984, Cassab, 1998).

## 4.2. Fenilalanina amonio liasa

Los fenil propanoides son sintetizados durante el proceso normal del desarrollo y también bajo ciertas condiciones de estrés tales como radiación UV, heridas mecánicas y ataque por patógenos (Dixon y Lamb, 1990). Una enzima clave en esta ruta es la fenilalanina amonio liasa (PAL) que cataliza la eliminación de amonio de la fenilalanina para producir ácido (E)-cinámico en el primer paso en la ruta de los fenilpropanoides (Orr *et al.*, 1993). Los productos intermediarios de esta ruta biosintética sirven también como precursores de un gran número de compuestos fenólicos que incluyen lignina, compuestos aromáticos, pigmentos flavonoides, protectores de UV, furanocumarinas, fitoalexinas isoflavonoides y ésteres de ácido hidroxicinámico (Hahlbrock y Grisebach, 1975; Diallinas y Kanellis, 1994). Por mucho tiempo se pensó que la PAL desplegaba una cooperatividad negativa, atribuida a efectos alostéricos del sustrato en la enzima tetramérica pero, cuando se purificó la enzima de cultivo de células en suspensión de frijol y alfalfa se demostró que estas especies expresan múltiples formas de PAL con diferentes propiedades cinéticas. Una isoenzima PAL sola despliega una cinética Michaelis-Menten, pero la mezcla de isoenzimas muestran una cooperatividad negativa característica de

PAL, previamente considerada. Las subunidades de PAL son típicamente codificadas por una familia multigénica en angiospermas, de dos a cuarenta diferentes miembros dependiendo de la especie. Los genes que codifican diferentes subunidades de PAL muestran patrones de expresión tejido-específicos en varias angiospermas (Pellegrini *et al.*, 1994).

La PAL de monocotiledóneas, además de utilizar fenilalanina también utiliza tirosina (actividad TAL), mientras que en dicotiledóneas solo utilizan eficientemente fenilalanina (Rösler *et al.*, 1997). Los valores de  $K_m$  de la PAL purificada de maíz son  $270 \mu M$  para Phe y  $29 \mu M$  para Tyr. La enzima en esta especie está codificada por un solo gen (Rösler *et al.*, 1997).

La actividad de PAL responde a varios estímulos externos como son luz, heridas, presencia de un elicitador fúngico e infección de microorganismos patógenos así como de los requerimientos en el desarrollo de la planta (Diallinas y Kanellis, 1994). La enzima activa de maíz parece estar compuesta de un homotetrámero, cada uno con un sitio activo. La dehidroalanina fue identificada como un constituyente esencial del centro catalítico. Se ha demostrado que estas enzimas no requieren de cofactores, sin embargo, se ha encontrado que un tiol libre en el sitio activo es esencial en algunos casos. (Hahlbrock y Grisebach, 1975).

### 4.3. Catalasas

Las plantas tienen distintas enzimas y metabolitos antioxidantes localizados en diferentes compartimientos celulares de la planta; los principales son: la superóxido dismutasa (SOD), que pertenece a una familia de metaloproteínas que catalizan la dismutación de  $O_2^{\bullet -}$  a  $H_2O_2$ ; las catalasas (CATs) son hemoproteínas que catalizan la remoción de  $H_2O_2$ , y los componentes del ciclo del glutatión ascorbato (enzimas y metabolitos), los cuales están involucrados en la eliminación de  $H_2O_2$ . Estas últimas son las más importantes en la remoción del  $H_2O_2$ . Aunque las propiedades y requerimientos son diferentes, estas proteínas funcionan efectivamente en paralelo. La catalasa no requiere de poder reductor y tiene una alta velocidad de reacción pero una baja afinidad por el  $H_2O_2$  de tal modo que solo lo elimina cuando hay una concentración alta. La capacidad antioxidante es entonces dependiente de la severidad del estrés, así como de la especie vegetal y su estado de desarrollo. La mayoría de estas enzimas se han encontrado en cloroplasto, citosol, mitocondrias y peroxisomas (Bolwell y Wojtaszek, 1997).

Existen tres isoformas principales de catalasas caracterizadas en varias especies de plantas; las catalasas clase I incluyen la SU2 de algodón, Cat1 de *Nicotiana plumbaginifolia*, y CAT-2 de *Zea mays*. Su nivel de expresión es muy alto en hojas, son dependientes de luz y están involucradas en la remoción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante la fotorespiración. Las catalasas clase II incluyen la Cat2 de *N. plumbaginifolia*, CAT2 de frijol, CAT3 de maíz, una catalasa de tomate, Cat2St de papa y CAT1 de *Arabidopsis thaliana*; estas proteínas se encuentran principalmente en tejido vascular. Finalmente, las catalasas clase III incluyen SU1 de algodón, Cat3 de *N. plumbaginifolia*, CAT1 de frijol, CAT-1 de maíz y CAT3 de *A. thaliana* y están involucradas principalmente en la remoción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de glioxisomas y son muy abundantes en semillas y plantas jóvenes. La expresión de los genes de catalasa se regulan durante el desarrollo pero también son fotoactivadas por luz moderada y las diferentes catalasas responden a estrés por temperatura. Se ha reportado que las catalasas responden a otros tipos de estrés, como el ataque de patógenos. En maíz, CAT3 es más sensible a la temperatura que CAT1. Generalmente, la actividad de catalasa es inhibida a temperatura baja y durante el estrés por calor (Dat *et al.*, 2000).

En maíz, tres genes estructurales no relacionados, *Cat1*, *Cat2* y *Cat3* codifican para tres isoenzimas bioquímicamente distintas, CAT1, CAT2 y CAT3. Cada uno de los genes *Cat* tiene un patrón de expresión temporal y espacial, específico y cada una de estas proteínas responde diferencialmente a varios estímulos ambientales. Además, las isoenzimas catalasas muestran especificidad celular y de organelos. Por ejemplo la CAT-2 primero aparece durante el desarrollo tardío del grano e incrementa dramáticamente en el escutelo después de la germinación. CAT-2 está ausente en hojas etioladas pero rápidamente se sintetiza cuando se sobreexpone a la luz debido a un incremento en la acumulación y traducción del mensaje de *Cat2*. Así, a diferencia de *Cat1* la cual no responde a la luz y la *Cat3* la cual es controlada por un reloj circadiano, *Cat2* es positivamente regulada por la luz de manera específica para cada tejido (Guan *et al.*, 1996).

Existe solo una copia del gen *Cat2* en el genoma de maíz. La región codificante del gen de *Cat2* contiene 5 intrones cortos (78 a 113 pb) que poseen el sitio consenso para el corte y empalme (GT 5' donador y AG 3' aceptor). La región codificante de *Cat2* tiene un tamaño de 1532 pb y el codon de iniciación, AGT, está a 53 pb del sitio +1. Una caja TATA (-43) y las secuencias (GCCGGG a -114, GGGCAG a -570), las cuales son homólogas a las secuencias

consenso de unión a Sp1 (caja GC). Una caja de pirimidina (CCITT) y una caja I (GCAGTG) las cuales son parte de la respuesta a AG se localizan en -280 y -256. Dos secuencias de 8 pb (CACGTCGC, CACGTAAC) las cuales son similares a un elemento de respuesta a ABA (ABRE, CACGTGGC) se encuentran en -308 y -648. La secuencia central del elemento de respuesta a ABA (ACGT) es el sitio de unión a el zipper, básico de leucina del factor transcripcional o factores regulatorios de plantas (CPRFs). Un elemento similar a CE1 es localizado cerca del segundo ABRE a -636. Una secuencia repetida de 6 pb invertida (CGGCCG, GCGCCG). Un elemento de 11 pb cerca del sitio +1 (GGTGACCTTGC) el cual es idéntico a un elemento de respuesta antioxidante (ARE, PGTGACNNNGC) de la subunidad "Ya" de la glutatión S-transferasa. El ARE podría ser un elemento que activa genes que protegen a las células eucariotes contra el estrés oxidativo (Guan *et al.*, 1996).

#### 4.4. Proteínas relacionadas con la patogénesis

Las plantas responden al ataque de un patógeno con una serie de mecanismos acompañados por la inducción de proteínas denominadas "proteínas relacionadas con la patogénesis". Estas fueron encontradas originalmente en hojas de tabaco pero desde entonces se han descrito en varias plantas como jitomate, papa, maíz, cebada, frijol y perejil. La expresión de estas proteínas puede ser inducida por varios agentes infecciosos como virus, hongos, viroides y bacterias, por productos derivados de éstos (elicitors) o por agentes químicos como derivados del ácido benzoico o nitrato de plata, ácido poliacrílico o por hormonas. Sin embargo también se ha reportado en tejidos específicos durante el desarrollo en ausencia de un patógeno (Van Loon y Van Strien, 1999).

En maíz, las proteínas RP se han clasificado en tres familias: las endoquitinasas, las endoglucanasas y una familia, incluyendo la PRm2, la cual presenta similitudes con el grupo PR1 de tabaco de acuerdo a pruebas serológicas y las propiedades de la proteína (Casacuberta *et al.*, 1991).

##### 4.4.1. Quitinasas

La quitina es el segundo polímero más abundante en ciertos organismos como insectos, crustáceos y en varios hongos (3-60%), los cuales incluyen importantes patógenos de plantas. Las plantas por su parte responden al ataque de microorganismos patogénicos induciendo la

expresión de un gran número de genes dentro de los cuales se encuentran las quitinasas que son enzimas que catalizan la hidrólisis de quitina, un poli- $\beta$ -1,4-N-acetilglucosamina (GlcNAc), un homopolímero lineal de residuos N-acetilglucosamina con uniones  $\beta$ -1,4 (GlcNAc); substratos alternativos son peptidoglicanos de bacterias, la quitina soluble derivado de glicol quitina y en algunos casos quitosan. Las quitinasas normalmente tienen un amplio rango de pH al cual actúan pero tienen actividad máxima a pH 6 y son estables a temperaturas por arriba de 50°C. Se ha reportado la glicosilación para quitinasas ácidas de toloache, frijol y zanahoria (Collinge *et al.*, 1993).

Las quitinasas pueden ser clasificadas en dos categorías principales las endoquitinasas y exoquitinasas; las endoquitinasas las cuales hidrolizan a la quitina en sitios internos al azar generando multímeros de GlcNAc de bajo peso molecular (quitotetraosa, quitotriosa y el dímero di-acetilquitobiosa). Las endoquitinasas de plantas son proteínas con un peso molecular que varía de 25 a 35 KDa dependiendo de la especie, estas proteínas se presentan como monómeros y tienen puntos isoeléctricos extremos, tanto en el rango ácido como básico. Las exoquitinasas pueden ser divididas en dos subcategorías: las quitobiosidasas, las cuales catalizan la liberación progresiva de diacetilquitobiosa comenzando en el extremo reductor de la microfibrilla de quitina; y la 1-4- $\beta$ -N-acetilglucosaminidasa, la cual corta los productos oligoméricos de las endoquitinasas y quitobiosidasas generando monómeros de GlcNAc.

Las quitinasas de varios organismos presentan similitudes en su secuencia de aminoácidos, y basándose en estas similitudes se han propuesto 5 clases agrupadas en dos familias de glicosil hidrolasas, la familia 18 y la familia 19. Esta última está formada por las quitinasas de las clases I, II y IV que son de origen vegetal y forman las glicosil hidrolasas. Estas quitinasas presentan un dominio catalítico homólogo, además del péptido señal encontrado en todas estas enzimas. La clase I de quitinasas presenta un dominio amino terminal rico en cisteínas unido al dominio catalítico por una región corta rica en glicina/prolina (péptido señal). El dominio rico en cisteínas (también referido como el dominio aglutinina de germen de trigo) es importante para la unión de quitina pero no para la actividad catalítica. Muchas de las quitinasas clase I tienen un péptido señal en el extremo carboxilo terminal que es esencial para dirigir a la proteína hacia la vacuola, por lo tanto se encuentran en vacuola pero algunas otras se encuentran en el apoplasto. Las quitinasas clase II se encuentran

principalmente en dicotiledóneas, pierden el dominio rico en cisteínas y la señal que las dirige hacia la vacuola en el extremo carboxilo terminal, indicando que estas quitinasas no se unen a quitina y son secretadas al apoplasto. Las quitinasas clase IV también se han identificado principalmente en dicotiledóneas, comprende un grupo de quitinasas extracelulares que presentan del 41-47% de identidad con las quitinasas clase I de un 41-47% en el dominio catalítico y también presentan regiones ricas en cisteína semejantes a los dominios de unión a quitina; sin embargo, las quitinasas de la clase IV son muy pequeñas por las deleciones en ambos dominios. Los estudios filogenéticos de las quitinasas de clase I, II y IV sugieren una gran distancia evolutiva entre las quitinasas de clase IV y la clase I y II, sugiriendo una divergencia remota (Cohen-Kupiec y Chet, 1998).

Los genes de quitinasas de plantas son inducidos en respuesta a la invasión de patógenos, tratamientos con elicitores, metales pesados y condiciones de estrés tales como exposición a la hormona etileno. Además, las quitinasas de plantas, ya sea solas o en combinación con la  $\beta$ -1,3-glucanasa inhiben el crecimiento micelial de un gran número de hongos. La expresión de quitinasas está también bajo control del desarrollo en ciertos tejidos y órganos incluyendo flores, raíces y hojas viejas de *Arabidopsis* y tabaco; en vainas de frijol y en granos de cereales (Collinge *et al.*, 1993; Cohen-Kupiec y Chet, 1998).

En maíz se han caracterizado de hojas dos diferentes clonas de ADNc. Basándose en la secuencia de nucleótidos, se obtuvo la secuencia de aminoácidos a partir de dos clonas las cuales aparentemente codifican para la clase I de las quitinasas y presentan las siguientes características: (a) una señal hidrofóbica; un dominio rico en cisteína de 40 aminoácidos (dominio de heveína); (c) un dominio bisagra de 24 aminoácidos con una región rica en prolina y en glicina y (d) un dominio catalítico (Wu *et al.*, 1994a).

En muchas plantas las isoformas ácidas y básicas de las quitinasas son codificadas por una familia multigénica. Estos genes son expresados diferencialmente durante el desarrollo y son inducidos por una variedad de estímulos ambientales y relacionados con la defensa (Huyuh *et al.*, 1992).

#### 4.4.2. Glucanasas

Las endo- $\beta$ -1,3-glucanasas ( $\beta$ Glu) son proteínas abundantes y ampliamente distribuidas en semillas de varias especies de plantas. Estas enzimas hidrolizan  $\beta$ -glucanos de hongos

fitopatógenos. Se ha reportado que las glucanasas en presencia de quitinasas pueden causar un rompimiento masivo de la pared celular de hongos fitopatógenos (Dixon y Lamb, 1990). Además, estas enzimas han sido implicadas en varios procesos fisiológicos y del desarrollo como división celular, microsporogénesis, germinación del polen, fertilización y germinación de la semilla (Beffa y Meins Jr., 1996). Las isoformas de estas enzimas muestran una regulación compleja hormonal, del desarrollo y relacionada a la patogénesis a nivel de ARNm. Son acumuladas a altas concentraciones en raíz y epidermis de hojas basales de plantas saludables, pero no en hojas jóvenes (cerca de la parte superior de la planta), son inducidas en hojas infectadas por patógenos, cuando las plantas son tratadas con etileno u ozono y en células en cultivo son reguladas por combinación de citoquinina y auxinas. En tabaco, la  $\beta$ -1,3-glucanasa es regulada al menos en parte a nivel de transcripción (Vögeli-Lange *et al.*, 1994).

Las  $\beta$ Glu han sido clasificadas en tres clases estructurales (tabaco) que difieren en su secuencia en aproximadamente 40-50% (Beffa y Meins, 1996). La clase I incluye al menos 3 isoformas básicas que se acumulan predominantemente en la vacuola y presentan una secuencia en el extremo carboxilo terminal que las dirige hacia la vacuola; la clase II incluye isoformas ácidas que se acumulan principalmente en el apoplasto; la clase III, incluye solo una isoforma ácida que se localiza en apoplasto con una diferencia en su secuencia del 43% comparándola con la clase I y II (Payne *et al.*, 1990). En maíz la clase II de  $\beta$ Glu se localiza extracelularmente (35 kDa) (Wu *et al.*, 1994b).

# II. ANTECEDENTES

## 1. FUMONISINA B1

### 1.1. Características de la molécula

Las micotoxinas fumonisinas, son producidas por varias especies del género *Fusarium*, del cual *F. moniliforme* y *F. proliferatum* son los más importantes productores por la cantidad que producen y por su ubicuidad. Existe un gran número de análogos de las fumonisinas, pero los más abundantes encontrados naturalmente en maíz son las fumonisinas de la serie B (figura 5). De acuerdo a la nomenclatura de la IUPAC la FB1 es un diéster de propano 1,2,3-ácido tricarbóxico de 2-amino-12,16-dimetil-3,5,10,14,15-pentahidrosicosano. Es una molécula anfipática con una región no polar conferida por la cadena alifática de 20 carbonos pero con cuatro grupos carboxilos que le confieren una alta polaridad y solubilidad en agua. La diferencia entre cada una de las fumonisinas es el número y posición de grupos hidroxilo, así como si el grupo amino se encuentra libre o esterificado (Figura 5B). El peso molecular de la FB1 es de 721 Da y es una molécula de baja volatilidad, debido a los ácidos carboxílicos que tienen la capacidad de formar puentes de hidrógeno cuando está en solución acuosa (Wilkes *et al.*, 1996). Los grupos funcionales en la estructura de FB1 que son relevantes tanto para su acción biológica como para su análisis son: la amina primaria y los ácidos tricarbóxicos esterificados. Los métodos analíticos para la cuantificación de la molécula involucran la determinación de un derivado del amino primario o la masa de la cadena alifática (Murphy *et al.*, 1996).

Aunque las fumonisinas se describieron inicialmente como los agentes causales de la degeneración encefálica en equinos alimentados con maíz mohoso (Gelderblom, 1988), se ha observado que también tiene actividad tóxica en otros organismos.

## 1.2. Efectos de la FB1 a nivel molecular en células animales

Wang *et al.* (1991) reportaron que las fumonisinas causan la acumulación de bases esfingoideas (esfingosina y esfinganina) en hepatocitos de rata e inhiben la actividad de la ceramida sintasa con un  $IC_{50}$  de  $0.1 \mu\text{M}$ . Esta enzima es la responsable de condensar a la esfinganina con acil CoA para formar ceramida.

A nivel celular se ha encontrado que FB1 induce apoptosis en varios tipos de células tanto *in vitro* como *in vivo* aunque los mecanismos todavía no son claros, ya que la susceptibilidad y tipo de respuesta varían de célula a célula. Tolleson y colaboradores (1996) han reportado que la FB1 es antiproliferativa en un gran número de tipos celulares humanos. En estudios usando una línea celular epitelial de riñón (LLPCPK) Yoo *et al.* (1992, 1996) encontraron una fuerte asociación entre la inhibición de la biosíntesis de esfingolípidos por FB1 ( $50 \mu\text{M}$ ) y la inhibición del crecimiento celular así como cambios morfológicos e incremento en la muerte celular. En células CV-1 (riñón de mono Africano), la FB1 inhibe la actividad de proteína cinasa C y disminuye la actividad de otras proteínas cinasas, a una concentración entre 1 y  $5 \mu\text{M}$  (Huang *et al.*, 1995). También, se ha observado que en estas células detiene el avance del ciclo celular, provoca muerte celular, induce la desfosforilación de la proteína de retinoblastoma y reprime la actividad de cinasas dependientes de ciclinas a una concentración de  $5 \mu\text{M}$  (Ciacci-Zanella *et al.*, 1998). Entre otros efectos la FB1 altera la morfología celular así como la interacción célula-célula, el comportamiento de proteínas de superficie celular y altera la regeneración y viabilidad celular en células LLC-PK1 (Merrill *et al.*, 1997). En fibroblastos Swiss 3T3, la FB1 ( $75 \mu\text{M}$ ) estimula la mitogénesis y activa transitoriamente a las isoformas de 44 y 42 KDa de la MAPK (Wattenberg *et al.*, 1996). En agregados de cultivo celular de telocéfalo de rata fetal, la FB1 (3, 10 y  $40 \mu\text{M}$ ) afecta selectivamente células de la glía, retarda el desarrollo de oligodendrocitos y altera la formación y deposición de mielina *in vitro* (Monnet-Tschudi *et al.*, 1999).

