



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

FACULTAD DE QUÍMICA

“EFECTO DE *Fusarium verticillioides* SOBRE LA  
EXPRESIÓN DE LOS TRANSPORTADORES DE  
CARBOHIDRATOS EN LA GERMINACIÓN DE  
EMBRIONES DE MAÍZ”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACEUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A :

FERNANDO GUZMÁN CHÁVEZ



MÉXICO, D. F.

2010.



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.

## **Jurado asignado**

Presidente:	Dra. Marina Gavilanes Ruíz
Vocal:	Dr. Jesús Fernando Montiel Aguirre
Secretario:	Dra. Sobeida Sánchez Nieto
1er. Suplente	Dra. Marta Alicia Menjívar Iraheta
2do. Suplente:	Dra. Vanessa Rebeca Maya Ampudia

El presente trabajo se realizó en el laboratorio 114, del Departamento de Bioquímica, Edificio E, Facultad de Química, UNAM.

---

Dra. Sobeida Sánchez Nieto  
**Asesor**

---

Fernando Guzmán Chávez  
**Sustentante**



***“Dejar este mundo mejor de cómo lo encontramos”***

***Baden Powell***



## AGRADECIMIENTOS

Este fue realizado bajo la dirección de la Dra. Sobeida Sánchez Nieto, en el Laboratorio 114 del Departamento de Bioquímica, del Conjunto E de la Facultad de Química de la UNAM. Así mismo se realizó con los apoyos de:

- PAPIIT IN203708, DGAPA, UNAM
- CONACYT 90021
- Beca para la realización de Tesis de Licenciatura, otorgada por el proyecto PAPIIT IN203708 DGAPA, UNAM



Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y a la Facultad de Química por todas las experiencias vividas, por todas las oportunidades otorgadas y por todos los conocimientos proporcionados a lo largo de estos años, ya que gracias a ellas pude formarme como profesionalista, como ser humano y ser lo que soy hoy.

Gracias Facultad de Química... te estaré siempre agradecido.

Se agradece a los sinodales:

Dra. Sobeida Sánchez Nieto

Dra. Marina Gavilanes Ruíz

Dr. Jesús Fernando Montiel Aguirre

Por sus valiosas críticas y comentarios en el presente trabajo.

Al Dr. Javier Plasencia por proporcionarnos la cepa del hongo *Fusarium verticillioides* para el desarrollo del presente proyecto.

También agradezco a la M. en C. Diana Sánchez Rangel por la asesoría técnica en el manejo e inoculación de los embriones con el hongo y a la M. en C. Beatriz King Díaz, por su asesoría técnica en el uso del oxímetro y en la determinación de la capacidad respiratoria de los embriones.



Agradezco a mis padres: Reyna Chávez Hernández y José Guzmán Posadas por todo su amor, comprensión y cariño que siempre me han dado, también agradezco enormemente a mi tío Andrés Chávez Hernández, que como un papá siempre me ha dado su amor y ha estado conmigo apoyándome en todo momento. Les estoy eternamente agradecido por todo lo que me han dado, pues sé que sin ustedes difícilmente hubiera logrado esta meta. Gracias por guiarme y formarme como hombre y ser humano.

También les agradezco a mis hermanos Luis y Miriam por su apoyo y cariño, y sobre todos por su serenidad para comprenderme.

Dedico también esta tesis a mis tías Benita (†) y María Chávez (†) por regalarme una bonita infancia.

A mi Amigo José Antonio por toda su comprensión, ayuda y amistad a lo largo de estos años, en ti conocí a un gran amigo y una gran persona.

A mis compañeros y amigos del laboratorio 114 a Pau y a Viry Zu por su cariño, su ayuda y por hacer muy grato el laboratorio, a Sam, Viry Luna y Viry Cal por su compañía y por esas gratas pláticas. También le agradezco a Silvia, a Mariel y a Juanma su ayuda.

A mi Asesora Dra. Sobeida por su cariño, su invaluable ayuda y por todo su apoyo en la realización de este proyecto, pues gracias a usted he aprendido un mundo de cosas.