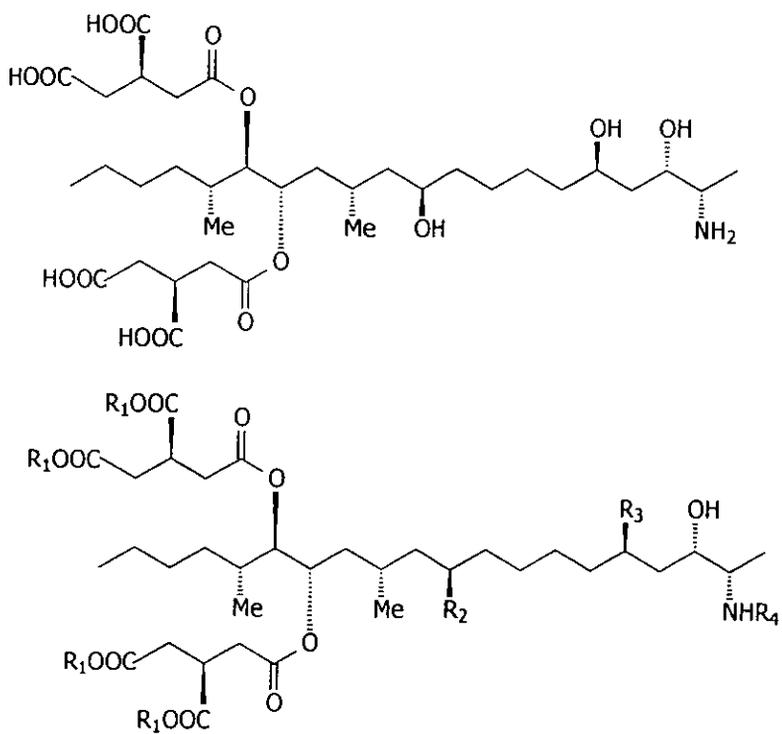
En macrófagos de pollo la FB1 induce la actividad fagocítica, mientras que en timocitos de ratón disminuye la expresión de receptores CD3 *in vivo* e *in vitro* (Dugyala *et al.*, 1998). En hígado de ratones machos expuestos a FB1 (250 mg/Kg) se observa un incremento en la expresión de TGF $\beta$ 1 y c-myc. La sobre expresión de TGF $\beta$ 1 puede relacionarse con la

inminente apoptosis y fibrosis vista por el daño inducido por FB1 en hígado; c-myc puede ser involucrado en los efectos promotores de cáncer por FB1 (Lemmer *et al.*, 1999).

La proteína p21, que esta involucrada en la detención del progreso del ciclo celular al inhibir la actividad del complejo CDK4-ciclina D, aumenta su expresión en presencia de FB1 (5  $\mu$ M) en células CV-1. Esta activación del promotor del gen está mediada por los elementos a Sp1 con la siguiente secuencia ATTTCGATCGGGGCGGGGCGAG con un hexanucleótido GGGGCG o CCCCCG como núcleo (Zhang *et al.*, 1999).

### 1.3. Efectos de la FB1 en animales y humanos

La presencia de la FB1 se ha asociado epidemiológicamente con una alta incidencia de cáncer esofágico (CE) en Transkei, Sudáfrica, donde la tasa de este carcinoma es de 50 casos por cada 100 000 habitantes, pero puede ser tan alto como 200/100 000 comparado con otras partes del mundo, donde la tasa es menor a 5/100 000 (Nair, 1998). En muestras de maíz crecido en esta área, granos visiblemente saludables contenían 44 mg/g de FB1 mientras que granos evidentemente infectados con *F. moniliforme* contenían 83 mg/g de la toxina. Así, la FB1 está presente naturalmente en altas concentraciones en las muestras de comida que consume la gente de este lugar (Sydenham *et al.*, 1990). Cuando se ha empleado el maíz de esta área para alimento en ratas de laboratorio se induce tumores en el hígado e hiperplasia de células basales del esófago. Por lo tanto las fumonisinas han sido implicadas como posibles causantes o como factores contribuyentes en el cáncer esofágico (Nair, 1998).



	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>
Fumonisina B <sub>1</sub>	H	OH	OH	H
Tetrametil FB <sub>1</sub>	CH <sub>3</sub>	OH	OH	H
Fumonisina B <sub>2</sub>	H	H	OH	H
Fumonisina B <sub>3</sub>	H	OH	H	H
Fumonisina A <sub>1</sub>	H	OH	OH	COCH <sub>3</sub>
Fumonisina C <sub>1</sub>	H	C-1, H reemplaza CH <sub>3</sub>		
FB <sub>1</sub> hidrolizada	C-14, C-15 son OH			

Figura 5. A, Configuración absoluta de FB<sub>1</sub>. B, estructura de FB<sub>1</sub> y de otras fumonisinas.

## 1.4. Efectos fitotóxicos de la fumonisina B1

Aunque los efectos de la fumonisina B1 se han caracterizado ampliamente en sistemas animales, también tiene efectos fitotóxicos en varias especies de plantas. Puede causar la formación de lesiones necróticas en hojas de tomate (Mirocha *et al.*, 1990). En hojas de toloache (*Datura stramonium*) la fumonisina B1 (4.1 a 1388  $\mu\text{M}$ ) causa ruptura de los cloroplastos, salida de electrolitos, autólisis y clorosis, efectos que son potenciados en presencia de luz (Abbas *et al.*, 1992). Abbas *et al.* (1995), utilizaron análogos de FB1 y demostraron que la fitotoxicidad de la fumonisina depende del grupo amino libre. En hojas de tomate los efectos causados por la toxina, a una concentración de 1  $\mu\text{M}$ , es la salida de electrolitos y la pérdida de clorofila (Abbas y Vesonder, 1993). También se ha reportado que en células de tomate, la FB1 causa muerte celular mostrando marcadores típicos de la apoptosis como células TUNEL positivas, escalera de ADN, corte de ADN nucleosomal activado por calcio y la formación de cuerpos apoptóticos (Wang *et al.*, 1996). La FB1 causa un incremento marcado en los niveles de fitoesfingosina y esfingánina en callo de tabaco, en lenteja de agua y en hojas de tomate a diferentes concentraciones, 1  $\mu\text{M}$ , 5-70  $\mu\text{M}$  y 14  $\mu\text{M}$  respectivamente (Abbas *et al.*, 1994). Se ha comprobado que la FB1 es un potente inhibidor de la esfingánina N-acil-transferasa en retoños de maíz ( $\text{IC}_{50} = 4 \text{ nM}$ ) y en hipocótilos de frijol ( $\text{IC}_{50} = 30 \text{ nM}$ ) (Lynch, 2000).

En maíz se ha observado que la fumonisinas causan reducción en el crecimiento de la raíz y de los retoños, también seca la mayor parte de plántulas en maíz y tomate (Lamprecht *et al.*, 1994). En callos de maíz se ha demostrado que la FB1 (1.3  $\mu\text{M}$ ) causa una inhibición significativa del crecimiento (50%) (Van Asch *et al.*, 1992). En embriones de maíz, la FB1 causa un incremento en la fuga de electrolitos e inhibe la hidrólisis de ATP de la ATPasa de  $\text{H}^+$  tanto *in vitro* como *in vivo* a una concentración de 10 y 20  $\mu\text{M}$  (Gutiérrez, 1999).

Recientemente se ha reportado en *Arabidopsis* que la FB1 (10  $\mu\text{M}$ ), tanto en hojas infiltradas como embebidas con la toxina, induce repuestas como la generación de especies reactivas de oxígeno, deposición de compuestos fenólicos y calosa, acumulación de fitoalexinas y expresión de genes RP (Stone *et al.*, 2000). En protoplastos de esta misma especie causa muerte celular dependiente de luz donde las rutas de señalización requieren de ácido salicílico, jasmonato y etileno (Asai *et al.*, 2000).

## 1.5. Incidencia de Fumonisin B1 en maíz

La media del porcentaje de maíz infectado por *F. moniliforme* es muy variable y su presencia depende tanto de factores ambientales como de los genotipos de maíz. En E. U. A. el porcentaje de la presencia de este hongo está en un rango de 8.4% al 36.2%, de las muestras analizadas en maíz blanco en 1992 (Bullerman, 1996). En este mismo año se encontraron niveles altos de *F. moniliforme* en otros tipos de maíz como maíz dulce fresco, maíz molido y maíz amarillo. En otras partes del mundo como Italia, Portugal y Zambia se ha aislado *F. moniliforme* en el 100% de las semillas de maíz híbrido mientras que en otras regiones como Croacia, Polonia y Rumania tuvieron bajos niveles de incidencia (Visconti, 1996).

Se han realizados muchos estudios para determinar los niveles de FB1 que se presentan en los granos de maíz; por ejemplo en 1993 en muestras de maíz de Argentina presentaban niveles bajos de fumonisinas, 2.0 µg/g, hasta niveles muy altos en un rango de 6.0 a 10.0 µg/g. En Italia (1994) se reportó que muestras de maíz comercial y maíz para sembrar contenían niveles de fumonisinas (FB1 + FB2) que estaban entre 0.1 y 6.8 µg/g. De las muestras de maíz comercial estudiadas, todas presentaban niveles bajos de fumonisinas, y solamente seis muestras tenían concentraciones mayores de 2.0 µg/g. En diez condados de Minnesota se reportó que las mazorcas estaban infectadas con 5 especies de *Fusarium* donde el 20% de los aislados pertenecían a *Fusarium moniliforme* (Abbas *et al.*, 1988). En E. U. A. los niveles varían dependiendo del año del cultivo pero están en un rango de 0 a 37.9 µg/g (Bullerman, 1996).

En México se ha reportado que *F. moniliforme* puede recuperarse en un 61% de semillas de maíz de mazorcas colectadas de cultivos del Noreste del país, estas cepas del hongo son productoras principalmente de FB1 en concentraciones de 10 a 5810 µg/g (Desjardins *et al.*, 1994). Los niveles de incidencia natural de la FB1 son relativamente altos si se compara con los de otras micotoxinas. Mientras que es común encontrar a la FB1 en concentraciones mayores a 1 µg/g, las aflatoxinas y tricocenos se encuentran en concentraciones de alrededor de 10 ng/g, es decir dos ordenes de magnitud menor.

# III. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL: Estudiar los efectos de la fumonisina B1 sobre la expresión de genes de defensa en ejes embrionarios de dos variedades de maíz durante la germinación.

OBJETIVOS PARTICULARES:

- Determinar el efecto de la fumonisina B1 sobre la transcripción de genes de defensa a patógenos que representan los siguientes tipos de respuesta: reforzamiento de pared celular (glicoproteína rica en hidroxiprolina); secreción de enzimas hidrolíticas (glucanasas y quitinasas); metabolismo de fenilpropanoides (fenilalanina amonio liasa); metabolismo oxidativo (catalasa).
- Comparar los efectos de la toxina en las variedades de maíz: Chalqueño que es una variedad de polinización abierta y el híbrido H-355.

## IV. HIPÓTESIS

Si la fumonisina B1 es una toxina producida en cantidades considerables por muchas cepas de *Fusarium moniliforme*, ésta podría tener un efecto en la infección por lo que activaría varias de las respuestas características de las interacciones planta-patógeno, como la inducción de genes asociados a la respuesta de hipersensibilidad.

# V. MATERIAL Y MÉTODOS

## Material Biológico

El material biológico empleado en este trabajo fueron ejes embrionarios obtenidos por la disección manual de semillas secas de maíz variedad Chalqueño y H-355 del valle de Chalco.

## Imbibición

Los ejes embrionarios de maíz fueron desinfectados con dos lavados de dos minutos con hipoclorito al 10%. Se germinaron a 29°C en oscuridad sobre un papel filtro en una caja petri de 5 cm de diámetro con 1 ml de solución de imbibición. La solución de imbibición estaba compuesta de amortiguador de imbibición, agua y FB1 en las siguientes proporciones:

	Control	FB1
Agua	500 µl	490 µl
Amortiguador de imbibición 2X (KCl 50 mM; MgCl <sub>2</sub> 10 mM; tris-HCl 50 mM; sacarosa 2% y cloramfenicol 10 mg/ml este se adiciona después de esterilizar)	500 µl	500 µl
Fumonisina B1 (disuelta en agua, 1 mM)	0	10 µl (concentración final de 10 µM)

## Extracción de ARN

Para extraer el ARN de los ejes embebidos y ejes secos se utilizó el reactivo TRIzol (GIBCO®) y el protocolo recomendado, con una modificación introducida para la extracción de ARN de tejidos vegetales, como se describe acotinuación:

1. Moler los ejes de maíz (100 mg) en un mortero con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo muy fino.
  2. Pasar el polvo a un tubo eppendorf de 1.5 ml y homogeneizar el tejido con 1 ml de TRIzol (se recomienda una relación de aproximadamente 1ml de TRIzol por 100 mg de tejido).
  3. Centrifugar a 12 000 r.p.m. por 10 minutos a 4°C para separar membrana, polisacáridos y ADN de alto peso molecular, algunas veces en la parte superior se deposita una capa de grasa, esta puede ser removida con una micropipeta.
  4. Pasar la fase acuosa a un tubo limpio y añadir 10 µl de DEPC, mezclar bien. Incubar las muestras por 2.5 minutos a temperatura ambiente.
  5. Adicionar 200 µl de cloroformo a cada tubo, taparlo y agitar fuertemente con la mano por 15 segundos e incubar a temperatura ambiente por 5 minutos.
  6. Centrifugar las muestras a 12 000 r.p.m. por 15 minutos a 4°C.
  7. Transferir la fase acuosa (superior) a un tubo limpio.
  8. Añadir 0.5 ml de isopropanol e incubar 10 minutos a temperatura ambiente.
  9. Centrifugar a 12 000 r.p.m. por 10 minutos a 4°C.
  10. Remover el sobrenadante, adicionar 1 ml de etanol 75% y agitar en vortex unos segundos.
  11. Centrifugar a 6 400 r.p.m. por 5 minutos a 4°C.
  12. Eliminar el alcohol y disolver la pastilla en 150 µl de agua tratada con DEPC.
- Almacenar el ARN a -70°C.

## Cuantificación espectrofotométrica de ARN

La cuantificación de muestras de ácidos nucleicos se basa en que éstos absorben luz con longitud de onda de 260 nm. Esta medición permite calcular directamente la concentración de ARN en la muestra:

Se utiliza la siguiente relación  $\text{ARN } \mu\text{g/ml} = A_{260} \times 44.19 \times \text{factor de dilución}$

$A_{260}$  = absorbancia (en densidad óptica) a 260 nm

dilución = factor de dilución (1:1000)

44.19 = coeficiente de extinción de ARN (Farrell, 1993)

## **Integridad y Calibración del ARN**

La integridad del ARN extraído se determina por electroforesis horizontal nativa en un minigel en agarosa (1%) de la siguiente manera:

1. Preparar una solución al 1% de agarosa. Cuando la solución se encuentra entre 50 y 60°C verterla en una cámara Gibco BRL Horizon<sup>®</sup> 58, para que se solidifique.
2. Mezclar 1 µg de ARN (en un volumen máximo de 3 µl) con 1 mL de amortiguador de carga a cada muestra (glicerol 50%, EDTA 1 µM, azul de bromofenol 0.4%) y cargar en el gel (Farrell, 1993).
3. Correr el gel en una cámara de electroforesis horizontal a 75-100 V hasta que el colorante haya recorrido por lo menos dos terceras partes la longitud del gel.
4. Teñir el gel por 5 minutos en una solución de bromuro de etidio (5 µg/ml en agua).
5. Observar en un transiluminador de luz UV para observar dos bandas que corresponden a las dos subunidades de los ribosomas.
6. Como futura referencia es importante el obtener una foto de las muestras cuando su calidad es buena.

Cada una de nuestras muestras se midieron por estos dos métodos.

## **Detección de ARN por método no radiactivo (Random Primer Fluorescein labeling kit with antfluorescein-HRP, Dupont NEN, NEL201)**

Con el objetivo de afinar la calibración del ARN, así como la eficiencia de transferencia en un ensayo de northern blot, se hizo una hibridación con una sonda de ADNc de ARN ribosomales, de maíz.

Se hizo un gel de glioxal (descrito en la sección Geles de Glioxal) cargando 3 µg de ARN de cada una de las muestras para posteriormente hacer la transferencia (ver abajo).

Marcaje de la sonda de ADNc: Se desnaturalizó 1 µg del ADN complementario en un volumen de 19 mL a 95°C por 5 minutos e inmediatamente después se paso a hielo por 5 minutos.

Adicionar los siguientes componentes en la siguiente secuencia:

Cebadores al azar y amortiguador de mezcla de reacción 5 µl

Mezcla de nucleótidos con fluoresceína	5 $\mu$ l
Fragmento Klenow	1 $\mu$ l

Para un volumen total de 30  $\mu$ l.

Centrifugar por 5 segundos e incubar la mezcla 1 hora a 37°C.

Prehibridación e hibridación: Preparar amortiguador de prehibridación

#### Amortiguador de Prehibridación

amortiguador de fosfatos	0.5M (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 50 % v/v; NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 50% v/v)
albúmina	1%
SDS	7%
EDTA	1 mM

1. Mojar la membrana de nylon cargada positivamente con agua esterilizada unos minutos.
2. Equilibrar la membrana en SSC 2X, asegurándose de que la membrana esté mojada antes de proseguir.
3. Insertar la membrana en un tubo de hibridación, asegurándose que no queden burbujas entre las paredes del tubo y la membrana. Adicionar el amortiguador de prehibridación.
4. Incubar a 65°C en un horno con movimiento rotatorio al menos por una hora.
5. Combinar la sonda con 200-300  $\mu$ l de amortiguador de hibridación. Calentar a 95°C por 3-5 minutos e inmediatamente ponerlo en hielo por 5 minutos.
6. Vaciar la sonda al tubo de hibridación en donde se encuentra la membrana.
7. Hibridar durante toda la noche a 65°C.

#### Procedimiento de lavados astringentes:

	Amortiguador de lavado #1	Amortiguador de lavado #2
Na <sub>x</sub> H <sub>x</sub> PO <sub>4</sub> pH 7.2	125 mM	25 mM
EDTA	0.05 mM	0.01 mM
SDS	2.5%	0.5%

1. Sacar la membrana del tubo de hibridación y lavar dos veces con amortiguador de lavado #1 agitando vigorosamente por 10 minutos a 65°C.
2. Volver a lavar vigorosamente 2 veces mas con amortiguador #2 por 10 minutos a temperatura ambiente.

## Detección de ácidos nucleicos con el reactivo de quimioluminiscencia:

Preparar las siguientes soluciones:

Amortiguador 1	Amortiguador 2	Solución de anticuerpo conjugado
Tris-HCl pH 7.5 0.10 M	Tris-HCl pH 7.5 0.10 M	Tris-HCl pH 7.5 0.10 M
NaCl 0.15 M	NaCl 0.15 M	NaCl 0.15 M
Para minimizar el fondo pasar la solución a través de un filtro del # 0.22 mm antes de usarse.	Para minimizar el fondo pasar la solución a través de un filtro del # 0.22 mm. Reactivo bloqueador 0.5 % (p/v) Adicionarse después de filtrar.	Reactivo bloqueador 0.5% (p/v). Antifluoresceína HRP conjugada 1:1000 (v/v)

1. Sumergir la membrana en el amortiguador 1 y agitar vigorosamente por 5 minutos. Usar al menos 1 ml de amortiguador por cm<sup>2</sup> de membrana. Asegurarse que todo el SDS halla sido lavado para proceder al siguiente paso (esto es que al agitar no se produzca espuma).
2. Bloquear la membrana en amortiguador 2 por 1 hora con agitación suave (usar al menos 1 ml por cm<sup>2</sup> de membrana).
3. Pasar la membrana a la solución de anticuerpo conjugado e incubar por una hora en agitación suave.
4. Lavar vigorosamente la membrana 4 veces por 5 minutos con el amortiguador 1.