A mis mejores amigas Rouss y Diana, gracias por estar siempre conmigo, por su cariño y por todos estos años de buenos momentos.

También le agradezco y dedico esta tesis a toda mi familia.



## DEDICATORIAS

Dedico ésta tesis con todo cariño a:

*Mis padres y mi tío*

*Gracias*





## ÍNDICE GENERAL

<b>ABREVIATURAS.....</b>	<b>13</b>
<b>I. RESUMEN.....</b>	<b>15</b>
<b>II.INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>17</b>
II.1 Características generales de los hongos.....	17
II.2 Taxonomía y generalidades del género <i>Fusarium</i> .....	17
II.3 <i>Fusarium verticillioides</i> .....	19
II.3.1 Características microscópicas.....	19
II.3.2 Características macroscópicas.....	20
II.3.3 Reproducción asexual.....	20
II.3.4 Reproducción sexual.....	20
II.3.5 Micotoxinas.....	21
II.3.6 Fumonisina B1 y toxicidad.....	25
II.3.7 Importancia económica de las micotoxinas.....	25
II.4 Maíz.....	27
II.4.1 Características generales de la planta de maíz .....	27
II.4.1.1 Estructura y composición de la semilla de maíz.....	29
II.4.2 Enfermedades asociadas al maíz.....	31
II.4.2.1 Ciclo de vida de <i>Fusarium verticillioides</i> en maíz.....	34
II.5 Germinación.....	38
II.5.1 Movilización de reservas nutrientes durante la germinación.....	41
II.6 Transportadores de carbohidratos. ....	44
II.6.1 Generalidades.....	44
II.6.2 Transportadores de sacarosa.....	45
II.6.2.1 Transporte de sacarosa a distancia: transporte simplástico y apoplástico.....	45
II.6.2.2 Tipos de transportadores de sacarosa.....	48
II.6.2.2.1 Transportadores de la membrana plasmática: Simportadores H <sup>+</sup> /sacarosa.....	48
II.6.2.2.2 Transportadores de flujo en la membrana plasmática... 53	
II.6.3 Transportadores de monosacáridos. ....	53
II.6.3.1 Clasificación de los transportadores de monosacáridos MST(-like) .....	54
II.6.4 Transportadores de carbohidratos en las interacciones planta-patógeno.54	
<b>III.JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>56</b>
<b>IV. HIPÓTESIS.....</b>	<b>58</b>
<b>V. OBJETIVO GENERAL.....</b>	<b>59</b>
<b>VI. OBJETIVOS PARTICULARES.....</b>	<b>59</b>



<b>VII. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>60</b>
VII.1 Esquema general de trabajo.....	60
VII.2 Preparación y calibración del inóculo de <i>Fusarium verticillioides</i> .....	61
VII.3 Germinación de los embriones de maíz en presencia o ausencia de patógeno....	62
VII.4 Porcentaje de germinación.....	62
VII.5 Ensayo de respiración (oximetría) .....	63
VII.6 Extracción y cuantificación de carbohidratos solubles.....	64
VII.7 Detección <i>in situ</i> de la glucosa en los embriones de maíz.....	67
VII.8 Extracción de RNA, reacción de RT-PCR y densitometría.....	68
<b>VIII. RESULTADOS.....</b>	<b>73</b>
VIII.1 Infección de embriones de maíz por <i>Fusarium verticillioides</i> . ....	73
VIII.2 Porcentaje de germinación.....	74
VIII.3 Ensayo de respiración (oximetría) .....	76
VIII.4 Cuantificación de carbohidratos solubles: glucosa, fructosa y sacarosa.....	78
VIII.5 Efecto de <i>Fusarium verticillioides</i> sobre la expresión del transportador putativo de hexosas ZmHT y de sacarosa ZmSUT1.....	82
VIII.6 Detección <i>in situ</i> de los niveles de glucosa. ....	86
<b>IX. DISCUSIÓN.....</b>	<b>89</b>
IX.1 Efecto de <i>Fusarium verticillioides</i> en la germinación y respiración de los embriones de maíz. ....	89
IX.2 Alteración de los niveles de carbohidratos por la presencia de <i>Fusarium verticillioides</i> .....	91
IX.3 Efecto de la infección por <i>Fusarium verticillioides</i> en los niveles de los transcritos para el transportador de hexosas y su relación con los contenidos de glucosa.....	92
IX.4 Efecto de la infección por <i>Fusarium verticillioides</i> en los niveles de los transcritos para el transportador de sacarosa y su relación con los contenidos de sacarosa.....	95
<b>X. CONCLUSIONES.....</b>	<b>101</b>
<b>XI. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>102</b>
<b>XII. ANEXOS.....</b>	<b>103</b>
XII.1 Anexo I: <i>Reactivos y medios de cultivo y ensayo</i> .....	103
XII.2 Anexo II: <i>Preparación de material y recomendaciones</i> .....	108
XII.3 Anexo III: <i>Fórmulas y cálculos</i> .....	109
<b>XIII. REFERENCIAS.....</b>	<b>115</b>