## Incubación de la membrana con el sustrato de quimioluminiscencia:

1. Inmediatamente antes de usar, mezclar en volúmenes iguales el reactivo "Enhanced luminol" y el reactivo oxidante (6 ml para una membrana de 7 x 6 cm). Usar al menos 0.125 ml de reactivo por cm<sup>2</sup> de membrana.
2. Transferir la membrana de la solución de lavado del anticuerpo conjugado a un contenedor limpio. Inmediatamente agregar la mezcla de los reactivos de quimioluminiscencia en la membrana.
3. Agitar suavemente por un minuto asegurándose que la membrana este totalmente cubierta con la solución.
4. Remover la membrana y quitar el exceso de la solución poniéndola encima de un papel Whatman 3 MM.
5. Colocar la membrana entre dos hojas protectoras (acetatos cubiertos con plástico egapack).

Exposición con la película: Poner la membrana en el cassette y una película para exponerla durante 5 minutos. Pasado el tiempo revelar la película. Variar el tiempo de exposición según sea necesario, para obtener señal de la hibridación sin fondo.

## Geles con glioxal

(Sambrook *et al.*, 1989; Ausubel *et al.*, 1992)

1. Usar guantes (ver apéndice)
2. Disolver la agarosa en un volumen apropiado de MOPS 1X, para que quede a una concentración final de 1.2%.
3. Cuando la agarosa este a una temperatura entre 55-60°C vaciarla en una cámara de electroforesis horizontal (Gibco BRL Horizon® 11-14) y esperar a que solidifique.

*Nota.* No adicionar bromuro de etidio a los geles de glioxal por que el colorante puede reaccionar con el glioxal.

4. Desnaturalizar el ARN (20 µg) en un tubo de microcentrifuga adicionando los siguientes reactivos:

Reactivo	Concentración	Volumen	Concentración final
glioxal	6 M	6.6 µl	1 M
DMSO	-	22.5 µl	50%
MOPS	10X	4.5 µl	1X

5. Cerrar los tubos e incubar la mezcla a 50°C por una hora.
6. Durante la incubación del ARN y una vez que el gel ha solidificado, sumergir éste en amortiguador de corrida (amortiguador MOPS 1X).

*Nota.* Asegurarse de usar únicamente la cantidad necesaria de amortiguador para cubrir completamente el gel. Cubrir el gel con amortiguador antes de remover el peine para disminuir el efecto de vacío creado cuando el peine es jalado y evitar que el gel se rompa. Remover cuidadosamente el peine jalando hacia arriba con suavidad.

7. Cuando concluya el periodo de incubación, enfriar la muestra y adicionar 6 mL de amortiguador de carga (glicerol 50%; Na<sub>x</sub>H<sub>x</sub>PO 10 mM, pH 7; azul de bromofenol 0.4%). Si es necesario, dar un pulso en la centrifuga para bajar toda la muestra y pueda ser colectada en el fondo del tubo.

8. Inmediatamente cargar la muestra en el gel.
9. Correr el gel a 3-4 V/cm de la longitud del gel. La electroforesis puede continuar hasta que el azul de bromofenol llegue aproximadamente un 80% de la longitud del gel.

Es especialmente importante parar la electroforesis en este punto si se están evaluando ARN de tamaños desconocidos.

10. Al concluir la electroforesis, el gel se tiñe en una solución de 0.5 µg/ml de bromuro de etidio y posteriormente se hacen 3 lavados con agua tratada con DEPC por 15 minutos y por último se deja en agua tratada con DEPC durante toda la noche a 4°C para sacar todo el bromuro de etidio.

## Geles con Formaldehído

(Farrell, 1993)

1. Usar guantes.
2. Para preparar 110 ml de solución de agarosa disuelta, disolver 1.65 gramos de agarosa en 79.5 ml de agua desionizada en un horno de microondas. Asegurarse de que la agarosa está disuelta completamente antes de proceder al siguiente paso. Cuando la agarosa se haya enfriado a 60°C, adicionar 11 ml de amortiguador MOPS 10X precalentado, 19.8 ml de formaldehído precalentado y 4 ml. de bromuro de etidio (500 µg/ml). Esto producirá una solución de agarosa 1.5% en amortiguador MOPS 1X y formaldehído 0.66 M. Guardar esta solución de agarosa disuelta en un baño de agua a 60°C hasta tener lista la cámara de electroforesis.
3. Verter el gel en la cámara y asegurarse de hacerlo en la campana de extracción para minimizar la exposición a los vapores del formaldehído.
4. Preparar las muestras de ARN para la electroforesis mezclando los siguientes elementos en un tubo de microfuga:

20 µg de ARN

14.0 µl de amortiguador MOPS 5X

8.0 µl de formamida

Asegurarse que todos los componentes sean mezclados en el fondo del tubo.

*Nota:* no exceder 20 µg de ARN por carril ya que al sobrecargar se puede perder resolución.

5. Desnaturalizar las muestras calentando a 55°C por 15 minutos.
6. Una vez que el gel ha solidificado, sumergirlo en amortiguador de corrida (MOPS 1X).
7. Seguido de la desnaturalización, adicionar 2 µl de amortiguador de carga 10X (50% de glicerol; 1 mM EDTA, pH 8.0; 0.4% de azul de bromofenol) a las muestras y mezclar completamente con una micropipeta. Cargar las muestras inmediatamente.

*Nota:* Debido a que una condensación se puede formar en el interior del tubo durante el periodo de incubación de desnaturalización, se debe asegurar de microcentrifugar brevemente el tubo justo antes de adicionar el amortiguador de carga.

8. Correr las muestras a un máximo de 5 V por centímetro de longitud del gel. Continuar la electroforesis hasta que el frente del colorante migre cerca del 80% de longitud del gel. Es especialmente importante parar la electroforesis en este punto si se está evaluando especies de ARN de tamaño desconocido. Recircular el amortiguador de corrida.
9. Lavar el gel para remover el formaldehído con amortiguador MOPS 1X (ver sección de transferencia).

## **Transferencia de ARN por capilaridad de difusión pasiva**

1. Usar guantes durante todo el procedimiento. Como con todas las técnicas de ARN, es imperativo el prevenir la contaminación de nucleasas en cada paso. Recordar que los ARNs son susceptibles a la degradación por nucleasas hasta que ellos han sido inmovilizados (por entrecruzamiento con luz UV) en una membrana.
2. Los geles que han sido teñidos o que contienen formaldehído pueden ser desteñidos antes de ponerlos a transferir. El evitar estos pasos puede resultar en una transferencia altamente ineficiente y pérdida de la muestra.

*Nota:* Una espátula es lo más conveniente para transferir el gel de una solución a otra. Los geles de formaldehído son especialmente resbalosos y deben ser manejados con cuidado.

Geles de formaldehído: Sumergir el gel tres veces por 15 minutos cada vez en SSC 20X para remover el formaldehído. Si el gel contiene también bromuro de etidio éste también puede ser removido del gel durante este proceso.

Geles de glioxal: se debe transferir inmediatamente después de la electroforesis sin lavados previos.

1. Cortar una pieza de membrana de Nylon (Hybond™-N+, Amersham) del tamaño del gel. Nunca manipular la membrana sin guantes. Cortar otras hojas de papel filtro del tamaño del gel, ponerlos en un recipiente limpio y seco.
2. Sumergir las membranas en agua-DEPC (libre de RNAsas) por 5 minutos.
3. Después de mojar la membrana equilibrar en amortiguador de transferencia (SSC 20X) hasta que ésta sea usada.
4. Cortar una hoja de papel Whatman 3 MM aproximadamente 1 cm más amplio y al menos 15 cm más largo que el gel. Esta es la mecha y actúa como contacto entre el amortiguador de transferencia reservorio y el gel mismo.
5. Saturar la mecha en amortiguador de transferencia (10 segundos es tiempo más que suficiente) y colocarla sobre vidrios soportados por una caja petri grande o un implemento similar.
6. Llenar el recipiente con suficiente amortiguador SSC 20X hasta un mínimo de 2-3 cm desde el final. La mecha es sumergida en el amortiguador de transferencia.
7. Cualquier burbuja de aire atrapada debajo de la mecha se remueve fácilmente con una pipeta estéril. Si no se eliminan todas las burbujas se reduce la eficiencia de transferencia.
8. Poner el gel, en medio de la mecha y remover cualquier burbuja atrapada entre el gel y la mecha. Cubrir el área alrededor del gel con papel parafilm para prevenir un cortocircuito del sistema durante la transferencia.
9. Cuidadosamente poner la membrana encima del gel y remover cualquier burbuja atrapada entre éstos.
10. Cortar 3 hojas de papel Whatman 3 MM del mismo tamaño que el gel. Pre-humedecer una de estas hojas en amortiguador de transferencia.
11. Poner la hoja de papel Whatman encima de la membrana y eliminar las burbujas de aire; poner las piezas secas encima de la anterior.
12. Cortar un pila de toallas de papel absorbente o papel absorbente comercialmente disponible del tamaño del gel. Poner las toallas de papel encima del papel Whatman y colocar encima de la pila un peso de 500 g.
13. La transferencia puede llevarse acabo por un mínimo de 6 horas, pero es mejor dejarlo toda la noche, de 12 a 14 horas.

14. Cuando termine el periodo de transferencia separar, cuidadosamente, la membrana del gel con una pinza. Asegurarse de marcar la membrana para indicar la orientación de la transferencia y del primer pozo.
15. Seguir con los lavados post-transferencia. La membrana se lava brevemente (30 segundos) en 5X SSC (lavar en el mismo tipo de amortiguador que fue usado para la transferencia) y secar con papel Whatman 3MM.

*Nota:* el breve lavado post-transferencia del filtro remueve cualquier pieza de agarosa que pudo haber quedado en el filtro así como cualquier otro residuo que puede interferir con la inmovilización de las muestras y/o especificidad de hibridación.

16. Exponer la membrana por 2 minutos en un aparato de entrecruzamiento UVC 500 Ultraviolet Crosslinker HSI HOEFER por luz ultravioleta para fijar los ácidos nucleicos. Guardar la membrana húmeda a -20°C.

## Obtención de sondas

La transformación de las células y preparación de ADN de plásmidos se hizo para obtener los ADNc de quitinasa, catalasa, HGRP y glucanasa excepto para la fenilalanina amonio liasa que se obtuvo por RT-PCR.

ADNc	PLÁSMIDO	TAMAÑO DEL INSERTO	ENZIMA DE RESTRICCIÓN	DONADOR O REFERENCIA
HRGP	PF2	660 pb	Eco RI y Hind III	Raz <i>et al.</i> , 1992
Quitinasa	pCh2	1128 pb	Eco RI	Wu <i>et al.</i> , 1994
Glucanasa	pGlu	1265 pb	Eco RI	Wu <i>et al.</i> , 1994
Catalasa	pCat 2.1	1800 pb	Eco RI	Scandalios, 1996
PAL	Se obtuvo por RT-PCR			

Tabla 4. Características de las sondas utilizadas.

# Protocolo para Transcripción Reversa de ARN y la amplificación de ADNc por PCR

A partir de la secuencia de la PAL reportada por Rösler *et al* (1997) para maíz que se presenta abajo, se hicieron dos cebadores para poder hacer el RT-PCR y obtener la sonda de la PAL.

```

1201  PAL1
      gcgagggtcaactccgtgaacgacaacccgggtcatcgacgtccaccgcggaaggcgctgc
1261  acggcggaacttccagggcacccccacatcggcgtgccatggaacaacgcccgcctcgcca
1321  tcgccaacatcggaagctcatgttcgcgagttctcSstIcgagctcgtcaacgagttctaca
1381  acaacgggctcacctccaacctggccggcagccgcaaccccagcctggactacggcttca
1441  agggcaccgagatcgccatggcctcctactgctccgagctccagtagctgggcaacccca
1501  tcaccaaccacgtgcagagcgcgagcagacacaaccaggacgtgaactccctgggcctcg
1561  tctcgccaggaagaccgcccaggcgatcgacatcctgaagctcatgtcgtccacctaca
1621  tcgtggcgctgtgccaggccgtggacctgcgccacctcgaggagaacatcaaggcgctcg
      PAL2
  
```

} 420 pb

Secuencia del oligonucleótido PAL 1: 5'-GAG-GTC-AAC-TCC-GTG-AAC-GAC-3'

Secuencia del oligonucleótido PAL 2: 5'-TGT-AGG-TGG-ACG-ACA-TGA-GCT-T-3'

## Transcripción Reversa (este protocolo es tomado de GeneAmp<sup>®</sup>, Perkin Elmer).

Preparar la mezcla de reacción para la transcripción reversa adicionando los componentes en orden y proporciones indicadas abajo.

Componentes	Volumen	Concentración final
Solución de MgCl <sub>2</sub> 25 mM	4 µl	5 mM
Amortiguador II PCR 10X	2 µl	1X
Agua tratada con DEPC	*	-
dGTP (10 mM)	2 µl	1 mM
dATP (10 mM)	2 µl	1 mM
dCTP (10 mM)	2 µl	1 mM
dTTP (10 mM)	2 µl	1 mM
Inhibidor de RNasa (20 U/µl)	1 µl	1 U/µl
Transcriptasa Reversa MuLV (50 U/µl)	1 µl	2.5 U/µl
Oligo d(T) <sub>16</sub> (50 µM)	1 µl	2.5 µM

\*Este volumen dependerá de la cantidad de ARN total que se use para dar un volumen total de 20 µl.

Incubar 1 mg (0.5 µl) de ARN total (de ejes embrionarios de maíz embebidos 24 horas) más 3.5 ml de agua por 5 minutos a 65°C.

Adicionar la mezcla de reacción, el oligo d(T)<sub>16</sub> y mezclar bien (para obtener un volumen final de 20 µl).

Incubar a 42°C por 45 minutos. Guardar las muestras a -20°C, hasta que se empleen.

**Protocolo de PCR:** Para cada muestra preparar una mezcla como a continuación se indica:

Componentes	Volumen	Concentración final
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	4 µl	2 mM
Amortiguador PCR 10X	4 µl	1X
DNTPs (10 mM)	3.2 µl	
Oligonucleótido PAL 1 (10 µM)	1.2 µl	0.6 µM
Oligonucleótido PAL 2 (10 µM)	1.2 µl	0.6 µM
Taq ADN polimerasa (5 U/µl)	0.5 µl	2.5 U/100 µl
ADNc	4 µl	

En tubos de PCR poner 4  $\mu$ l de ADNc de 24 horas. Añadir 16 mL de la mezcla que anteriormente se hizo para obtener un volumen total de 20  $\mu$ l.

Después se puso en el aparato de GeneAmp PCR System 9700 con el siguiente programa:

94°C	por	4 minutos	1 ciclo
94°C	por	40 segundos	
58°C	por	40 segundos	30 ciclos
72°C	por	40 segundos	

El análisis de los productos de PCR se realizó por separación en un minigel de agarosa al 1.5% en electroforesis horizontal y los productos resultantes se visualizaron con un transiluminador de luz UV.

## Obtención de los plásmidos (método alcalino)

Para obtener suficiente cantidad de inserto, las células que contenían el plásmido se dejaron crecer durante 15 horas en medio TB para posteriormente seguir con la siguiente metodología:

1. Centrifugar 1.5 ml de cultivo crecido en caldo TB por un minuto.
2. Eliminar el sobrenadante por aspiración. Volver a centrifugar 1.5 ml de cultivo en el mismo tubo, dejar la pastilla bien seca.
3. Resuspender la pastilla en 200  $\mu$ l de buffer GTE pipeteando de arriba hacia abajo e incubar 5 minutos a temperatura ambiente.
4. Agregar 300  $\mu$ l de NaOH 0.2N/SDS 1% (solución recién preparada) y mezclar el tubo por inversión. NO AGITAR EN VORTEX. Incubar en hielo por 5 minutos.
5. Agregar 300  $\mu$ l de acetato de potasio 3M, pH 4.8. Mezclar por inversión. NO AGITAR EN VORTEX. Incubar en hielo por 5 minutos.
6. Centrifugar por 10 minutos a 4°C y transferir el sobrenadante a un tubo nuevo.
7. Agregar 30  $\mu$ l de ARNasa A (10 mg/ml) e incubar a 37°C por lo menos 30 minutos.
8. Hacer una extracción con 400  $\mu$ l de fenol-cloroformo (1:1 v/v) y mezclar las fases sin usar vortex. Centrifugar por 5 minutos para separar las fases y pasar la fase acuosa (superior) a un tubo limpio.

9. Hacer una extracción con 400  $\mu\text{l}$  de cloroformo-álcohol isoamílico (24:1, v/v) y agitar sin usar el vortex. Centrifugar por 1 minuto para separar las fases y pasar la fase acuosa (superior) a un tubo limpio.
10. Precipitar el ADN agregando un volumen igual de isopropanol, mezclar por inversión y colocar el tubo a  $-20^{\circ}\text{C}$  por lo menos 20 minutos.
11. Recolectar el precipitado de ADN centrifugando por 15 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . Eliminar el sobrenadante y enjuagar la pastilla con 1 ml de etanol al 70%, centrifugar por 5 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ .
12. Decantar el sobrenadante, dejar el tubo invertido y luego dejar evaporar el resto del solvente. Disolver la pastilla en 20  $\mu\text{l}$  de agua estéril o TE.

## **Purificación de un fragmento de ADN para usar como sonda**

### **Digestión de un plásmido.**

Una vez que se tuvo suficiente plásmido con el ADNc se hizo una digestión con las enzimas correspondientes para obtener cada inserto de ADN.

Los plásmidos de diferentes clonas se cortaron con enzimas de restricción para obtener el fragmento de ADN correspondiente, según el siguiente protocolo:

1. Poner a digerir con enzima de restricción como a continuación se indica:
  - 10  $\mu\text{l}$  de ADN plasmídico (aproximadamente 8  $\mu\text{g}$ )
  - 2  $\mu\text{l}$  de amortiguador ReAct B 10X
  - 1  $\mu\text{l}$  de enzima (10 U/ $\mu\text{l}$ )
  - H<sub>2</sub>O a un volumen final de 20  $\mu\text{l}$
  - Incubar una hora a  $37^{\circ}\text{C}$ .
2. Después de la digestión, adicionar 5  $\mu\text{l}$  de amortiguador de carga para ADN. Cargar 25  $\mu\text{l}$  en cada uno de dos pozos en un gel de agarosa al 0.8% (TAE, con EtBr 0.4  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) verter en una cámara.
3. Correr el gel a 75 voltios hasta que el azul de bromofenol este abajo de la mitad del recorrido de la longitud del gel.

4. Visualizar el fragmento de ADN con luz ultravioleta.
5. Cortar la banda deseada con una navaja de bisturí, tomar solo la banda de ADN con una mínima cantidad de agarosa rodeándolo. Pasar la banda de ADN a un tubo eppendorf.

#### **Purificación del inserto.**

1. Usando una espátula, transferir el pedazo de agarosa a una balanza tarada para determinar el peso, el cual se aproxima al volumen (asumiéndose 1 ml por gramo).
2. Cortar la agarosa en pequeños fragmentos (aproximadamente 4) y transferir a un microtubo de 1.5 ml.
3. Adicionar 4.5 volúmenes de una solución de NaI, 6 M.
4. Poner el tubo en un baño a 50°C para disolver la agarosa. Agitar a intervalos de 2 minutos (la agarosa puede ser disuelta después de 5 minutos).
5. Adicionar 5 µl de suspensión Glassmilk (matriz), mezclar bien e incubar en hielo por 10 minutos, mezclando a intervalos de 2 minutos.
6. Centrifugar la matriz por 5 segundos en un microfuga a 14 000 r.p.m.
7. Desechar el sobrenadante y entonces volver a centrifugar unos segundos. Remover toda la solución remanente con una micropipeta.
8. Lavar la pastilla tres veces con 250 µl de solución NEW-WASH fría (-20°C): Adicionar 250 µl de NEW-WASH, resuspender la pastilla completamente, centrifugar por 5 segundos, remover el sobrenadante y repetir para dar un total de 3 lavados.
9. Después de la última lavada asegurarse de remover completamente cualquier remanente del sobrenadante con una micropipeta.
10. Resuspender la pastilla final en 20 µl de agua.
11. Incubar el tubo a 50°C por 2 minutos para cluir el ADN de la matriz.
12. Centrifugar 30 segundos para bajar la matriz
13. Pasar el sobrenadante a un tubo nuevo y se redisuelve la pastilla en 5 µl de agua repitiendo los pasos 15 y 16.
14. Combinar los dos eluidos en un tubo, remover una alícuota para checar la recuperación en un minigel.
15. La muestra sobrante se guarda a 4°C para su uso posterior.

## Marcaje de sondas de ADN con dCTP radiactivo por el método de cebadores al azar (Random Primer, Life Technologies, Gibco)

1. Desnaturalizar 25 ng de ADN y disolverlo en 5-20  $\mu\text{l}$  de agua destilada en un tubo de microcentrífuga y calentar por 5 minutos en un baño de agua hirviendo, pasado el tiempo inmediatamente colocar en hielo.
2. Adicionar los siguientes elementos en hielo.

solución de dATP (0.5 mM)	2 $\mu\text{l}$
solución de dGTP (0.5 mM)	2 $\mu\text{l}$
solución de dTTP (0.5 mM)	2 $\mu\text{l}$
Amortiguador mezcla de random primers	15 $\mu\text{l}$
$[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ , 6000 Ci/mmol 20 $\mu\text{Ci/mL}$	2.5 $\mu\text{l}$

Agua a un volumen total de 49  $\mu\text{l}$  y mezclar suavemente.
3. Adicionar 1  $\mu\text{l}$  de fragmento Klenow de la DNA Pol I de *E. coli*. mezclar suavemente pero bien y centrifugar unos segundos.
4. Incubar a 25°C por 1 hora.
5. Adicionar 5  $\mu\text{l}$  de amortiguador EDTA (0.5 M, pH 8.0) para detener la reacción.
6. Limpiar la sonda pasándola a través de una columna de exclusión molecular empacada en un cilindro de 1 ml con sephadex G-25, equilibrada con amortiguador TE.
7. Medir 1  $\mu\text{l}$  de la sonda en un contador de centelleo para determinar la cantidad de sonda marcada a usar.

## Prehibridación

Pre-humedecer la membrana en 5X SSC por 30 minutos.

Prehibridar la membrana por 2 horas a 62°C en un volumen excedente (250-1000  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ ) de amortiguador de prehibridación:

Amortiguador de prehibridación (15 ml)

amortiguador de fosfatos            0.5 M ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  50 % v/v;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  50% v/v)

albúmina                                1 %

SDS	7 %
EDTA	1 mM

Desnaturalización de la sonda: Las sondas se desnaturalizan antes de usarse, incubando en un baño a punto de ebullición por 5 minutos y enfriando inmediatamente en hielo.

## Hibridación

1. Adicionar la sonda al amortiguador de hibridación e hibridar por 12-16 horas (toda la noche) a 62°C.

Nota: Para la detección de ARNm o genes de una sola copia se recomienda usar 5-20 ng de sonda por mililitro de amortiguador de hibridación o  $1-5 \times 10^6$  cpm/ml.

## Lavados Post-hibridación

Dependiendo de la naturaleza y longitud de la sonda, así como de la estabilidad del híbrido ADN-ARN, pueden ajustarse las condiciones de los lavados posthibridación. Es muy importante considerar que en los lavados posthibridación, la astringencia está una función de la fuerza iónica, temperatura y tiempo.

1. Al terminar el periodo de hibridación, desechar el amortiguador de hibridación en un recipiente correctamente etiquetado y lavar los filtros para remover todas las moléculas de la sonda que no participan en la formación de híbridos, específicos ADN-ARN.
2. Lavar los filtros por 15 minutos en una solución de SSC 2X/SDS 0.1% (250 ml) dos veces a temperatura ambiente para remover la sonda remanente en la membrana.

Nota: Si el fondo es muy alto lavar en 0.1X de SSC a 42°-50°C.

Es importante no dejar secar la membrana en ningún momento.

3. Cubrir la membrana en plástico y exponerla a una película.

Nota asegurarse de mantener húmeda la membrana si planea el remover la sonda después de la autoradiografía para hibridar con otras sondas.

Como con todos los experimentos que involucran isótopos, tomar en cuenta todas las recomendaciones, por los propios contaminantes del material, y todas las reglas de seguridad para minimizar el riesgo potencial de contaminación.

1. Al finalizar todos los lavados de astringencia posthibridación tomar la membrana con una pinza y colocar encima de un soporte (acetato).

2. Envolver la membrana en plástico, teniendo cuidado de evitar arrugar el lado de la membrana y estar seguro de que el plástico encima de la membrana sea suficiente de tal manera que la película no se humedezca o moje.
3. Poner un contador Geiger aproximadamente 6 cm arriba de la superficie de la capa de plástico que cubre la membrana, para estimar el tiempo requerido para la autoradiografía. Una actividad alta se puede encontrar en la región de la membrana correspondiente al tamaño de los marcadores, si éstos fueron usados para hibridar a la sonda. Una actividad extremadamente alta sobre la superficie de esta membrana puede sugerir un fondo muy alto.

## **Autoradiografía**

1. Exponer la membrana con una película y una pantalla intensificadora. Guardar a  $-70^{\circ}\text{C}$  toda la noche.
2. Sacar el cassette para descongelar a temperatura ambiente y entonces revelar la película. Si la señal es poco evidente en la película entonces no se tendrá fondo. Si el fondo es muy alto, usualmente es detectado por la aparición de una línea a lo largo de la película, sin la aparición de bandas, entonces se saca la membrana para lavarla con soluciones más astringentes. Una alta astringencia se puede lograr lavando en una solución de SSC 0.1X, SDS 0.1% a  $55-60^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos.

## V. RESULTADOS

Con base en nuestros objetivos se midió la elongación radicular como parámetro fisiológico para estudiar los efectos fitotóxicos de la FB1 en la germinación. Ésta se midió durante la germinación (6, 12, 24 y 48 horas) en ejes embrionarios germinando en ausencia y presencia de FB1 (10  $\mu\text{M}$ ) en dos variedades de maíz, Chalqueño y H-355, (ver material y métodos). Los efectos de la toxina en la elongación radicular se muestran en la tabla 5 donde se observa una respuesta diferencial de las dos variedades de maíz a la FB1 a las 48 horas de la germinación. En el maíz Chalqueño la FB1 inhibe la elongación radicular en un 67.3% y en el maíz híbrido 38.2%. A las 6, 12 y 24 horas no se tienen datos de las mediciones debido a que en estos tiempos no hay cambios en la elongación radicular tanto en los controles como con la toxina (datos no mostrados) en las dos variedades de maíz.

CHALQUEÑO 48 HORAS		H-355 48 HORAS
Control	3.27 mm $\pm$ 0.9	6.08 mm $\pm$ 1.0
FB1	1.07 mm $\pm$ 0.3	3.75 mm $\pm$ 0.9
% de inhibición	67.3%	38.2%

Tabla 5. Efecto de FB1 sobre la elongación radicular de ejes embrionarios de maíz. Diez ejes embrionarios de dos variedades de maíz (Chalqueño y H-355) fueron embebidos durante diferentes horas en ausencia o presencia FB1 (10  $\mu\text{M}$ ). A las 48 horas se midió la radícula de cada embrión tanto en controles como aquellos embebidos con la toxina. Las diferencias entre los tratamientos y controles fueron significativas con un grado de confianza  $p < 0.005$ .

## EFFECTO DE LA FB1 EN LA TRANSCRIPCIÓN DE GENES RELACIONADOS CON LA DEFENSA

Para estudiar el efecto de la toxina en la expresión de estos genes nos enfocamos primeramente a obtener todos los ADNc de los genes a estudiar, para utilizarlos como sondas, los cuales fueron donados por diferentes investigadores (en material y métodos se muestran las características de cada ADNc, tabla 4). La última sonda que era de la fenil-alanina amonio liasa se obtuvo por RT-PCR (detalles en material y métodos). En la figura 6 se muestra el producto de RT-PCR, obtenido a partir de ARN total de ejes embrionarios de maíz Chalqueño embebidos durante 12 y 24 horas. De las dos reacciones de RT-PCR, sólo en la muestra de 24 horas encontramos un producto de aproximadamente 420 pares de bases. Para confirmar que este fragmento de ADNc correspondía a PAL, el ADNc purificado se digirió con la enzima de restricción SstI según la secuencia reportada (Rösler, 1997) y se obtuvieron dos fragmentos, uno de 169 y otro de 251 pares de bases, de acuerdo a la predicción de la secuencia reportada. Con estos datos confirmamos que el fragmento que se obtuvo del RT-PCR correspondió a la fenil amonio liasa, la cual se utilizó como sonda para los estudios pertinentes.

Con la obtención de la última sonda procedimos a seguir con el estudio de la expresión de algunos genes involucrados en la patogénesis (glucanasa, quitinasa, catalasa y HRGP).

Una de las respuestas de las plantas frente a la infección por microorganismos patógenos o al percibir alguna señal química secretada por éstos, es el reforzamiento de la pared celular. Un mecanismo para lograr este refuerzo es la síntesis de glicoproteínas ricas en hidroxiprolina (HRGP) que se localizan en la pared celular. En este trabajo se estudió si la toxina (FB1) inducía la expresión de este gen, en ejes embrionarios durante la germinación. En la figura 7 se muestra que el transcrito de la HRGP se expresa durante la germinación en ejes control siendo detectable desde las 12 horas y en tiempos posteriores también; pero cuando los ejes embrionarios de maíz Chalqueño son expuestos a FB1 (10  $\mu$ M), la expresión es inducida y se observa el transcrito desde las 6 horas. Esta inducción es continua e incrementa con el tiempo de imbibición con la toxina. El transcrito de la HRGP parece tener un recambio muy rápido ya que a partir de las 24 horas se observa un barrido que se obtuvo consistentemente cuando se analizó este gen pero no para otros, además de que siempre se verificaba la integridad del ARN total. Al analizar por densitometría la intensidad de las bandas

(figura 11A) se encontró que el máximo de inducción de por lo menos 5 veces a las 6 horas, de 3 y 2 veces para 24 y 48 horas respectivamente, tomando en cuenta que el análisis densitométrico tiende a subestimar la intensidad de la señal.

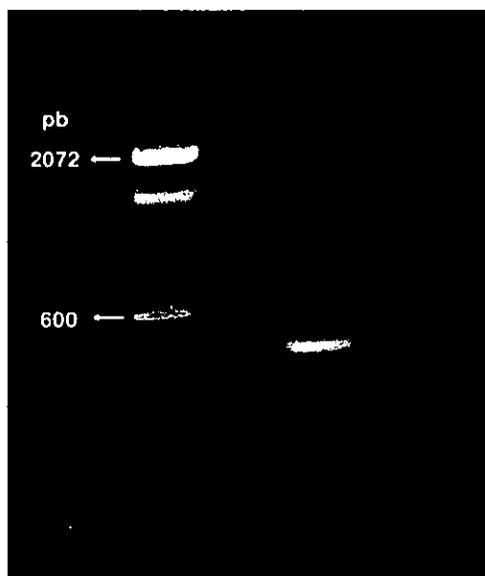


Figura 6. Obtención de la sonda PAL. ARN total de maíz Chalqueño de 12 y 24 horas de germinación se sometió a la metodología de RT-PCR para obtener el ADN para utilizarlo como sonda. Productos de RT-PCR; carril 1 marcador de 100 pares de bases, carril 2 producto de RT-PCR de ejes embrionarios de maíz durante 12 horas de germinación, carril 3 producto de PCR de ejes embrionarios de maíz 24 horas de germinación.

R

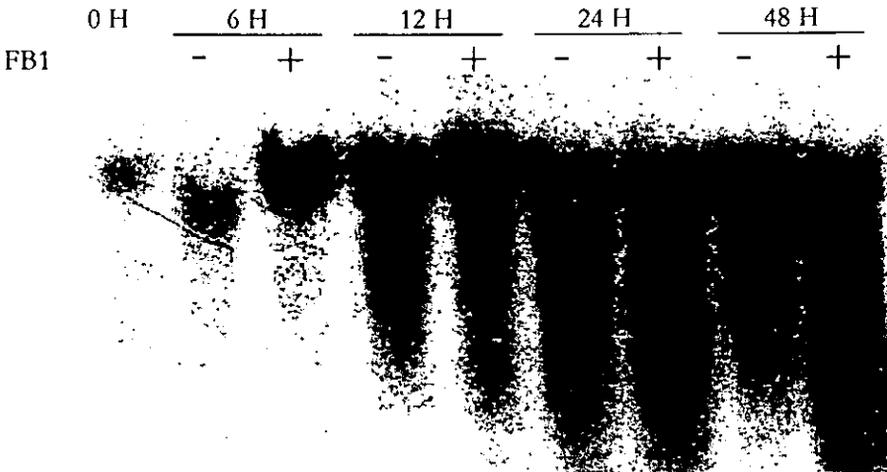


Figura 7. Inducción de los transcritos de HRGP en ejes embrionarios de maiz Chalqueño durante la germinación en ausencia (-) o presencia (+) de FB1 (10  $\mu$ M). ARN total (20  $\mu$ g por carril) se extrajo en cada tiempo indicado para hacer el análisis de northern blot; R, ribosomales.

Las enzimas hidrolíticas quitinasas y glucanasas también están involucradas en las interacciones planta-patógeno y la expresión de sus genes es muy rápida en presencia del patógeno o alguno de sus productos. Se ha propuesto que las quitinasas en conjunto con las glucanasas inhiben el crecimiento micelial de muchos hongos trabajando de manera sinérgica para poder hidrolizar con gran efectividad la quitina.

En ejes embrionarios de maíz el gen de la quitinasa se expresa constitutivamente durante la germinación a niveles bajos (figura 8), pero la transcripción aumenta en presencia de la FB1 desde las 6 horas y hasta las 24 horas de la germinación. A las 48 horas ya no se detecta este transcrito. Durante las primeras 24 horas de germinación la FB1 tiene un efecto de inducción en este gen. El análisis densitométrico (figura 11B) muestra que a las 6 horas la fumonisina B1 induce el transcrito por lo menos 6 veces con respecto al control, mientras que a las 12 horas hay un incremento de 1.3 veces y a las 24 horas éste es de aproximadamente 2 veces.

En contraste el gen de la glucanasa se expresa en niveles muy bajos durante la germinación siendo apenas detectable a las 24 horas y teniendo un máximo a las 48 horas (figura 9). Cuando los ejes embrionarios germinan en presencia de la FB1, la expresión de este gen se ve reprimida a las 24 y 48 horas. El análisis densitométrico (figura 11C) muestra que a las 24 horas con FB1 por lo menos hay una represión de dos veces con respecto al control, mientras que a las 48 horas la represión por la FB1 es de 3 veces con respecto al control. Estos datos nos indican que la FB1 reprime la expresión de los transcritos; quizá siguiendo esta tendencia en las siguientes horas del desarrollo.

R

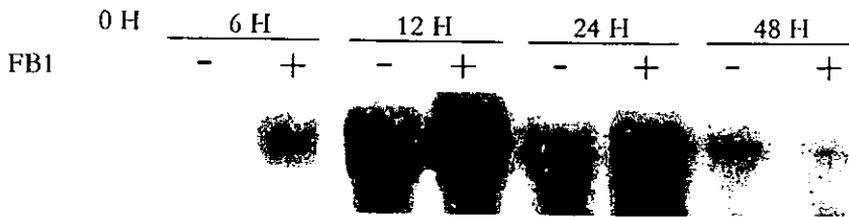


Figura 8. Inducción de los transcritos de quitinasa en ejes embrionarios de maíz Chalqueño durante la germinación en ausencia (-) o presencia (+) de FB1 (10  $\mu$ M). ARN total (20  $\mu$ g por carril) se extrajo en cada tiempo indicado para hacer el análisis de northern blot; R, ribosomales.

R

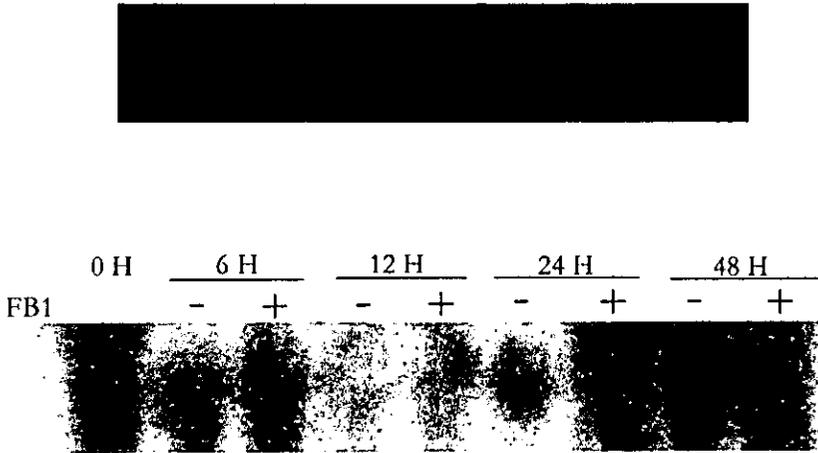


Figura 9. Inducción de los transcritos de glucanasa en ejes embrionarios de maíz Chalqueño durante la germinación en ausencia (-) o presencia (+) de FB1 (10  $\mu$ M). ARN total (20  $\mu$ g por carril) se extrajo en cada tiempo indicado para hacer el análisis de northern blot. R, ribosomales.

La ruta biosintética de los fenil propanoides proporciona a la célula vegetal de precursores de lignina, fitoalexinas y otros compuestos fenólicos, que son componentes importantes en la defensa de la planta así como en el desarrollo normal. Una enzima clave en esta ruta metabólica es la fenil-alanina amonio liasa (PAL) que actúa en la primera reacción de la ruta por lo que su control a nivel transcripcional es relevante ya que la expresión del gen es afectada por distintos agentes bióticos y abióticos. En la figura 10 se muestra la expresión del gen de la PAL durante la germinación y se observa al transcrito desde las 12 horas con una disminución notable a las 48 horas. Cuando los ejes embrionarios de maíz germinan en presencia de la toxina se observa una represión en la expresión de este gen a las 24 horas que se mantiene a las 48 horas de germinación. El análisis densitométrico (figura 11D) indica que en presencia de la fumonisina B1 la expresión del gen de PAL se reduce aproximadamente a la mitad a las 24 y 48 horas.

Otro evento que forma parte de la respuesta de la planta al ataque por patógenos es la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) las cuales tienen un doble papel, uno es el ser moléculas de señalización y el segundo como moléculas que afectan el crecimiento e invasión del hongo. Sin embargo cuando los niveles de los EROs son muy elevados estos también afectan a la planta, y para controlar los niveles se sintetiza la catalasa que dismuta el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno. Con estos antecedentes era importante saber el efecto de FB1 en la expresión del gen de la catalasa. Sin embargo no se detectó la expresión de este gen durante la germinación ni en ausencia ni en presencia de la toxina.

R

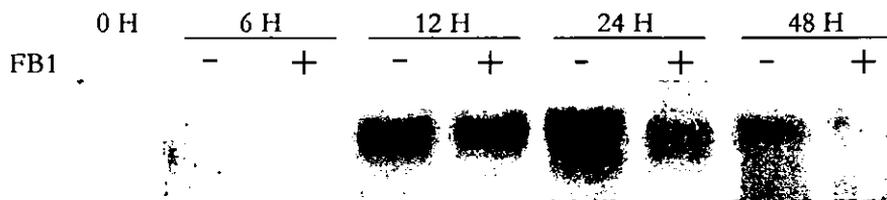


Figura 10. Inducción de los transcritos de PAL en ejes embrionarios de maíz Chalqueño durante la germinación en ausencia (-) o presencia (+) de FB1 (10  $\mu$ M). ARN total (20  $\mu$ g por carril) se extrajo en cada tiempo indicado para hacer el análisis de northern blot; R, ribosomales.