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estructuras microscópicas características de <i>Fusarium verticillioides</i> . ....	19
<b>Figura 2.</b> Estructuras químicas de las principales micotoxinas producidas por <i>Fusarium verticillioides</i> . ....	23
<b>Figura 3.</b> Estructura química de Fumonisina B1 (origen biosintético). ....	24
<b>Figura 4.</b> Anatomía general de la planta de maíz ( <i>Zea mays</i> ).....	28
<b>Figura 5.</b> Semilla de maíz y sus diferentes partes. ....	30
<b>Figura 6.</b> Ciclo de infección y enfermedad en el sistema <i>Fusarium verticillioides</i> -maíz....	37
<b>Figura 7.</b> Curva de toma de agua por semilla. ....	41
<b>Figura 8.</b> Vía de movilización de reservas de carbohidratos en el embrión, desde el almidón hasta la sacarosa. ....	42
<b>Figura 9.</b> Transporte a distancia de carbohidratos. ....	47
<b>Figura 10.</b> Familias de transportadores de sacarosa (SUTs). ....	50
<b>Figura 11.</b> Topologías de los transportadores de los tres grupos de la familia SUT.....	52
<b>Figura 12.</b> Esquema general de trabajo realizado. ....	60
<b>Figura 13.</b> Cadena de reacciones involucradas en la técnica enzimática para determinar carbohidratos solubles. ....	64
<b>Figura 14.</b> Reacción de reducción del NBT por protones. ....	67
<b>Figura 15.</b> Embriones de maíz infectados y no infectados por <i>Fusarium verticillioides</i> . ...	73
<b>Figura 16.</b> Curva de germinación de embriones de maíz ( <i>Zea mays</i> ) bajo dos tratamientos diferentes, infectados con <i>Fusarium verticillioides</i> y no infectados (control). ....	75
<b>Figura 17.</b> Comparación del consumo de oxígeno entre los embriones infectados por <i>Fusarium verticillioides</i> y los embriones control, sometidos a diferentes periodos de germinación. ....	77
<b>Figura 18.</b> Contenido de glucosa en embriones de maíz infectados y no infectados por el patógeno. ....	79
<b>Figura 19.</b> Contenido de sacarosa en embriones de maíz infectados y no infectados por el patógeno. ....	80
<b>Figura 20.</b> Contenido de fructosa en embriones de maíz infectados y no infectados por el patógeno. ....	81