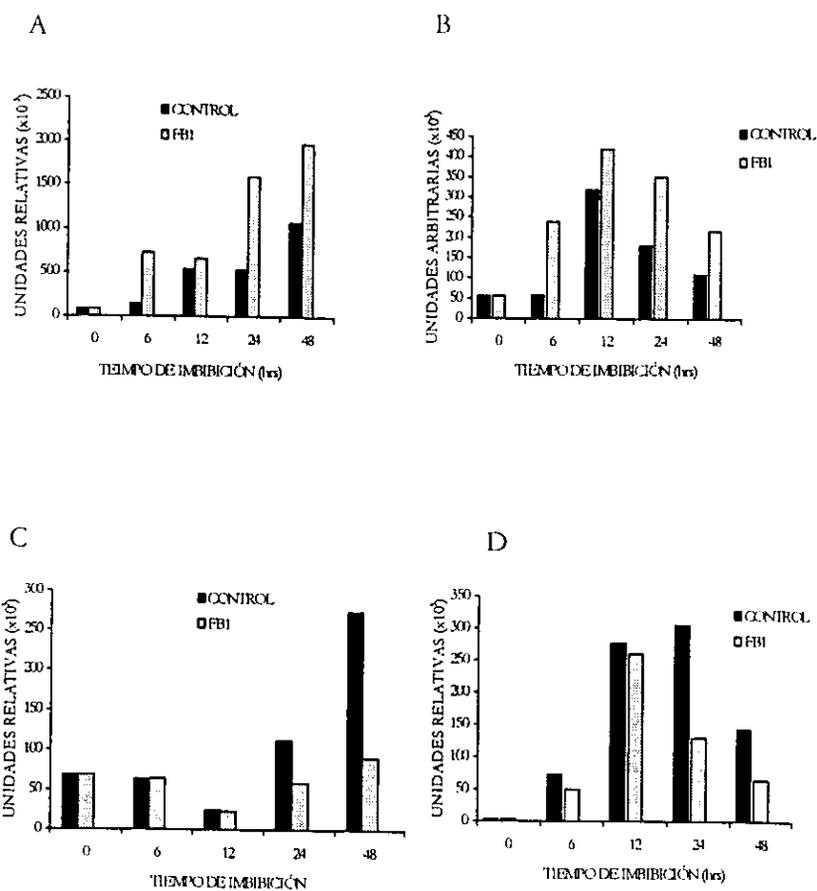


Figura 11. Análisis densitométrico de la expresión de los genes de la HRGP (A), quitinasa (B), glucanasa (C) y PAL (D) de maíz Chalqueño; las unidades están dadas en píxeles.

## EXPRESIÓN DE GENES PR Y PAL EN EJES EMBRIONARIOS DE MAÍZ H-355

Parte del objetivo era la comparación del efecto de la FB1 en la expresión de los genes de defensa en dos variedades de maíz. En la variedad del híbrido H-355 se estudiaron 3 de los 4 genes que se expresan durante la germinación en el maíz Chalqueño.

La expresión del gen de PAL en el maíz híbrido (figura 12) es constitutiva durante la germinación y se observa el transcrito desde las 6 horas de imbibición, con un máximo de expresión a las 24 horas. La expresión de este gen se reduce en presencia de la toxina durante las primeras 24 horas ya que los niveles del transcrito fueron claramente menores a las 12 y 24 horas (figura 12).

Sin embargo a estos tiempos el efecto de represión del gen causado por FB1 es de por lo menos 2.3 y 0.5 veces respectivamente, lo cual nos indica que desde el inicio de la germinación hasta las 24 horas, la FB1 reprime diferencialmente la expresión de este gen. En contraste, a las 48 horas cuando los ejes fueron embebidos con FB1 la expresión de PAL aumento con respecto al control. Esta inducción fue de aproximadamente 2 veces (figura 15A).

En la figura 15 se muestra las densitometrías, las cuales solo nos dan una idea cuantitativa de los efectos de la toxina en la activación o represión de la expresión de los genes, ya que esta tiene ciertas restricciones en la cuantificación dando datos que no representan fielmente lo observado en las figuras de los northern blots.

**ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA**

26S

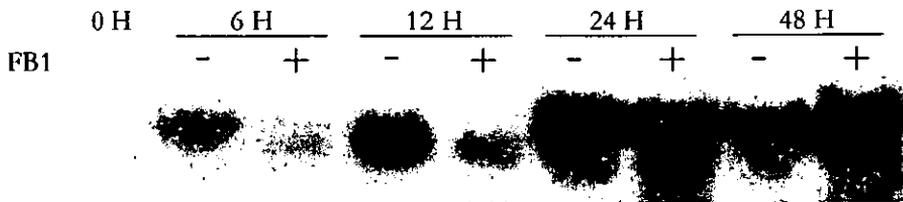


Figura 12. Inducción de los transcritos de PAL en ejes embrionarios de maíz H-355 durante la germinación en ausencia (-) o presencia (+) de FB1 (10  $\mu$ M). El ARN total (20  $\mu$ g por carril) se extrajo en cada tiempo indicado para hacer el análisis de northern blot.

El análisis de la expresión de la quitinasa en esta variedad de maíz (figura 13) mostró que hay una expresión del transcrito en ejes control desde las 6 horas con un máximo a las 24 horas de la germinación. La exposición de los ejes a la FB1 causa una ligera inducción del transcrito que se observó a las 24 horas y con mayor claridad a las 48 horas. La inducción del transcrito a las 48 horas, es de cerca de 8 veces con respecto al control (figura 15B). La inducción del gen de la quitinasa es dependiente del tiempo observándose un máximo a las 48 horas. Estos datos nos muestran que, para este gen, la FB1 induce lentamente la expresión en las primeras horas de la germinación; pero una vez que los eventos en la germinación están bien establecidos esta inducción se incrementa sustancialmente.

Los resultados para el gen de la glucanasa se muestran en la figura 14 en la cual se observa que la expresión de los transcritos se da desde las 6 horas de la germinación con un máximo a las 24 horas. Al incubar los ejes embrionarios del maíz con FB1, la expresión de éste se ve reprimida marcadamente a las 24 y 48 horas.

En la figura 16 podemos observar que el gen de la glucanasa presenta un comportamiento muy similar en las dos variedades de maíz, en cambio para el gen de la quitinasa el comportamiento entre las dos variedades es muy diferente, en el Chalqueño se da una inducción transitoria. Para el gen de la PAL se observa una represión, si lo comparamos con los datos de los controles, tanto en el maíz Chalqueño como en el H-355, esta represión se observa hasta las 48 horas en el maíz Chalqueño y en el H-355 hasta las 12 horas después de este tiempo en el maíz H-355 la represión se revierte y se observa una inducción hasta las 48 horas.

En resumen, retomando todos los datos podemos observar que los principales efectos de la FB1 es la de inducir la expresión de gen de la HRGP y de la quitinasa desde las primeras horas de la germinación (6 y 12 horas respectivamente) con un máximo en las siguientes horas (24 y 48 horas) y por otra parte la de reprimir genes tales como el de PAL y el de glucanasa.

R

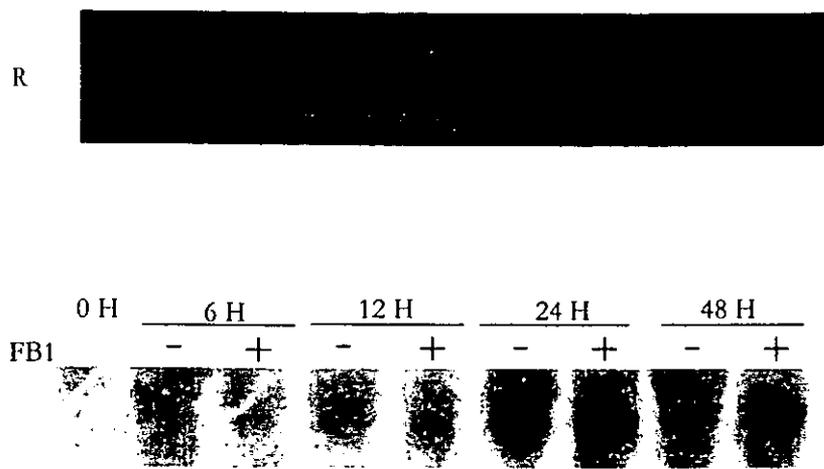


Figura 13. Inducción del transcrito de Quitinasa por FB1 en ejes embrionarios de maíz H-355 durante la germinación. El ARN total de ejes embrionarios crecidos en medio con (+) y sin (-) fumonisina B1 a diferentes tiempos se sometieron a un análisis de northern blot; R, ribosomales.

26S

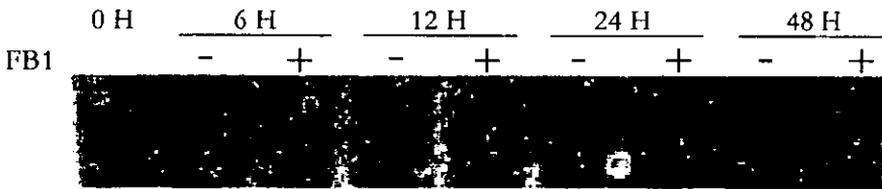


Figura 14. Inducción de los transcritos de glucanasa en ejes embrionarios de maíz H-355 durante la germinación en ausencia (-) o presencia (+) de FB1 (10  $\mu$ M). El ARN total (20  $\mu$ g por carril) se extrajo en cada tiempo indicado para hacer el análisis de northern blot.

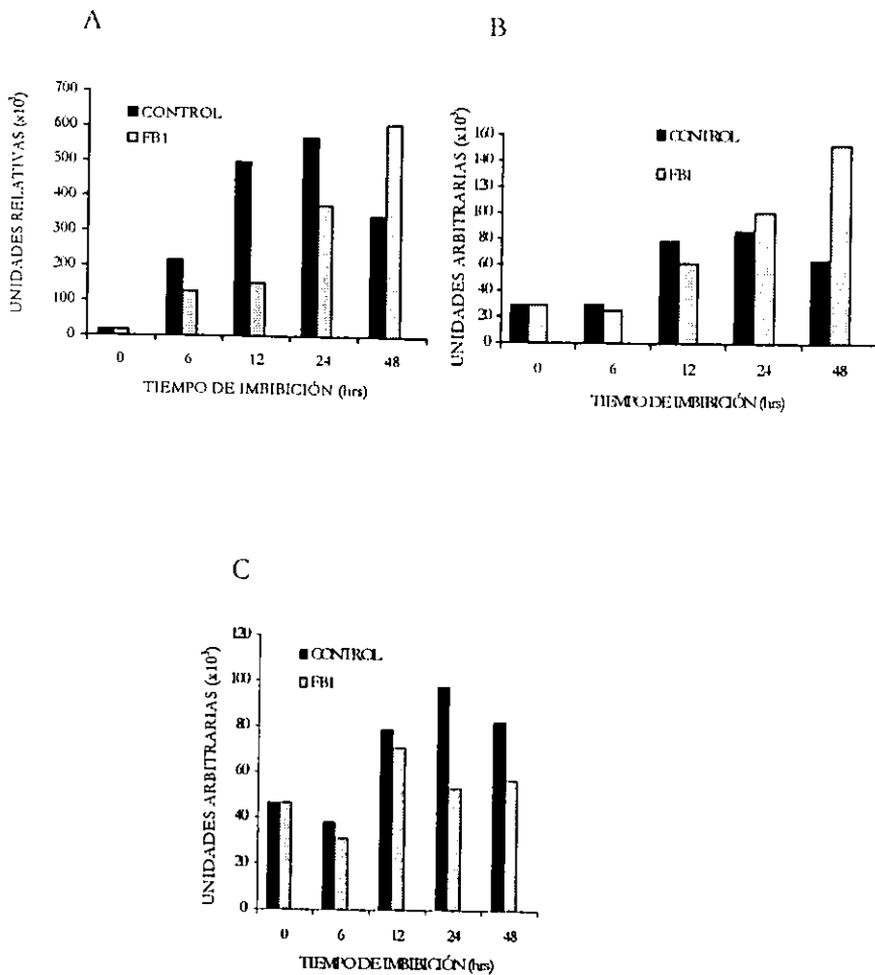
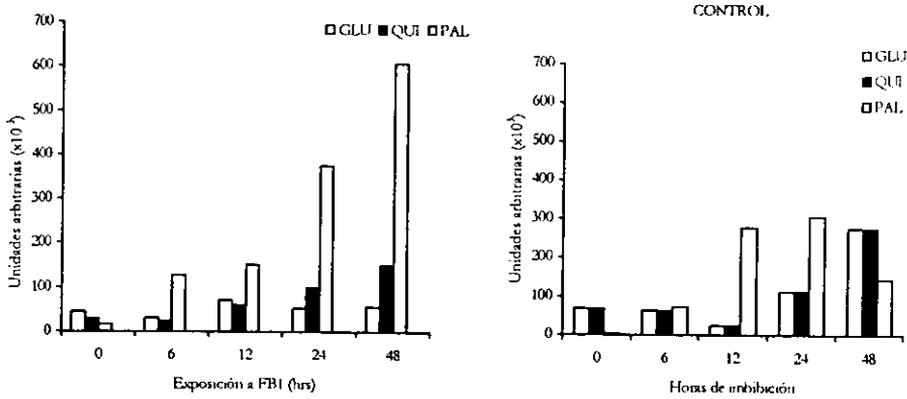


Figura 15. Análisis densitométrico de la expresión del gen de la PAL (A), quitinasa (B) y glucanasa (C) de maíz H-355; Las unidades están dadas en pixeles.

A



B

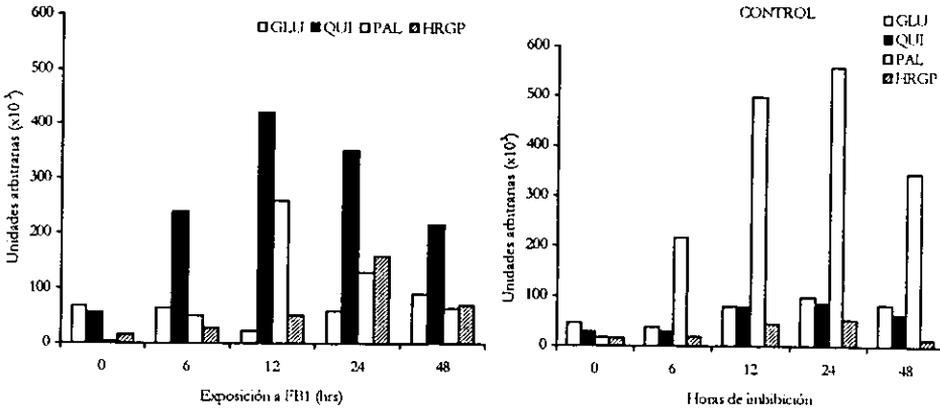


Figura 16. Comparación de la expresión de los genes de fenil amonio liasa (PAL), quitinasa (QUI) y glucanasa (GLU) de ejes embrionarios de maíz Chalqueño (B) y H-355 (A) bajo el efecto de FBI. Las unidades arbitrarias están dadas en pixeles.

## VII. DISCUSIÓN

La elongación radicular es un evento limitante que se reflejará en la germinación, el desarrollo y establecimiento de la plántula nueva que se origina y en este estado la semilla es muy susceptible a factores bióticos y abióticos. En este trabajo se demostró que la FB1 a una concentración de 10  $\mu\text{M}$  afecta la elongación radicular de ejes embrionarios de maíz sin abolir la germinación de éstos. En un trabajo anterior, Doehlert y colaboradores (1994) demostraron que la FB1 tenía el mismo efecto en semillas completas de maíz con un 50% de inhibición de la elongación a una concentración de 0.068 mg/ml (94  $\mu\text{M}$ ). El mismo efecto hemos observado en ejes embrionarios o embriones completos de semilla de maíz. Aunque la fumonisina B1, a éstas dosis (10  $\mu\text{M}$ ) permite la germinación, afecta gravemente la elongación lo que podría comprometer seriamente el establecimiento de la plántula, ya que el hongo puede infectar a la semilla de dos maneras, una cuando llega a la mazorca de una planta madura e infecta a la semilla provocando la pudrición en ambas estructuras y la segunda cuando el hongo esta presente en la semilla seca debajo del pericarpio y al germinar puede infectar sistemáticamente a la plántula en desarrollo. Recientemente Desjardins y Plattner (2000) reportaron que esta toxina no es un factor determinante en la patogénesis del hongo, pero en general se observan síntomas más severos, como un menor porcentaje de emergencia de plántulas y tallos más cortos cuando las semillas son inoculadas con cepas que producen altas cantidades de fumonisinas en un rango de 10 a 9 000  $\mu\text{g/g}$  (Desjardins *et al.*, 1995).

En este trabajo se estudió el efecto de la FB1 en la expresión de genes de defensa que representan la producción de enzimas líticas, el reforzamiento de la pared celular, la síntesis de fenilpropanoides y la generación de especies reactivas de oxígeno ya que éstas respuestas son las más significativas que se inducen en la célula vegetal cuando están en presencia de algún microorganismo patógeno o alguna molécula (elicitor) producida por éste. Se observó que algunos de estos genes se expresaron durante la germinación normal pero la FB1 alteró su

patrón de expresión. La mayoría de los reportes donde se ha estudiado la expresión de éstos genes han utilizado tejidos como hoja, tallo o bien células en cultivo pero hay pocos reportes durante la germinación de las semillas.

El efecto de la FB1 (10  $\mu$ M) sobre la Chalqueño como en el H-355 se realizó durante la germinación de los ejes embrionarios. El patrón de expresión de este gen es diferente en las dos variedades; en el maíz Chalqueño se inicia a las 12 horas y en el H-355 es hasta las 24 horas, éstos últimos datos concuerdan con los datos de Wu *et al.* (1994a) donde reportan que esta quitinasa se expresa en embriones de maíz durante la germinación desde las 24 horas y hasta las 72 horas después de las cuales decaen los niveles del transcrito. Este gen también se expresa en semillas de maíz completas embebidas durante dos días, así como en raíz y tallo (Huynh *et al.*, 1992). En otras especies de plantas se ha reportado la expresión de quitinasas, por ejemplo en arroz se expresa en niveles muy bajos durante la germinación y en callos (Takakura *et al.*, 2000), en semillas de cebada, en el tejido de la aleurona, la expresión es muy alta (Leah *et al.*, 1991). Estos datos indican que la expresión de quitinasas es muy variable y depende de diversos factores. Otro factor que puede influir en el patrón de expresión observado es la variedad del maíz, mientras que en la variedad Chalqueño la expresión del gen se detectó desde las 12 horas, para la variedad H-355 se observó a partir de las 24 horas de germinación.

En este estudio se encontró que el gen de la quitinasa es inducido por la toxina FB1 durante la germinación de los ejes embrionarios de maíz Chalqueño y la expresión máxima se observó a las 12 horas y a las 48 horas no se observa ningún efecto, pero esta inducción fue solo transitoria. En el maíz H-355 la inducción se observó a las 24 conservándose hasta las 48 horas. La inducción de este gen presenta un patrón muy similar entre las dos variedades dentro de las 48 horas de la germinación pero hay un desfase de 12 horas, en maíz Chalqueño la expresión en ejes control e inducción es a las 12 horas y posteriormente (24 horas) decae la expresión y la inducción, el mismo patrón se observó para ejes embrionarios del maíz H-355 pero a las 24 y 48 horas respectivamente. En general en las dos variedades se observó una inducción del gen lo cual confirma que este gen es inducido por la FB1, con tiempos desfasados, indicándonos que existen diferencias dadas por características propias de cada genotipo.

Se ha reportado que en las interacciones planta-patógeno las quitinasas son inducidas en varios tejidos. En semillas de maíz infectadas con *F. moniliforme* hay una inducción de una proteína RP básica (Casacuberta *et al.*, 1991) que si bien no es una quitinasa, pertenecen a la misma familia, cuya característica común es la inducibilidad durante distintos tipos de interacciones planta-patógeno. Esto asienta que el gen de esta enzima es activado cuando hay un elicitor y que muy probablemente se activa cuando se da la infección por el patógeno durante la germinación del maíz. En otras plantas se ha reportado que este gen es inducido cuando está presente el patógeno, como por ejemplo en hojas de frijol en presencia de *Pseudomonas syringae* (Meier *et al.*, 1993), en hojas de papa con *Phytophthora infestans* (Beerhues y Kombrink, 1994) y en tomate cuando es infectado por *Cladosporium fulvum* (Danhash *et al.*, 1993). Sin embargo, existen muy pocos estudios en semillas durante la germinación en presencia de un elicitor, donde se reporte los efectos en la expresión de este gen. En conjunto los datos sugieren que la repuesta de la quitinasa en la germinación es un evento que se da durante las primeras horas. La actividad hidrolítica de las quitinasas sobre pared celular de hongos patógenos constituye un mecanismo de defensa de la planta (Huyh *et al.*, 1992).

La glucanasa y la quitinasa forman parte de la familia de proteínas PR y en varios sistemas se ha observado la expresión conjunta de ambos genes. En hojas de tomate infectadas por el hongo *Cladosporium fulvum* se activa la inducción conjunta de los genes de estas enzimas (Benhamou *et al.*, 1990). Sela-Buurlage *et al.* (1993) en un ensayo *in vitro* encontraron que la quitinasa y glucanasa de tabaco lisan las puntas de hifas de *Fusarium solani* inhibiendo el crecimiento del hongo. En hojas de papa tratadas con el hongo *Phytophthora infestans* con una preparación cruda de éste se observa un incremento fuerte en la actividad de quitinasa y glucanasa (Beerhues y Kombrink, 1994).

En este trabajo se observó la represión del gen de la glucanasa tanto para el maíz Chalqueño como para el H-355. En el maíz Chalqueño se observó la expresión del gen a partir de las 48 horas de germinación control y no se observó cuando se imbibieron en presencia de FB1. En la variedad de maíz H-355 la expresión de este mismo gen se detecta desde las 6 horas y a las 24 horas claramente se detecta que la FB1 reprime su expresión.

La activación del gen de la glucanasa se ha reportado en diferentes especies de plantas aun bajo estímulos distintos al de un patógeno. En tabaco, el etileno y el ozono inducen la expresión de este gen (Vögeli-Lange *et al.*, 1994); en plántulas de maíz la activación del gen se

induce por ácido salicílico, el etefon, generador de etileno, cloruro mercúrico, infección con *Aspergillus flavus* y cicloheximida; en semillas se ha detectado la activación del gen de la glucanasa en presencia de *A. flavus* solo en la capa de la aleurona, pero en semillas control no hay expresión; en embriones germinando no se ha observado la expresión de la glucanasa ni aun infectando con *A. flavus* (Wu *et al.*, 1994b). Stone *et al.* (2000) reporta la inducción de la glucanasa (PR2) en plántulas de *Arabidopsis* expuestas a FB1 (1  $\mu$ M) por cuatro días, pero no hay estudios de la expresión del gen a tiempos más cortos. Nuestro estudio se acotó a la expresión en el eje embrionario germinando durante 48 horas.

No se observó la inducción conjunta de los dos genes por el tratamiento con FB1, lo que se sugiere una expresión diferencial a ciertos estímulos, cuando se emplean compuestos aislados del patógeno en forma pura ya que la mayoría de los trabajos hechos con elicitores ha empleado preparaciones crudas de pared celular del hongo. Otro trabajo que reporta una expresión diferencial es en hojas de tomate expuestas a pared celular de *P. infestans* donde las glucanasas de la clase 1 no son inducidas pero la quitinasa sí (Hirmova *et al.*, 1995). Por lo menos para estas dos enzimas, que si bien exhiben una alta actividad antifúngica en combinación, no responden de igual manera a todos los estímulos y ésta expresión también dependerá del tipo de tejido y estado de desarrollo de que se trate.

Otro de los genes estudiados fue el de la PAL, cuya transcripción se activa en respuesta a varios estímulos externos. En hojas de arroz se induce la expresión del gen por luz, daño mecánico o inoculación con un extracto de pared celular del hongo patógeno *Magnaportha grisea* (Zhu *et al.*, 1995). En tabaco, el tratamiento con megaspermina, un elicitador, induce a este gen en forma rápida y transitoria en hojas y tallos (Pellegrini *et al.*, 1994), así como cuando el virus del mosaico de tabaco infecta en hojas, pero este efecto se observa 38 horas después de iniciada la infección (Pellegrini *et al.*, 1994). Este gen también se expresa durante el desarrollo de la planta, por ejemplo en melón, la expresión de PAL se incrementa en la maduración del fruto (Diallinas y Kanellis, 1994); en perejil se expresa en raíz, tallo, hojas y flores, siendo muy baja la expresión en tejido viejo comparado con tejidos más jóvenes (Appert *et al.*, 1994). En *Arabidopsis thaliana* se expresa en hojas, inflorescencia, raíz y plántulas en diferentes estados de desarrollo (Wanner *et al.*, 1995) y en hojas, de esta misma especie, se ha observado la inducción del gen en respuesta a la infección por especies patogénicas de *Pseudomonas* (Wanner *et al.*, 1995). Normalmente este gen se expresa en varios tejidos. Si bien no existen trabajos donde se

haya estudiado la expresión de PAL en semillas, si se ha descrito que este gen es expresado en tejido en desarrollo o joven (Appert *et al.*, 1994; Osakabe *et al.*, 1995).

El efecto de la FB1 sobre la expresión del gen de la PAL es de represión durante las primeras 24 horas en ambas variedades del maíz. Sin embargo, en la variedad H-355 después de la represión a las 24 horas, se observa una inducción, a las 48 horas, con lo cual podríamos hipotetizar que al seguir durante mas tiempo el ensayo se encontraría una inducción del transcrito de PAL y esto implicaría que la inducción de PAL sería una respuesta tardía en los eventos de señalización de la respuesta a un elicitador por parte del eje embrionario de maíz. Estos datos también sugieren que en el proceso de infección, la toxina podría funcionar como represor de las repuestas para facilitar la infección.

Se ha demostrado que el gen de la PAL es inducido en respuesta a radiación UV en células de perejil y en frijol. El promotor de este gen en éstas especies se ha demostrado que presenta secuencias conservadas en su región promotora las cuales responden a éste estímulo (Lois *et al.*, 1989). En perejil éstas secuencias también están involucradas en respuesta a un elicitador. Así, se podría pensar que en la secuencia del gen de la PAL podría encontrarse secuencias parecidas que regularan la activación del gen en maíz ya que se reporta que para varias especies éstas secuencias son conservadas y son estimuladas tanto con luz UV como con un elicitador por ejemplo la chalcon sintasa, presenta una activación de su expresión ante estos dos estímulos en maíz, *Arabidopsis* y frijol, así como la PAL de *Petraselinum crispum* (Lois *et al.*, 1989). Durante la imbibición los ejes germinan en oscuridad por lo que podría pensarse que este gen requiere de luz para su inducción.

La arquitectura de la pared celular es parte importante en las células de la planta y entre los componentes se encuentran proteínas como la HRGP. Existen varios reportes en los cuáles la expresión del gen de esta proteína se observa en varios tejidos en dicotiledóneas, por ejemplo en tallos y pecíolos de frijol (Wycoff *et al.*, 1995); en tallos de soya (Ye y Varner, 1991); en tallos y hojas de tabaco (Tiré *et al.*, 1994). En monocotiledóneas, se ha observado la expresión en hoja, embriones, coleoptilos, plúmula y raíz de maíz (Stiefel *et al.*, 1990), así como en raíz de arroz (Guo *et al.*, 1994). Este gen también es inducido por varios factores tanto abióticos como bióticos; en hojas, tallos y pecíolos de frijol con daño mecánico (Wycoff *et al.*, 1995); en hojas y tallo de tabaco cuando hay una infección, daño mecánico o en presencia de ácido salicílico (Tiré *et al.*, 1994); en hojas de arroz cuando hay daño mecánico o en presencia

de ácido abscísico o  $\text{CaCl}_2$  se da la inducción (Guo *et al.*, 1994); en coleótilos, embriones, hojas, plúmula, hipocótilo y raíz de maíz el gen se induce al provocar daño mecánico o en presencia de etileno. En cultivo de células en suspensión de maíz se ha mostrado que hay una inducción del transcrito en presencia de micelio de *F. moniliforme*, así como en la embriogénesis, y en las primeras horas de germinación por varios tipos de estrés (García-Muñiz *et al.*, 1998; Josè-Estanyol y Puigdomènech, 1998).

La fumonisina B1 indujo la expresión del gen de HRGP en la variedad de maíz Chalqueño. Este transcrito se expresa desde las primeras horas de la germinación en los controles y se ha reportado que es de suma importancia para reforzar la pared celular y que además es activado en las primeras horas de la germinación (Stiefel *et al.*, 1990).

En la línea celular CV1 de riñón de mono se ha reportado que la toxina FBI induce la expresión de la proteína p21, un inhibidor de las cinasas de ciclinas. El análisis detallado del promotor del gen de esta proteína por experimentos de cambio de movilidad y "footprinting" determinó que los elementos Sp1 con las siguientes secuencias centrales GGGCG o CCCGC son los responsables de esta activación (Zhang *et al.*, 1999). El análisis de la secuencia promotora del gen de HRGP de maíz (Raz *et al.*, 1992) mostró dos elementos iguales a los reportados por Zhang y se localizan en las posiciones -175 y -341 (figura 17).

Una de las primeras respuestas de las plantas ante ataque por patógenos es la producción de EROs acompañado de enzimas para evitar el daño que podrían causar las EROs. La expresión de la mayoría de las catalasas, en maíz, responde diferencialmente a señales de luz (Polidoros y Scandalios, 1997) y otros tipos de estrés aunque también se expresan en condiciones normales en diferentes plantas. Las catalasas también responden a cambios de temperatura (Dat *et al.*, 2000). En la semilla de la planta de ricino el ARNm de cat1 está presente abundantemente en el endospermo, cotiledones y solo una pequeña cantidad en raíces, pero el ARNm de cat2 es más abundante en hipocótilos y en raíz mientras que endospermo y cotiledones contienen solo pequeñas cantidades de este transcrito. El ARNm no se encuentra en semillas secas pero durante la germinación hay una acumulación temporal en el endospermo en repuesta (Suzuki *et al.*, 1994). La inducción de cat2 en hojas de papa está dada por bacterias y por nemátodos (Niebel *et al.*, 1995). En hojas de papa hay una inducción de cat2 cuando se exponen al ácido araquidónico, un elicitador del hongo *Phytophthora infestans*. Recientemente se reportó que la sobre expresión del gen de cat2 de tabaco en plantas de papa

transgénicas induce una expresión constitutiva del gen endógeno de la catalasa y esto se ha asociado a un incremento en la resistencia a *P. infestans* (Yu *et al.*, 1999).

## A

```
-157 GCTCCGCGCTGGGCAGCCAGGAAGCCTGGGCCCCGGGGAGGGCGGTCCCGGGCGCGCG
      CGAGGCGCGACCCGTGGTTCCTTCGGACCCGGGCCCCCTCCCGCCAGGGCCCCGCGCGC

-100 GTGGGCCGAGCGCGGGTCCCGCCTCCTTGAGCGGGCCCGGGCGGGCGGTTGTATAT
      CACCCGGCTGGCGCCAGGGCGGAGGAACTCGGCCCGGGCCCGCCCGCCAACATATA
```

## B

```
-403 TAACGTGAGTAATCTGGGAACTACTTGTAGATGCAAACGATGTAATCCACCTGTGCCCGCCCGGC
-337 TCTATCCATTCCATTCTCAACACGCAAGTTCAGACTGGACCAGTGAGCGGTGCCGGTGAACCCAG
-271 CCAAAGCGAGTGACCATCGGGGAAGCCTCCCGTGTCTGCCCCACATGGCTTGGCTGAATGCCTCTC
-205 GCCGCAGTGCCTCTCTCTCTCTCCGTGGAAGGGCGTCACGAGAGCCCAGAGCGGATCCGAGGC
-139 CCCCACCCACCCCTTCTCTCCGTGTATATAAGCAGTGGCAGGGTGAGCGTCTCTCTCAGACCACCA
-72 CTGCGCCATTGGCCAGCTAGAGCCAACCAGAAGAGCTTCGAGTACTGAGAGTGTGTGTGAGAGA
-7GAGGATG
```

Figura 17. Los elementos Sp1 se muestran encerrados en el rectángulo y la secuencia central subrayada. A, Secuencia de la región promotora del gen humano p21 (-157 a -42). B, Secuencia del promotor del gen de HRGP de maíz (número de acceso X63134 en AMBL/GenBank Database). Los elementos Sp1 identificados se encuentran subrayados con una línea sencilla. La caja TATA se distingue por una doble línea debajo de la secuencia y la línea punteada indica el sitio de inicio de la transcripción.

En maíz el transcrito de *cat2* aparece durante el desarrollo tardío del grano e incrementa dramáticamente en escutelo después del 4º día de imbibición, está ausente en hojas etioladas pero se acumula rápidamente por exposición a la luz. En embriones tratados con ácido giberélico (AG), ácido abscísico (ABA) y ácido salicílico (AS), con diferentes días de exposición, el gen es inducido diferencialmente. El patrón de expresión de *cat2* no cambia bajo el efecto del AG, sin embargo, los transcritos incrementan dramáticamente con ABA y ligeramente con un tratamiento de AS (Guan *et al.*, 1996). *Cat2* responde a la toxina cercosporina diferencialmente en dos estadios del desarrollo embrionario en presencia de 10 µM de cercosporina incrementa el transcrito y en germinación hay inducción creciente con un máximo a una concentración de 20 µM; *Cat2* también responde a AS diferencialmente en estos

dos estados (Williamson y Scandalios, 1993). En plántulas de maíz expuestas a ozono, el nivel de los transcritos de *cat2* decae (Ruzsa *et al.*, 1999).

En este trabajo, no se encontró expresión del gen *cat2* en los tiempos estudiados en ejes embrionarios de maíz, a diferencia del reporte de Guan *et al.* (1996) en el cual trabajan con ARNm de escutelo separado de semillas después que fueron tratadas con diferentes compuestos (ABA, GA3 y AS) así como de semillas control. Asimismo tampoco se pudo detectar la producción de peróxido de hidrógeno en este tejido (datos no publicados), que es un inductor de la síntesis de catalasa. Recientemente, se ha reportado que en plantas de *Arabidopsis thaliana* expuestas por cuatro días a FB1 (1  $\mu$ M) se acumulan especies reactivas de oxígeno en las hojas, lo que indica la activación de metabolismo oxidativo (Stone *et al.*, 2000). Esta discrepancia con nuestros resultados podría deberse al tiempo de exposición con la toxina, al tejido empleado y a la diferencia de susceptibilidad entre *Zea mays* y *Arabidopsis thaliana*.

Los resultados mostraron que la FB1 indujo una expresión diferencial de los genes estudiados durante la germinación de ejes embrionarios de maíz; mientras que la HRGP y la quitinasa fueron inducidos, el gen de la glucanasa fue reprimido en ambas variedades de maíz. El gen de la PAL en el maíz Chalqueño es reprimido pero en el maíz H-355 se encontró represión durante las primeras horas de la germinación pero a las 48 horas se observó una clara inducción, aunque ya no se continuo el estudio en tiempos posteriores.

Hay pocos reportes sobre la expresión de genes de defensa durante la germinación, que es un estadio previo al establecimiento de la plántula y en el cual hay una alta susceptibilidad a patógenos. Este es uno de los primeros trabajos donde se estudió la expresión de genes claves de diferentes rutas metabólicas involucradas en la respuesta de defensa de la planta ante una molécula fitotóxica producida por el patógeno.

El efecto diferencial de la toxina en la expresión de estos genes de defensa que se observó se podría explicar por el modo de acción molecular de la FB1 que mejor se ha caracterizado. En sistemas animales (Yoo *et al.*, 1992, 1996) y vegetales (Abbas *et al.*, 1994) se ha encontrado que la FB1 inhibe la actividad de esfinganina N-aciltransferasa, la cual condensa una molécula de esfinganina con acetil CoA para producir ceramida (Lynch, 2000). La inhibición competitiva de esta enzima causa la acumulación de esfinganina, fitoesfingosina y reduce los niveles de ceramida en la célula. En células animales la acumulación de esfinganina y

esfingosina pueden tener muchos efectos como la inhibición del crecimiento, cambios morfológicos y muerte celular en varios tipos de células (Merrill *et al.*, 1997). A su vez, estas bases esfingoideas pueden actuar sobre otros blancos como son las proteínas cinasas o MAP cinasas que están involucradas en la transducción de señales. La cascada de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) involucra la actividad coordinada y secuencial de tres familias de proteínas conocidas como MAPK, MAPKK y MAPKKK. La actividad de estas MAPK es positivamente regulada por fosforilación en aminoácidos específicos. Las MAPKKK y la MAPKK son proteínas citoplásmicas que fosforilan únicamente MAPKK y MAPK respectivamente, pero la MAPK activa puede fosforilar numerosos sustratos, como proteínas citoplásmicas, de citoesqueleto, de membrana y de núcleo incluyendo factores de transcripción que coordinan cambios en la expresión de genes en respuesta a un estímulo inicial (Jonak *et al.*, 1999).

Se ha reportado que la FB1 en células animales modula la actividad de MAP cinasas y que es una respuesta temprana. En fibroblastos Swiss 3T3 la FB1 (75  $\mu\text{M}$ ) modula la actividad de dos MAPK, observándose en los primeros minutos un incremento en la actividad (Wattenberg *et al.*, 1996). En estas mismas células se ha observado la acumulación de esfinganina y esfingosina en presencia de FB1 después de tres horas. Sin embargo, falta determinar si en los primeros minutos se acumulan esfingosina y esfinganina y si los niveles son suficientes para la activación de MAPK. En plantas, se ha reportado la activación de módulos de MAP cinasas en presencia de elicitores como pared celular de hongos y proteínas derivadas de pared celular de los mismos (Klessig *et al.*, 2000). En perejil estas enzimas, son translocadas a núcleo sugiriendo un papel de regulación en genes inducidos por elicitores (Jonak *et al.*, 1999). En el laboratorio ya se ha demostrado que la FB1 (10  $\mu\text{M}$ ) induce la acumulación de esfinganina en ejes embrionarios de maíz que se encuentra en una concentración hasta de 10 veces más alta que en los tejidos control a las 24 horas (Rivas San Vicente, comunicación personal).

En sistemas animales la acumulación de esfinganina y esfingosina inhiben a la proteína cinasa C, estimula fosfolipasa D y causa movilización de  $\text{Ca}^{2+}$ , en cambio la ceramida activa proteínas cinasas, fosfatasa y MAPK pero inhibe a la fosfolipasa D. En plantas no se han estudiado los efectos que producen estas bases esfingoideas, pero podría especularse que la acumulación de esfinganina por FB1 promueva la movilización de  $\text{Ca}^{2+}$  vía fosfolipasa D para

activar MAPK y desencadenar la cascada de éstas enzimas activando el gen de la quitinasa y HRGP por la fosforilación de factores de transcripción. Sin embargo, la esfinganina podría también inhibir a una proteína cinasa involucrada en la ruta de MAPK evitando la activación de genes como la PAL y la glucanasa. Asimismo, si efectivamente se reducen los niveles de ceramida y esta molécula está involucrada en la activación de ciertas cinasas, se podría explicar la inhibición de la transcripción de genes como podrían ser glucanasa y PAL.

En la ruta de señalización el ácido salicílico (AS) y el ácido jasmónico (AJ) son hormonas importantes que han sido implicadas en amplificar la señal inicial e incrementar la expresión de varios genes que responden a patógenos. Los diferentes patrones de expresión son el resultado de la estructura de las regiones promotoras de los genes, las cuales presentan diferentes elementos que representan el último receptor de toda la ruta de señalización, como por ejemplo, en el caso de la transducción de señales por vía de la MAPK es importante la activación por fosforilación de factores de transcripción para activar ciertos genes. Recientemente se ha reportado que existen proteínas de unión a DNA las cuales se unen a ciertas regiones de la secuencia promotora de genes para activar su transcripción y cuya presencia está asociada con incremento en los niveles de AS, AJ y ABA. Por ejemplo la caja W, con una secuencia TTGACC, donde se unen proteínas WRKY a la región promotora de genes de PR1 y PR2 en perejil (Rushton y Somssich, 1998). Con estos antecedentes podría pensarse que probablemente la región promotora de los genes reportados en este trabajo presente secuencias específicas que sean activadas por proteínas pertenecientes a la transducción de señales en la que participan esfingolípidos cuyos niveles se alterarían por la FB1.

Con todos estos datos se pueden sugerir dos hipótesis: una en la que la FB1 pueda estar afectando la actividad de la N-acil-transferasa, provocando la acumulación de bases esfingoideas (esfinganina) y que éstas a su vez actúen sobre intermediarios como podrían ser proteínas cinasas o fosfatasas que activen factores de transcripción que lleguen hasta el núcleo para activar o reprimir los genes de defensa; y la segunda es que la fumonisina B1 esté actuando directamente sobre una MAP cinasa o indirectamente, vía esfingolípidos por ceramida o esfingosina, para activar un módulo de MAP cinasas interviniendo en la cascada de señalización para activar algunos de los genes estudiados (figura 18).