<b>Figura 21.</b> Perfil de expresión del transcrito del transportador de hexosas ZmHT, tanto en embriones infectados por <i>Fusarium verticillioides</i> como para los embriones control. ....	83
<b>Figura 22.</b> Perfil de expresión del transcrito del transportador de sacarosa ZmSUT, tanto en embriones infectados por <i>Fusarium verticillioides</i> como para los embriones control. ...	85
<b>Figura 23.</b> Detección <i>in situ</i> de los niveles de glucosa en embriones control. ....	87
<b>Figura 24.</b> Detección <i>in situ</i> de los niveles de glucosa en embriones infectados. ....	88
<b>Figura 25.</b> Comparación de los niveles del transcrito del transportador de hexosas ZmHT y los contenidos de glucosa en embriones control y con patógeno....	94
<b>Figura 26.</b> Comparación de los niveles del transcrito del transportador de sacarosa ZmSUT y los contenidos de sacarosa en embriones control y con patógeno. ....	97
<b>Figura27.</b> Modelo propuesto del consumo de carbohidratos y la expresión de los transportadores de carbohidratos ZmHT y ZmSUT. ....	99
<b>Figura 28.</b> Vista de la Cámara de Neubauer 10X. ....	110
<b>Figura 29.</b> Registro gráfico de respiración de un embrión de maíz. ....	114



---

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Composición química de las principales parte del grano de maíz. ....	31
<b>Tabla 2</b> Principales enfermedades del maíz asociadas a hongos y otras plagas. ....	33
<b>Tabla 3.</b> Mezcla de reacción de RT. ....	71
<b>Tabla 4.</b> Preparación de la mezcla de reacción para la técnica de PCR, tanto para el transportador putativo de hexosas como el de sacarosa. ....	71
<b>Tabla 5.</b> Condiciones empleadas para la realización de la reacción de PCR.....	72
<b>Tabla 6.</b> Oligonucleótidos empleados para la amplificación de transcrito para el transportador putativo de hexosas y de sacarosa en los embriones de maíz. ...	72
<b>Tabla 7.</b> Resumen de los resultados de los niveles de transcritos para el transportador de hexosas y el de sacarosa, así como su relación con los contenidos de glucosa y sacarosa. ....	98



## ABREVIATURAS

<b>ABA</b>	Ácido abscísico	<b>Glu</b>	Glucosa
<b>Abs</b>	Absorbancia	<b>INT</b>	Transportador de Inositol
<b>AG</b>	Ácido giberélico	<b>ITR/MIT</b>	Transportadores de myo-inositol
<b>ATP</b>	Adenosín trifosfato	<b>Km</b>	Constante de Michaelis-Menten
<b>AZT/MSSP</b>	Proteínas sensoras putativas de monosacáridos.	<b>mM</b>	Milimolar
<b>CA</b>	Células acompañantes	<b>MSF</b>	Superfamilia de facilitadores mayores
<b>cDNA</b>	DNA templado	<b>MST</b>	Transportadores de monosacáridos
<b>CIMMYT</b>	Centro Internacional de Mejoramiento del Maíz y el Trigo	<b>NAD<sup>+</sup></b>	Forma oxidada de NADH
<b>CoA</b>	Coenzima A	<b>NADH</b>	Dinucleótido de nicotinamida adenina
<b>DEPC</b>	Dietil pirocarbonato	<b>NBT</b>	Nitroazul de tetrazolio
<b>DNA</b>	Ácido desoxiribonucleico	<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>DTT</b>	Ditiotreitol Ácido etilendiamina	<b>PDA</b>	Agar papa dextrosa
<b>EDTA</b>	tetra acético	<b>PGI</b>	Glucosa 6p isomerasa
<b>ES</b>	Elementos de la savia	<b>pGlcT</b>	Transportadores plásticos de glucosa
<b>EST</b>	Expressed Sequence Tags	<b>PLT</b>	Transportadores de polioles
<b>FAO</b>	Organización de Alimentos y Agricultura (Food and Agriculture Organization)	<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>FB1</b>	Fumonisina B1	<b>RNA<sub>m</sub></b>	RNA mensajero
<b>FD</b>	Factor de dilución	<b>ROS</b>	Especies reactivas de oxígeno
<b>G6P</b>	Deshidrogenasa glucosa-6- fosfato	<b>RT</b>	Transcriptasa reversa
		<b>Sac</b>	Sacarosa



<b>SDS</b>	Dodecil sulfato de sodio
<b>SFP</b>	Sucrose fermenting protein
<b>STP/HXT</b>	Transportadores de hexosas
<b>SUC/SUT</b>	Transportadores de sacarosa
<b>SUT</b>	Transportador de sacarosa
<b>TAG</b>	Triacilgliceroles
<b>TBE</b>	Tris-Borato- EDTA
<b>TMT</b>	Transporte tonoplástico de monosacáridos
<b>UDP-Glc</b>	Uridililtransferasa glucosa -1 -fosfato
<b>VGT</b>	Transportadores vacuolares de glucosa
<b>ZmHT</b>	Transportador putativo de hexosa en maíz
<b>ZmSUT</b>	Transportador de sacarosa en maíz



## I. RESUMEN

Los patógenos fúngicos de las plantas como *Fusarium verticillioides*, causan las mayores pérdidas económicas y afectan la calidad y la seguridad de los alimentos al infectar la materia vegetal. *Fusarium* se asocia a enfermedades en todos los estadios de desarrollo de la planta del maíz, infectando las raíces, los tallos y las semillas, las cuales durante la germinación pueden transmitir al hongo.

La germinación es la suma de eventos que comienzan con la hidratación de la semilla y culminan con la salida de la radícula, que junto con la movilización de reservas de nutrientes son procesos altamente regulados por factores ambientales. Durante el proceso de germinación, los carbohidratos y lípidos almacenados son convertidos de nuevo en sacarosa para su transporte al eje embrionario, movilización debida a los transportadores de hexosas y sacarosa, proteínas de 12 dominios transmembranales.

Diversos factores de tipo ambiental pueden modificar la expresión de los transportadores de carbohidratos, uno de ellos es la presencia de patógenos fúngicos, por lo que en el presente trabajo se determinó y evaluó, usando como modelo experimental embriones de maíz, el efecto del hongo *Fusarium verticillioides* sobre el perfil de expresión de dos transportadores de carbohidratos del maíz, a nivel de RNAm: el transportador putativo de hexosas, ZmHT, y el transportador de sacarosa, ZmSUT; además se estudió el efecto del hongo en el contenido de carbohidratos. Se encontró que después de 24 h de germinación en presencia del patógeno, los embriones presentan crecimiento micelial y un aumento en el número de embriones germinados a partir de las 18 h. La alteración fue atribuida a los factores de patogenicidad del organismo infectante que reblandecen el tejido embrionario, favoreciendo la emergencia de la radícula. Asimismo, se detectó un incremento en la respiración a todos los tiempos de germinación siendo de más del 250% a las 8 h, fenómeno que probablemente se deba a un estímulo del hospedero para montar una respuesta de defensa en el embrión. Es posible que el aumento en la respiración tenga un componente del patógeno mismo. El incremento observado se asoció a una modificación en el uso de las reservas de carbohidratos, ya que los embriones infectados por *Fusarium*





*verticillioides* a las primeras 12 h de germinación presentaron un menor uso de sacarosa, mismo que aumentó en los últimos tiempos de germinación. Lo contrario se observó con la utilización de glucosa, que estuvo en menor concentración al inicio de la germinación, y disminuyó su uso para tener un valor por arriba de los embriones no infectados a las 48 h. Además la glucosa tuvo un patrón de distribución en los embriones control distinto al presentado en los embriones infectados, probablemente debido a una síntesis distinta de sus proteínas transportadoras y/o a un aumento en las invertasas de la pared celular de los embriones.