Una estrategia para analizar si efectivamente los niveles de bases esfingoideas están participando en la ruta de señalización involucrada en la inducción de genes de defensa, sería la

adición exógena de esfinganina y fitoesfingosina a ejes embrionarios durante la germinación y estudiar la expresión de estos genes. Si la esfinganina provoca un efecto similar a la FB1 la siguiente pregunta sería probar si en esta cascada de transducción de señales participan MAPK. Para comprobar ésto, se puede determinar la actividad de las MAPK en extractos proteicos de ejes embrionarios germinando en presencia de FB1 o esfinganina. La actividad de estas cinasas se puede analizar mediante geles de actividad usando como sustrato la proteína mielina básica (0.25 a 0.5 mg/ml) y ATP marcado ( $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ -ATP) a temperatura ambiente con un pH 7.6 (Usami *et al.*, 1995; Suzuki y Shinshi, 1995). Se ha reportado en maíz la purificación y caracterización de una MAPK (ZmMEK1) de 39, 874 Da, dependiente de  $\text{Mn}^{2+}$  que es capaz de autofosforilarse (Hardin y Wolniak, 1998).

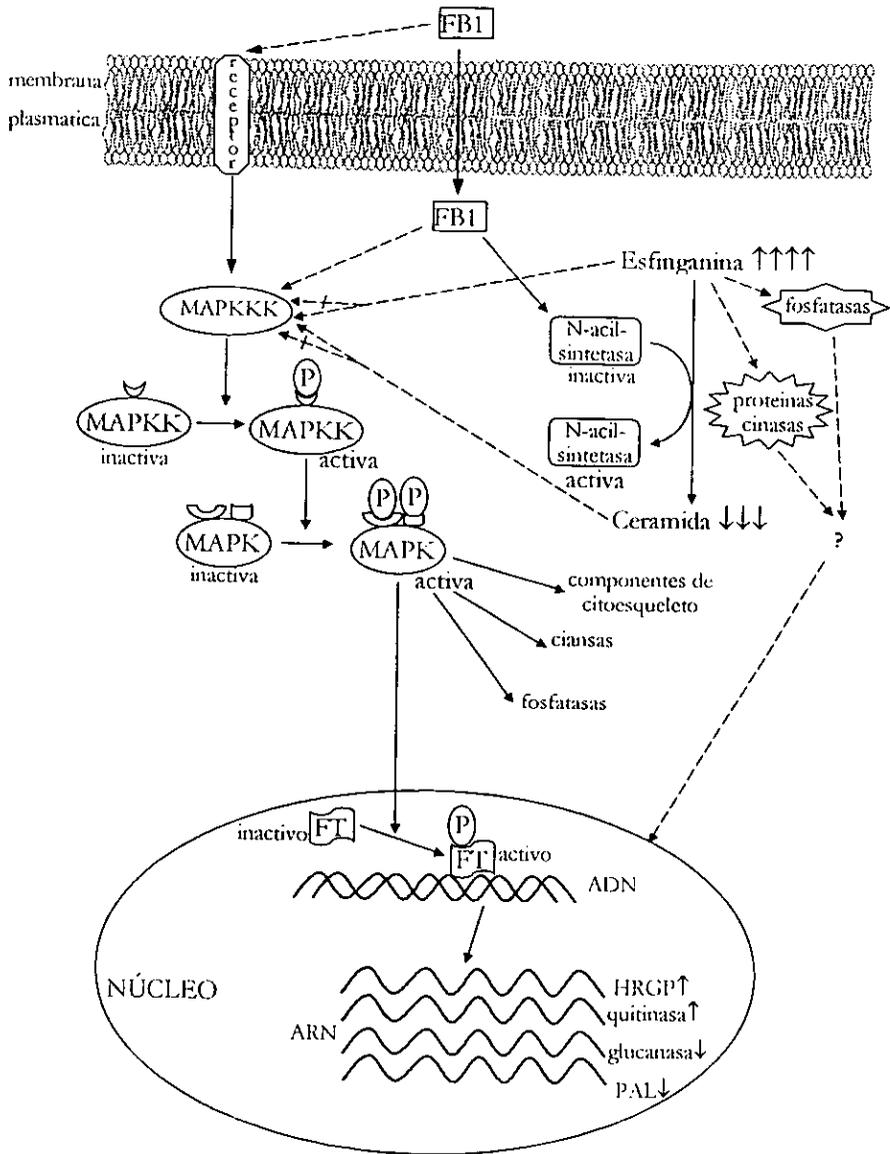


Figura 18. Posible acción de la FB1 en la germinación de ejes embrionarios de maíz. MAPK, proteínas cinasas activadas por mitógenos; FT, factores de transcripción.

## VII. CONCLUSIONES

- Se comprobó que la FB1 reduce significativamente la elongación radicular de ejes embrionarios de maíz. Anteriormente se había visto este efecto pero en semillas completas (Doehlert *et al.*, 1994).
- En ejes embrionarios de maíz la FB1 induce la expresión de solo dos genes de defensa, quitinasa, la glucanasa y la HRGP en las primeras horas de germinación, reprime la expresión del gen de la glucanasa reprime a; gen de la PAL durante las primeras horas de la germinación y lo activa en la variedad H-355.
- No presenta ningún efecto en el gen de la glucanasa.
- En ejes embrionarios existe una expresión diferencial de los genes relacionados con la respuesta de hipersensibilidad (HRGP, PAL, quitinasa y glucanasa) provocada, indirecta o directamente, por la toxina FB1.
- Los resultados de este trabajo, en conjunto con otros, sugieren que la acción de la FB1 en la inducción y represión de los genes estudiados podría estar dada por intermediarios los cuales se acumulan por la acción de la toxina.

# VIII. APÉNDICE

## Cuidados del material para trabajar con ARN

Las dificultades asociadas a lo largo de la purificación, hace el ARN intrínsecamente lábil, debido a la actividad ubicua de la ribonucleasa. Las ARNasas son una familia de enzimas que hidrolizan moléculas de ARN presentando actividad endonucleolítica y hexonucleolítica. Estas son enzimas pequeñas (ARNasa A  $\approx$  14 000 Da.) muy estables, que mantienen su configuración terciaria gracias a 4 puentes disulfuro que permiten su renaturalización rápidamente aún después de un tratamiento con mucho desnaturalizantes, y aún después de hervir en una solución por 20 minutos o más. Las ARNasas tienen cofactores con requerimientos mínimos y son activas en un amplio rango de pH. Es por lo tanto obligatorio que el material y los reactivos estén libres de nucleasas para el comienzo del experimento (Farrell, 1993).

Para las metodologías usadas en los experimentos trabajando con ARN se tuvieron las precauciones que a continuación se mencionan:

**Material de cristalería.** El material se lavara perfectamente con agua corriente y la última enjuagada será con agua destilada. Una vez seco se tapara con papel aluminio y se dejara durante 15 horas en una estufa a 150°C o bien esterilizar a 1.5 Kg/cm<sup>2</sup> durante una hora. Después de esto el material estará listo para usarse (incluyendo los frascos para soluciones).

**Material de plástico.** Incluye dos tipos, los que pueden ser esterilizados en el autoclave una hora a 1.5 Kg/cm<sup>2</sup> como puntas tapas y tubos eppendorf. El segundo tipo son cámaras de electroforesis y contenedores para lavados de membranas, este material se lavaba con un detergente comercial (RNAsasin<sup>®</sup>) dejándolo durante toda la noche en una solución (80:20 v/v agua: detergente) para posteriormente enjuagarlo con agua tratada con DEPC (tres lavados).

El dietil pirocarbonato (DEPC) es un inhibidor de ribonucleasas que reacciona con la histidina del sitio activo de las ARNasas. Sin embargo este es un agente cancerígeno por tanto se debe de tomar todas las precauciones necesarias para trabajar con este compuesto, las cuales se mencionan a continuación.

Agua tratada con DEPC. Agua desionizada es esterilizada durante 1 hora. Esta agua posteriormente se le adicionaba el DEPC a una concentración 1:1000. Esta solución se dejaba en agitación durante toda la noche y por ultimo se esterilizaba en la autoclave a 1.5 Kg/cm<sup>2</sup> una hora (para desactivar el DEPC).

Una fuente de ARNasas son las manos, por eso es de suma importancia utilizar guantes desechables durante el tiempo que dure el experimento.

Soluciones para trabajar con ARN. Estas soluciones se hacían con agua tratada con DEPC usando todo el material esterilizado (espátula, vasos de pp, probetas y magnetos) y guantes, para posteriormente esterilizarlas, las que debían esterilizarse 20 minutos a 1.5 Kg/cm<sup>2</sup>.

## SOLUCIONES

Buffer de imbibición. La solución se preparaba con los siguientes reactivos a estas concentraciones KCl 50 mM; MgCl<sub>2</sub> 10 mM; tris-HCl 50 mM; sacarosa 2% y cloramfenicol 10 mg/ml (este último se adiciona después de esterilizar).

Buffer MOPS 10X.

MOPS (sigma) grado molecular

0.2 M

Acetato de sodio

0.05 M (se hacia un stock a una concentración 3M ajustando el pH a 5.2 con ácido acético 3 M)

EDTA

0.01 M (se preparaba una solución stock a una concentración de 0.5M, ajustando el pH a 8.0 con 10 M de NaOH).

#### Buffer de carga glioxal

Glicerol	50% (v/v)
$\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4$	0.01 M (Este buffer se hace a partir de dos soluciones concentradas, $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ y $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 1M a pH 7)
Azul de bromofenol	0.4%
Glioxal	6 M (40%) desionizado

Normalmente el glioxal tiene un pH ácido, para desionizarlo se toma una alícuota pequeña (1ml) para ponerla en contacto con resina AG<sup>®</sup>501-X8 (D) en un matraz estéril de 10 ml en una razón de 5 g de resina por 50 ml de glioxal.

#### Caldo TB (100 ml)

Peptona	1.2 g
Extracto de levadura	2.4 g
Glicerol	0.4 ml
$\text{KH}_2\text{PO}_4$ (0.5 M)	3.4 ml
$\text{K}_2\text{HPO}_4$ (0.5 M)	14.4 ml

#### Buffer GTE

Tris	0.5 M
Glucosa	0.1 M
EDTA	0.5 M

#### Buffer II PCR 10X para Transcripción reversa

KCl	500 mM
Tris-HCl	100 mM
pH 8.3	

#### Buffer mezcla de random primers

HEPES	0.67 M
Tris-HCl	0.17 M
$\text{MgCl}_2$	17 mM
2-mercaptoetanol	33 mM
BSA	1.33 mg/ml
Cebadores deoxiribonucleotidos pH 6.8	18 DO 260 unidades/ml

Buffer ReAct B 10X

" MgCl <sub>2</sub>	10 mM
NaCl	50 mM
Tris-HCl	50 mM
pH	8.0

Solución GTE (1ml)

Tris 0.5 M	50 ml
EDTA 0.5M	20 ml
Glucosa 0.1 M	500 ml
Agua	430 ml

Solución alcalina (1ml)

NaOH	200 ml
SDS 20%	50 ml
Agua	750 ml

# IX. BIBLIOGRAFÍA

- Abbas, H. K. y Vesonder, R. F. (1993) Isolation and purification of AAL-toxin from *Alternaria alternata* grown on rice. *Toxicon* **31**: 355-358.
- Abbas, H. K., Paul, P. N., Boyette, C. D., Duke, S. O. y Vesonder, R. F. (1992) Physiological and ultrastructural effects of fumonisin on jimsonweed leaves. *Canadian Journal of Botany* **70**: 1824-1833.
- Abbas, H. K., Tanaka, T. y Shier, W. T. (1995) Biological activities of synthetic analogues of *Alternaria alternata* toxin (AAL-toxin) and fumonisin in plant and mammalian cell cultures. *Phytochemistry* **40**: 1681-1689.
- Abbas, H. K., Tanaka, T., Duke, S. O., Porter, J. K., Wray, E. M., Hodges, L., Sessions, A. E., Wang, E., Merrill, A. H. Jr. y Riley, R. T. (1994) Fumonisin- and AAL-toxin-induced disruption of sphingolipid metabolism with accumulation of free sphingoid bases. *Plant Physiology* **106**: 1085-1093.
- Abbas, H. K., Cartwright, R. D., Shier, W. T., Abouzieed, M. M., Bird, C. B., Rice, L. G., Ross, P. F., Sciombato, G. L. y Meredith, F. I. (1998) Natural occurrence of fumonisins in rice with *Fusarium* sheath rot disease. *Plant Disease* **82**: 22-25.
- Abbas, H. K., Mirocha, C. J., Meronuck, R. A., Pokorny, J. D., Gould, S. L. y Kommedahl, T. (1988) Mycotoxins and *Fusarium* species associated with infected ears of corn in Minnesota. *Applied Environment Microbiology* **54**: 1930-1933.
- Agrios, N. G. 1988. Plant pathology. 3 edición. Ed. Academic, N. Y., E. U. A.
- Alfano, J. R. y Collmer, A. (1996) Bacterial pathogens in plants: Life up against the wall. *The Plant Cell* **8**: 1683-1698.
- Appert, Ch., Logemann, E., Hahlbrock, K., Schmid, J. y Amrhein, N. (1994) Structural and catalytic properties of the four phenylalanine ammonia-lyase isoenzymes from parsley (*Petroselinum crispum* Nym.). *European Journal of Biochemistry* **225**: 491-499.
- Asai, T., Stone, J. M., Heard, J. E., Kovtun, Y., Yorgey, P., Sheen, J. y Ausubel, F. M. (2000) Fumonisin B1-induced cell death in *Arabidopsis* protoplasts requires jasmonate-, ethylene-, and salicylate-dependent signaling pathways. *The Plant Cell* **12**: 1823-1835.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. y Struhl, K. 1992. Short Protocols in Molecular Biology. 2a edición. Ed. Green Publishing Associates and John Wiley and Sons. N. Y., E. U. A.
- Bacon, C. W. y Hinton, D. M. 1996. Fusaric acid and pathogenic interactions of corn and non-corn isolates of *Fusarium moniliforme*, a nonobligate pathogen of corn. En: Fumonisins in food (Editores Jackson, L. S., DeVries, J. W. y Bullerman, L. B.). Ed. Plenum Press. N. Y., E. U. A. 175-192.
- Beerhues, L. y Kombrink, E. (1994) Primary structure and expression of mRNAs encoding basic chitinase and 1,3- $\beta$ -glucanase in potato. *Plant Molecular Biology* **24**: 353-367.

- Beffa, R. y Meins, F. Jr. (1996) Pathogenesis-related functions of plant beta-1,3-glucanases investigated by antisense transformation. *Gene* **179**: 97-103.
- Benhamou, N., Joosten, M. H. A. J. y De Wit, P. J. G. M. (1990) Subcellular localization of chitinase and of its potential substrate in tomato root tissues infected by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *Plant Physiology* **92**: 1108-1120.
- Bewley, J. D. y Black, M. 1995. Seeds physiology of development and germination. 2a edición. Ed. Plenum N. Y., E. U. A.
- Boller, T. (1995) Chemoperception of microbial signals in plant cells. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **46**: 189-214.
- Bolwell, G. P. y Wojtaszek, P. (1997) Mechanisms for the generation of reactive oxygen species in plant defence – a broad perspective. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **51**: 347-366.
- Bressani, R. (1990) Chemistry, technology and nutritive value of maize tortillas. *Food Rev. Int.* **6**: 225-264.
- Bullerman, L. B. 1996. Ocurrance of *Fusarium* and fumonisin on food grains and in foods. En: Fumonisin in food (Editores Jackson, L. S., DeVries, J. W. y Bullerman, L. B.). Ed. Plenum Press. N. Y., E. U. A. 27-38.
- Casacuberta, J. M., Puigdomènech, P. y San Segundo, B. (1991) A gene coding for a basic pathogenesis-related (PR-like) protein from *Zea mays*. Molecular cloning and induction by fungus (*Fusarium moniliforme*) in germinating maize seeds. *Plant Molecular Biology* **16**: 527-536.
- Cassab, G. I. (1998) Plant cell wall proteins. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **49**: 281-309.
- Ciacci-Zanella, J. R., Merrill, A. H. Jr., Wang, E. y Jones, C. (1998) Characterization of cell cycle arrest by fumonisin B1 in CV-1 cells. *Food and Chemical Toxicology* **36**: 791-804.
- Cohen-Kupiec, R. y Chet, I. (1998) The molecular biology of chitin digestion. *Current Opinion in Biotechnology* **9**: 270-277.
- Collinge, D. B., Kragh, K. M., Mikkelsen, J. D., Nielsen, K. K., Rasmussen, U. y Vad, K. (1993) Plant chitinases. *The Plant Journal* **3**: 31-40.
- Copeland, L. O. y McDonald, M. B. 1995. Seed science and technology. 3a edición. Ed. Chapman & Hall, N. Y. E. U. A. 409 p.
- Danhash, N., Wagemakers, C. A. M., van Kan, J. A. L. y de Wit, P. J. G. M. (1993) Molecular characterization of four chitinase cDNAs obtained from *Cladosporium fulvum*-infected tomato. *Plant Molecular Biology* **22**: 1017-1029.
- Dat, J., Vandenabeele, S., Vranová, E., Van Montagu, M., Inzé, D. y Van Breusegem, F. (2000) Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cellular and Molecular Life Sciences* **57**: 779-795.
- Deacon, J. W. 1988. Introducción a la micología moderna. Edit. Linusa, México. 350 p.
- Desai, B. B., Kotecha, P. M. y Salunkhe, D. K. 1997. Seeds handbook. Biology, production, processing, and storage. Ed. Marcel Dekker, Inc. N. Y., E. U. A.
- Desjardins, A. E. y Plattner, R. D. (2000) Fumonisin B1-nonproducing strains of *Fusarium verticilloides* cause maize (*Zea mays*) ear infection and ear rot. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **48**: 5773-5780.
- Desjardins, A. E., Plattner, R. D., Nelsen, T. C. y Leslie, J. F. (1995) Genetic analysis of fumonisin production and virulence of *Giberella fujikuroi* mating population A (*Fusarium moniliforme*) on maize (*Zea mays*) seedling. *Applied and Environmental Microbiology* **61**: 79-86.

- Desjardins, A. E., Plattner, R. D. y Nelson, P. E. (1994) Fumonisin production and other traits of *Fusarium moniliforme* strains from maize in northeast of Mexico. *Applied and Environmental Microbiology* **60**: 1695-1697.
- Diallinas, G., y Kanellis, A. K. (1994) A phenylalanine ammonia-lyase gene from melon fruit: cDNA cloning, sequence and expression in response to development and wounding. *Plant Molecular Biology* **26**: 473-479.
- Dixon, R. A. y Lamb, C. J. (1990) Molecular communication in interactions between plants and microbial pathogens. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **41**: 339-367.
- Doehlert, D. C., Knutson, C. A. y Vesonder, R. F. (1994) Phytotoxic effects of fumonisin B1 on maize seedling growth. *Mycopathologia* **127**: 117-121.
- Domingo, C., Conejero, V. y Vera, P. (1994) Genes encoding acidic and basic class III  $\beta$ -1,3-glucanases are expressed in tomato plants upon viroid infection. *Plant Molecular Biology* **24**: 725-732.
- Dugyala, R. R., Sharma, R. P., Tsunoda, M. y Riley, R. T. (1998) Tumor necrosis factor-alpha as a contributor in fumonisin B1 toxicity. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **285**: 317-324.
- Ebel, J. (1998) Oligoglucoside elicitor-mediated activation of plant defense. *BioEssays* **20**: 569-576.
- Farrell, R. E. Jr. 1993. RNA methodologies, a laboratory guide for isolation and characterization. Ed. Academic, San Diego, E. U. A.
- Feldman, L. 1994. The maize root. En: The maize handbook (Editores Freeling, M. y Walbot, V.). Ed. Springer-Verlag, N. Y., E. U. A. 29-37.
- Freeling, M. y Lane, B. 1994. The maize leaf. En: The maize handbook. (Editores Freeling, M. y Walbot, V.). Ed. Springer-Verlag, N. Y., E. U. A. 17-28.
- García-Muñiz, N., Martínez-Izquierdo, J. A. y Puigdomènech, P. (1998) Induction of mRNA accumulation corresponding to a gene encoding a cell wall hydroxyproline-rich glycoprotein by fungal elicitors. *Plant Molecular Biology* **38**: 623-632.
- Guan, L., Polidoros, A. N. y Scandalios, J. G. (1996) Isolation, characterization and expression of the maize Cat2 catalase gen. *Plant Molecular Biology* **30**: 913-924.
- Guo, Y., Delseny, M. y Puigdomènech, P. (1994) mRNA accumulation and promoter activity of the gene coding for a hydroxyproline-rich glycoprotein in *Oriza sativa*. *Plant Molecular Biology* **25**: 159-165.
- Gutiérrez, N. N. A. 1999. Efecto de la fumonisina B1 sobre la ATPasa de H<sup>-</sup> de la membrana plasmática de embriones de maíz. Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas, Facultad de Química, UNAM.
- Hahlbrock, K. y Grisebach, H. 1975. Biosynthesis of flavonoids. En: The Flavonoids, parte 2. (Editores Harborne, J. B., Mabry, T. J. y Mabry, H.). Ed. Academic, N. Y., E. U. A. 866-915.
- Hammerschmidt, R. (1999) Phytoalexins: What have we learned after 60 years?. *Annual Review Phytopathology* **37**: 285-306.
- Hammond-Kosack, K. E. y Jones, J. D. G. (1996) Resistance gene-dependent plant defense responses. *The Plant Cell* **8**: 1773-1791.
- Hrnova, M., Garrett, T. P. J. y Fincher, G. B. (1995) Subsite affinities and disposition of catalytic amino acids in the substrate-binding region of barley 1,3- $\beta$ -glucanases. *The Journal of Biological Chemistry* **270**: 14556-14563.