Interesantemente, al comparar los niveles de carbohidrato con los del transcrito, observamos que el transportador ZmHT adelantó su expresión 6 h y alcanzó su máximo 12 h antes que los embriones sin infectar, tiempo en el que se observó el menor contenido de glucosa. Mientras que para el transportador de sacarosa, ZmSUT su expresión se adelantó 6 h, alcanzando su máximo 18 h antes respecto al control, y un aumento del uso de sacarosa al finalizar las 48 h de germinación. Los ajustes que se llevan a cabo en los niveles de transcritos para ambos transportadores al inicio de la germinación pueden deberse a un mecanismo de defensa del embrión contra el hongo, en un intento por continuar el crecimiento o bien a una respuesta general que altera tanto a los transportadores como a la actividad de invertasas y otras enzimas. Hacia los tiempos posteriores a las 24 h, el decaimiento en el nivel de ambos transcritos, el decremento en sacarosa y el incremento en glucosa, sugieren la invasión masiva del hongo y la degradación de los transcritos del embrión. En los embriones a las 36 y 48 h se observó colonias púrpuras con una gran cantidad de micelio extendido sobre los embriones reblandecidos, en donde la muerte del embrión fue evidente.

Finalmente el presente trabajo muestra resultados novedosos e interesantes sobre como un factor ambiental de incidencia común en los cultivos de maíz, puede afectar los niveles de transcripción de dos transportadores de carbohidratos en embriones de maíz, y que regula de manera coordinada eventos de carácter fisiológico (tasa respiratoria y germinación) y lo ocurrido a nivel molecular en los transcritos de los transportadores ZmHT y ZmSUT.



## II. INTRODUCCIÓN

### II.1 Características generales de los hongos

Los hongos son organismos eucariontes con núcleos organizados, cuya membrana nuclear está bien definida; son aerobios, heterótrofos y en general no móviles. Se reproducen por esporas sexuales y asexuales. Tienen dos tipos de células fúngicas; las somáticas, cuyo proceso de división es por mitosis; y las reproductoras, que presentan su proceso de división por meiosis. Así mismo, poseen una membrana celular basal bien organizada que contiene gran cantidad de esteroides, en especial el ergosterol, sustancia de la que depende el mecanismo de acción de algunos fungistáticos.

La pared celular está básicamente formada por quitina (*N*-acetilglucosamina), celulosa, glucanas, mananos y algunos glicopéptidos, compuestos que en conjunto dan rigidez a la pared celular y son de importancia en la taxonomía.

### II.2 Taxonomía y generalidades del género *Fusarium*

La clasificación taxonómica de los hongos (*Phylum* o división), clases, familias, géneros y especies ha presentado cambios. Hoy en día se han reordenado y existen varias clasificaciones, la mayoría de ellas basadas en las propiedades morfológicas, reproductivas, fisiológicas y de biología molecular. Actualmente el Diccionario Internacional de Hongos acepta cuatro divisiones (*Phyla*) para el reino *Fungi*, llamado también *Eumycota*, dichas divisiones son: *Zygomycota*, *Basidiomycota*, *Chytridiomycota* y *Ascomycota*. Anteriormente se tenía una división denominada *Deuteromycetes* o *Fungi imperfecti*, donde se consideraba a la mayoría de los hongos de interés patógeno. Sin embargo, a pesar de que esta división como tal ya no existe, aún es empleada por algunos autores, y los hongos que la integraban prácticamente quedan incluidos dentro de las divisiones mencionadas. Al grupo de *Deuteromycetes* se les considera como hongos mitospóricos o anamórficos, es decir que sólo llevan a cabo la reproducción



mitótica o asexual (Bonifaz, 2010). Conforme se descubren nuevas especies surgen nuevas clasificaciones taxonómicas; por ejemplo cuando se encuentra un estado sexual de alguna de las especies de los hongos llamados imperfectos, estos organismos adquieren una doble nomenclatura. Tal es el caso del género *Fusarium*, que se denomina así cuando se reproduce asexualmente, pero algunas especies son reconocidas dentro de los géneros *Gibberella* o *Nectria* cuando presentan reproducción sexual (Sánchez- Rangel, 2003).