- Huang, C., Dickman, M., Henderson, G. y Jones, C. (1995) Repression of protein kinase C and stimulation of cyclic AMP response elements by fumonisin, a fungal encoded toxin which is a carcinogen. *Cancer Research* **55**: 1655-1659.
- Huynh, Q. K., Hironaka, C. M., Levine, E. B., Smith, Ch. E., Borgmeyer, J. R. y Shah, D. M. (1992) Antifungal proteins from plants. *The Journal of Biological Chemistry* **267**: 6635-6640.
- Jackson, A. O. y Taylor, C. B. (1996) Plant-microbe interactions: Life and death at the interface. *The Plant Cell* **8**: 1651-1668.
- Jonak, C., Ligterink, W. y Hirt, H. (1999) MAP kinases in plant signal transduction. *Cellular and Molecular Life Science* **55**: 204-213.
- Josè-Estanyol, M. y Puigdomènech, P. (1998) Developmental and hormonal regulation of genes coding for proline-rich proteins in female inflorescences and kernels of maize. *Plant Physiology* **116**: 485-494.
- Kernode, A. R. 1995. Regulatory mechanisms in the transition from seed development to germination: Interactions between the embryo and the seed environment. En: Seed development and germination (Editores Kiegel, J. y Galili, G.). Ed. Marcel Dekker, N. Y., E. U. A.
- Kitajima, S. y Sato, F. (1999) Plant pathogenesis-related proteins: molecular mechanism of gene expression and protein function. *The Journal of Biochemistry* **125**: 1-8.
- Kiesselbach, T. A. 1999. The structure and Reproduction of corn. Ed. Cold Spring Harbor laboratory. N. Y., E. U. A.
- Klessig, D. F., Kumar, D., Navarre, D. A., Zhou, J. M., Shah, J., Durner, J., Zhang, S., Wendehenne, D., Kachroo, P., Trifa, Y., Silva, H., Pontier, D., Lam, E. y Noad, R. 2000. Salicylic acid- and Nitric oxide-mediated signal transduction in plant disease resistance. En: Biology of plant-microbe interactions (Editores de Wit, P. J. G. M., Bisseling, T. y Stiekema, W.). Ed. International Society for Molecular plant-Microbe Interactions. St. Paul, Minesota E.U. A.
- Koga, J., Yamauchi, T., Shimura, M., Ogawa, N., Oshima, K., Umemura, K., Kikuchi, M. y Ogasawara, N. (1998) Cerebrosides A and C, sphingolipid elicitors of hypersensitive cell death and phytoalexin accumulation in rice plants. *The Journal of Biological Chemistry* **273**: 31985-31991.
- Lamprecht, S. C., Marasas W. F. O., Alberts, J. F. M. E., Gelderblom, W. C. A., Shepard, G. S., Thiel, P. G. y Calitz, F. J. (1994) Phytotoxicity of fumonisins and TA-toxin to corn and tomato. *Phytopathology* **84**: 383-391.
- Leah, R., Tommerup, H., Svendsen, Ib. y Mundy, J. (1991) Biochemical and molecular characterization of three barley seed proteins with antifungal properties. *The Journal of Biological Chemistry* **266**: 1564-1573.
- Lemmer, E. R., de la Motte H. P., Omori, N., Shephard, E. G., Gelderblom, W. C., Cruse, J. P., Bernard, R. A., Marasas, W. F., Kirsch, R. E. y Thorgerisson, S. S. (1999) Histopathology and gene expression changes in rat liver during feeding of fumonisin B1, a carcinogenic mycotoxin produced by *Fusarium moniliforme*. *Carcinogenesis* **20**: 817-824.
- Leslie, J. F. 1996. Introductory biology of *Fusarium moniliforme*. En: Fumonisins in food (Editores Jackson, L. S., DeVries, J. W. y Bullerman, L. B.). Ed. Plenum Press. N. Y., E. U. A. 153-164.

- Liang, X., Dron, M., Cramer, C. L., Dixon, R. A. y Lamb, C. J. (1989) Differential regulation of phenylalanine ammonia-lyase genes during plant development and by environmental cues. *The Journal of Biological Chemistry* **264**: 14486-14492.
- Lynch, D. V. (2000) Enzymes of Sphingolipid metabolism in plants. *Methods in Enzymology* **311**: 130-149.
- Lois, R., Dietrich, A., Hahlbrock, K. y Schulz, W. (1989) A phenylalanine ammonia-lyase gene from parsley: structure, regulation and identification of elicitor and light responsive cis-acting elements. *The EMBO Journal* **8**: 1641-1648.
- Marasas, W. F. O. 1996. Fumonisin: History, world-wide occurrence and impact. En: Fumonisin in food (Editores Jackson, L. S., DeVries, J. W. y Bullerman, L. B.). Ed. Plenum Press. N. Y., E. U. A. 1-18 p.
- McDowell, J. M. y Dangel, J. L. (2000) Signal transduction in the plant immune response. *Trends in Biochemical Sciences* **25**: 79-82.
- McNeil, M., Darvil, A. G., Fry, S. C. y Albersheim, P. (1984) Structure and function of the primary cell walls of plants. *Annual Review of Biochemistry* **53**: 625-663.
- Merrill, A. H., Schmelz, E.-M., Dillehay, D. L., Spiegel, S., Shayman, J. A., Schroeder, J. J., Riley, R. T., Voss, K. A. y Wang, E. (1997) Sphingolipids -the enigmatic lipid class: biochemistry, physiology, and pathophysiology. *Toxicology and Applied Pharmacology* **142**: 208-225.
- Meier, B. M., Shaw, N. y Slusarenko, A. J. (1993) Spatial and temporal accumulation of defense gene transcripts in bean (*Phaseolus vulgaris*) leaves in relation to bacteria-induced hypersensitive cell death. *Molecular Plant-Microbe Interaction* **6**: 453-466.
- Mirocha, C. J., Gilchrist, D. G., Martensen, A., Abbas, H. K., Plasencia, J. y Vesonder, R. F. (1990) of toxins with equivalent host specific activity, fumonisin and AAL, by nonpathogens of tomato. *Phytopathology* **80**: 1004-1008.
- Monnet-Tschudi, F., Zurich, M. G., Sorg, O., Matthieu, J. M., Honegger, P. y Schüter, B. (1999) The naturally occurring food mycotoxin fumonisin B1 impairs myelin formation in aggregating brain cell culture. *Neurotoxicology* **20**: 41-48.
- Murphy, P. A., Hendrich, S., Hopmans, E. C., Hauck, C. C., Lu, Z., Buseman, G. y Munkvold, G. 1996. Effect of processing on fumonisin content of corn. En: Fumonisin in food (Editores Jackson, L. S., DeVries, J. W. y Bullerman, L. B.). Ed. Plenum Press. N. Y., E. U. A. 323-334.
- Nair, M. G. (1998) Fumonisin and human health. *Annals of Tropical Paediatrics* **18**: S47-S52.
- Neuffer, M. G., Coe, E. H. y Wessler, S. R. 1997. Mutants of maize. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory. N. Y., E. U. A.
- Nelson, P. E., Toussoun, T. A. y Marasas, W. F. O. 1983. *Fusarium* species, an illustrated manual for identification. Pennsylvania University, University Pak and London.
- Niebel, A., Heungens, K., Barthels, N., Inzé, D., Van Montagu, M. y Gheysen, G. (1995) Characterization of a pathogen-induced potato catalase and its systemic expression upon nematode and bacterial infection. *Molecular Plant-Microbe Interaction* **8**: 371-378.
- Orr, J. D., Edwards, R. y Dixon, R. A. (1993) Stress responses in alfalfa (*Medicago sativa* L.) XIV. Changes in the levels of phenylpropanoid pathway intermediates in relation to regulation of L-phenylalanine ammonia-lyase in elicitor-treated cell-suspension cultures. *Plant Physiology* **101**: 847-856.

- Osakabe, Y., Osakabe, K., Kawai, S., Katayama, Y. y Morohoshi, N. (1995) Characterization of the structure and determination of mRNA levels of the phenylalanine ammonia-lyase gene family from *Populus kitakamiensis*. *Plant Molecular Biology* **28**: 1133-1141.
- Payne, G., Ward, E., Gaffney, T., Goy, P. A., Moyer, M., Harper, A., Meins, F. Jr. y Ryals, J. (1990) Evidence for a third structural class of  $\beta$ -1,3-glucanase in tobacco. *Plant Molecular Biology* **15**: 797-808.
- Pascale, M., Visconti, A., Prończ, K. M., Wiśniewska, H. y Chelkowski, J. (1997) Accumulation of fumonisins in maize hybrids inoculated under field conditions with *Fusarium moniliforme* Sheldon. *Journal Science Food of Agriculture* **74**: 1-6.
- Pellegrini, L., Rohfritsch, O., Fritig, B. y Legrand, M. (1994) Phenylalanine ammonia-lyase in tobacco. *Plant Physiology* **106**: 877-886.
- Piffanelli, P., Devoto, A. y Schulze-Lefert, P. (1999) Defence signalling pathways in cereals. *Current Opinion in Plant Biology* **2**: 295-300.
- Plattner, R. D., Weisleder, D. y Poling, S. M. 1996. Analytical determination of fumonisins and other metabolites produced by *Fusarium moniliforme* and related species on corn. En: Fumonisin in food (Editores Jackson, L. S., DeVries, J. W. y Bullerman, L. B.). Ed. Plenum Press. N. Y., E. U. A. 57-64.
- Poethig, R. S. 1994. The maize shoot. En The maize handbook (Editores Freeling, M. y Walbot, V.). Ed. Springer-Verlag. N. Y., E. U. A. 11-16.
- Polidoros, A. N. y Scandalios, J. G. (1997) Response of the maize catalases to light. *Free Radical Biology and Medicine* **23**: 497-504.
- Raz, R., José, M., Moya, A., Martínez-Izquierdo, J. A. y Puigdomènech, P. (1992) Different mechanisms generating sequence variability are revealed in distinct regions of the hydroxyproline-rich glycoprotein gene from maize and related species. *Molecular and General Genetics* **233**: 252-259.
- Reyes C. P. 1990. El maíz y su cultivo. Ed. AGT Editor, S. A. México.
- Rösler, J., Krekel, F., Amrhein, N. y Schmid, J. (1997) Maize phenylalanine ammonia-lyase has a tyrosine ammonia-lyase activity. *Plant Physiology* **113**: 175-179.
- Ruzsa, S. M., Mylona, P. y Scandalios, J. G. (1999) Differential response of antioxidant genes in maize leaves exposed to ozone. *Redox Rep* **4**: 95-103.
- Ryals, J. A., Neuenschwander, U. H., Willits, A. M., Steiner, H-Y y Hunt, M. D. (1996) Systemic acquired Resistance. *The Plant Cell* **8**: 1809-1819.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T. 1989. Molecular cloning, a laboratory manual. 2a edición, Ed. Cold Spring Harbor Laboratory. N. Y., E. U. A.
- Sela-Buurlage, M. B., Ponstein, A. S., Bres-Vloemans, S. A., Melchers, L. S., van den Elzen, P. J. M. y Cornelissen, B. J. C. (1993) Only specific tobacco (*Nicotiana tabacum*) chitinases and  $\beta$ -1,3-glucanases exhibit antifungal activity. *Plant Physiology* **101**: 857-863.
- Shepard, G. S., Thiel, P. G., Stockenström, S. y Sydenham, E. W. (1996) Worldwide survey of fumonisin contamination of corn and corn-based products. *Journal of AOAC International* **79**: 671-687.
- Sheridan, W. F. y Clark, J. K. 1994. Fertilization and Embriogeny in maize. En: The maize handbook. Ed. Springer-Verlaug N. Y., E. U. A. 3-10.
- Shurtleff, M. C. 1980. Compendium of Corn Diseases. Ed. APS. E. U. A.
- Stiefel, V., Ruiz-Avila, L., Raz, R., Vallés, M., Gómez, J., Pagés, M., Martínez-Izquierdo, J. A., Ludevid, M. D., Langdale, J. A., Nelson, T. y Puigdomènech, P. (1990) Expression of a

- maize cell wall hydroxyproline-rich glycoprotein gene in early leaf and root vascular differentiation. *The Plant Cell* **2**: 785-793.
- Stone, J. M., Heard, J. E., Asai, T. y Ausubel, F. M. (2000) Simulation of fungal-mediated cell death by fumonisin B1 and selection of fumonisin B1-resistant (fbr) *Arabidopsis* mutants. *The Plant Cell* **12**:1811-1822.
- Suzuki, M., Ario, T., Hattori, T., Nakamura, K. y Asahi, T. (1994) Isolation and characterization of two tightly linked catalase genes from castor bean that are differentially regulated. *Plant Molecular Biology* **25**: 507-516.
- Sydenham, E. W., Thiel, P. G., Marasas, W. F. O., Shepard, G. S., Van Schalkwyk, D. J. y Koch, R. (1990) Natural occurrence of some *Fusarium* mycotoxins in corn from low and high esophageal cancer prevalence areas of the Transkei, Southern Africa. *Journal Agricultural Food Chemistry* **38**: 1900-1903.
- Takakura, Y., Ito, T., Saito, H., Inoue, T., Komari, T. y Kuwata, S. (2000) Flower-predominant expression of a gene encoding a novel class I chitinase in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Molecular Biology* **42**: 883-897.
- Tiré, C., Rycke, R. D., Loose, M. D., Inzé, D., Van Montagu, M. y Engler, G. (1994) Extensin gene expression is induced by mechanical stimuli leading to local cell wall strengthening in *Nicotiana plumbaginifolia*. *Planta* **195**: 175-181.
- Tolleson, W. H., Dooley, K. L., Sheldon, W. G., Thurman, J. D., Bucci, T. J. y Haward, P. C. 1996. The mycotoxin fumonisin induces apoptosis in cultured human cells and in livers and kidneys of rats. (Editores Jackson, L. S., DeVries, J. W. and Bullerman, L. B.) En: Fumonisin in food. Editorial Plenum Press. N. Y., E. U. A. 237-250.
- Van Asch, M. A. J., Rijkenberg, F. H. J. y Coutinho, T. A. (1992) Phytotoxicity fumonisin B1, moniliformin and the toxin T2 to corn callus cultures. *Plant Physiology* **106**: 1085-1093.
- Van Loon, L. C. y Van Strien, E. A. (1999) The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **55**: 85-97.
- Visconti, A. 1996. Fumonisin in maize genotypes grown in various geographic areas. En: Fumonisin in food (Editores Jackson, L. S., DeVries, J. W. y Bullerman, L. B.). Ed. Plenum Press. N. Y., E. U. A. 193-204.
- Vögeli-Lange, R., Fründt, C., Hart, C. M., Nagy, F. y Meins, F. Jr. (1994) Developmental, hormonal, and pathogenesis-related regulation of the tobacco class I  $\beta$ -1,3-glucanase B promoter. *Plant Molecular Biology* **25**: 299-311.
- Walbot, V. 1994. Over-view of key steps in aleurone development. En: The maize handbook (Editores Freeling, M. y Walbot, V.). Ed. Springer, N. Y., E. U. A. 78-80.
- Wang, E., Norred, W. P., Bacon, C. W., Riley, R. T. y Merrill, A. H. Jr. (1991) Inhibition of Sphingolipid biosynthesis by fumonisin. Implications for diseases associated with *Fusarium moniliforme*. *The Journal of Biological Chemistry* **266**: 14486-14490.
- Wang, H., Li, J., Bostock, R. M. y Gilchrist, D. G. (1996) Apoptosis: a functional paradigm for programmed plant cell death induced by a host-selective phytotoxin and invoked during development. *The Plant Cell* **8**: 375-391.
- Wanner, L. A., Li, G., Ware, D., Somssich, I. E. y Davis, K. R. (1995) The phenylalanine ammonia-lyase gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* **27**: 327-338.
- Wattenberg, E. V., Badria, F. A. y Shier, W. T. (1996) Activation of mitogen-activated protein kinase by the carcinogenic mycotoxin fumonisin B1. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **277**: 622-627.

- Wilkes, J. G., Churchwell, M. I., Billedeau, S. M., Vollmer, D. L., Volmer, D. A., Thompson, H. C. Jr. y Lay, J. O. Jr. (1996). Determination of underivatized fumonisin B1 and related compounds by HPLC. En: *Fumonisin in food* (Editores Jackson, L. S., DeVries, J. W. and Bullerman, L. B.). Ed. Plenum Press. N. Y. E. U. A. 93-104.
- Williamson, J. D. y Scandalios, J. G. (1993) Response of the maize catalases and superoxide dismutases to cercosporin-containing fungal extracts: the pattern of catalase response in scutella is stage specific. *Physiologia Plantarum* **88**: 159-166.
- Williamson, V. M. y Hussey, R. S. (1996) Nematode pathogenesis and resistance in plants. *The Plant Cell* **8**: 1735-1745.
- Wojtaszek, P. (1997) Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. *Biochemical Journal* **322**: 681-692.
- Wu, S., Kriz, A. L. y Widholm, J. M. (1994a) Molecular analysis of two cDNA clones encoding acidic class I chitinase in maize. *Plant Physiology* **105**: 1097-1105.
- Wu, S., Kriz, A. L. y Widholm, J. M. (1994b) Nucleotide sequence of a maize cDNA for a class II, acidic  $\beta$ -1,3-glucanase. *Plant Physiology* **106**: 1709-1710.
- Wycoff, K. L., Powel, P. A., Gonzáles, R. A., Corbin, D. R., Lamb, C. y Dixon, R. A. (1995) Stress activation of a bean hydroxyproline-rich glycoprotein promoter is superimposed on a pattern of tissue-specific developmental expression. *Plant Physiology* **109**: 41-52.
- Ye, Z.-H. y Varner, J. E. (1991) Tissue-specific expression of cell wall proteins in developing soybean tissues. *The Plant Cell* **3**: 23-37.
- Yoo, H. S., Norred, W. P., Wang, E., Merrill, A. H. Jr. y Riley, R. T. (1992) Fumonisin inhibition of de novo sphingolipid biosynthesis and cytotoxicity are correlated in LLC-PK1 cells. *Toxicology and Applied Pharmacology* **114**: 9-15.
- Yoo, H. S., Norred, W. P., Showker, J. y Riley, R. T. (1996) Elevated sphingoid bases and complex sphingolipid depletion as contributing factors in fumonisin-induced cytotoxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology* **138**: 211-218.
- Yu, D., Xie, Z., Chen, C., Fan, B. y Chen, Z. (1999) Expression of tobacco class II catalase gene activates the endogenous homologous gene and is associated with disease resistance in transgenic potato plants. *Plant Molecular Biology* **39**: 477-488.
- Zhang, Y., Dickman, M. B. y Jones, C. (1999) The mycotoxin fumonisins B1 transcriptionally activates the p21 promoter through a *cis*-acting element containing two Sp1 binding sites. *The Journal of Biological Chemistry* **274**: 12367-12371.
- Zhu, Q., Dabi, T., Beeche, A., Yamamoto, R., Lawton, M. A. y Lamb, Ch. (1995) Cloning and properties of a rice gene encoding phenylalanine ammonia-lyase. *Plant Molecular Biology* **29**: 535-550.
- Zuber, M. S. y Darrah, L. L. 1987. Breeding, genetics, and seed corn production. En: *Corn: chemistry and technology* (Editores Watson, S. A. y Rainstad, P. E.). Ed. American Association of Cereal Chemist, Inc. E. U. A.