La clasificación taxonómica de *fusarium spp* es: (Catalogue of Life, 2010)

- División:** *Fungi (Eumycota)*
- Subdivisión:** *Ascomycota*
- Clase:** *Sordariomycetes*
- Orden:** *Hypocreales*
- Familia:** *Nectriaceae*
- Género:** *Fusarium*

El género *Fusarium spp* está ampliamente distribuido en plantas y suelo. Se encuentra en productos básicos, como el arroz, frijol, soya y otros cultivos. Aunque la mayoría de las especies son más comunes en zonas tropicales y subtropicales, algunas habitan en suelos de climas fríos. *Fusarium spp* es agente causal de infecciones superficiales y sistémicas en seres humanos, infecciones conocidas colectivamente como fusariosis (Doctor Fungus, 2010).

Las características coloniales que presenta el género *Fusarium spp* son: colonias de tamaño ilimitado, de color blanco en un inicio (1 a 3 días), para tornarse posteriormente en tonalidades naranja o violeta-lila (dependiendo de la especie), aspecto veloso, además de que presentan color naranja o violeta difusible al medio. Por otra parte, muestra características microscópicas como son un tipo de micelio macrosifonado de 1-2  $\mu\text{m}$  de diámetro, septado e hialino, con hifas que se organizan en *coremium* y conidióforos delgados.

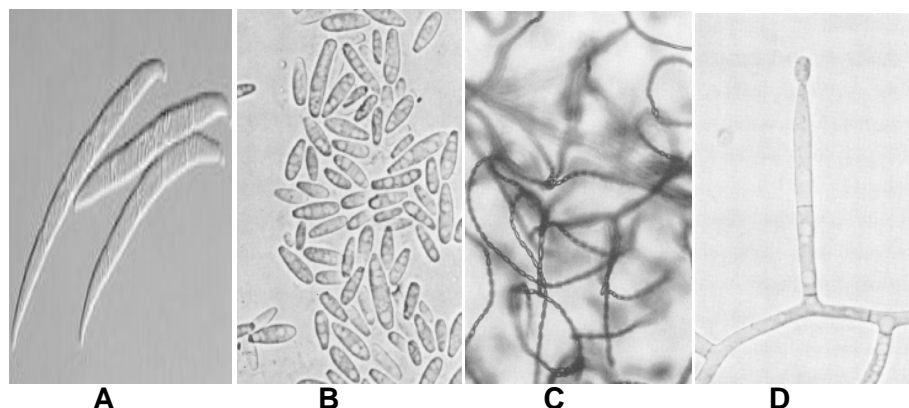
Éste género se reproduce anamórficamente a base de macroconidios fusiformes de 5-8  $\mu\text{m}$  de largo por 1-2  $\mu\text{m}$  de ancho y microconidios fusiformes de 1-3  $\mu\text{m}$  de largo por 1  $\mu\text{m}$  de ancho (Bonifaz, 2010).

### II.3 *Fusarium verticillioides*

#### II.3.1 Características microscópicas

*Fusarium verticillioides* se caracteriza por presentar:

- **Conidios.** Los macroconidios son relativamente largos y esbeltos, de forma ligeramente encorvada y de pared delgada, además de que poseen de 3 a 5 septos (Figura 1A). Por otra parte, los microconidios (Figura 1B) son abundantes en el micelio aéreo, con forma oval y pueden agruparse en cadenas largas (Figura 1C ; Leslie *et al.*, 2006) y formar cabezas falsas (Sánchez-Rangel, 2003).
- **Conidióforos.** Se presentan en monofiálides (Figura 1D), los cuales ocasionalmente se pueden producir en pares que adoptan una forma particular denominada “orejas de conejo”.
- **Clamidoconidios.** No los produce, aunque algunas cepas pueden producir células abultadas en la hifa, lo cual puede llevar a cometer errores en su identificación (Leslie *et al.*, 2006).



**Figura 1.- Estructuras microscópicas características de *Fusarium verticillioides*.** (A) Macroconidios (X1000), (B) Microconidios (X1000). (C) Cadenas de conidios (x109), (D) Monofiálides (X970) (Leslie *et al.* 2006; Nelson *et al.* 1994)



### II.3.2 Características macroscópicas

En agar papa-dextrosa las características coloniales que presenta *Fusarium verticillioides* son: un crecimiento rápido desarrollando un micelio que conforme pasa el tiempo cambia de coloración blanca a violeta (Leslie *et al.*, 2006). Así mismo, la esclerotia puede desarrollarse en algunos casos y usualmente es de color azul oscuro, pudiendo ser tan abundante que en ocasiones da esta coloración en la parte superior e inferior de la superficie de la colonia. El esporodoquio, cuando se presenta, puede ser de color marrón-amarillo a naranja. El reverso de la colonia varía de incoloro a violeta oscuro (Yescas, 2001).

### II.3.3 Reproducción asexual

La reproducción asexual de *Fusarium verticillioides* involucra la producción de conidios, lo que implica repetidos ciclos de mitosis en células conidiogénicas especializadas, seguidas de la encapsulación del núcleo hijo en un incipiente conidio que es liberado en la maduración. El mecanismo de desarrollo del conidio es una conidiación enteroblástica fialídica, en la que el reiterativo proceso basipetal, donde el conidio basal es el más joven, conduce a la formación de cadenas largas de conidios, pequeños e hialinos, desde una fiálide única. Dichas cadenas se encuentran bien adaptadas a factores ambientales como el viento y la lluvia, por lo que éstas estructuras se consideran vectores de dispersión (xenoconidios), lo que claramente es importante para la supervivencia, reproducción, dispersión (Glenn *et al.*, 2004) y ciclos de enfermedad de este hongo (Carter *et al.*, 2008)

### II.3.4 Reproducción sexual

El estado sexual (telomórfico) de *Fusarium verticillioides* (sinónimo de *Fusarium moniliforme*) es *Gibberella fujikuroi* (Desjardins *et al.* 2000), el cuál es un hongo ascomiceto, heterotálico y haploide (Carter *et al.*, 2008), que también es



reconocido como el telomorfo de otras especies de *Fusarium* de la sección *Liseola*, como *F. subglutinans* y *F. proliferatum* (Bush, 2001). Su reproducción sexual, al igual que en otros hongos telomórficos, es por medio de la conjugación de dos células diferenciadas o no, y mediante tres fenómenos reproductivos que son (Bonifaz, 2010):

1. Plasmogamia: mediante la unión de dos protoplasmas.
2. Cariogamia: por la fusión de dos núcleos.
3. Meiosis: división celular que da origen a otras células haploides.

### II.3.5 Micotoxinas

Las micotoxinas son moléculas de bajo peso molecular producidas en forma de metabolitos secundarios por hongos filamentosos. Estos metabolitos constituyen una colección heterogénea de carácter químico y toxicológico, que agrupa sólo a aquellos productos que pueden causar enfermedad y muerte en seres humanos y otros vertebrados. Si bien todas las micotoxinas son de origen fúngico, no todos los compuestos producidos son tóxicos, pues metabolitos fúngicos de bajo peso molecular como el etanol, que son tóxicos sólo en altas concentraciones, no se consideran micotoxinas. Debido a su actividad farmacológica, algunas micotoxinas o derivados de éstas se han empleado como antibióticos, promotores del crecimiento y como otros tipos de fármacos, además de que han sido implicados como agentes de guerras químicas (Bennett *et al.*, 2003).

*Fusarium verticillioides* produce una amplia gama de micotoxinas como las fumonisin, ácido fusárico, fusarinas (particularmente fusarina C), moniliformina, giberilinas (producidas por *G. fujikuroi*) (Desjardins, 2003) y beauvericina (Figura 2). Cabe mencionar que éste hongo no produce tricotecenos, sin embargo posee genes que codifican enzimas funcionales involucradas en la vía biosintética de dicho compuesto; de igual manera, tampoco sintetiza zearalenonas, pero puede producir 8-bostricodina, que comúnmente es confundida con zearalenonas en algunos ensayos (Leslie *et al.*, 2006). A continuación se describen las



características generales de las principales micotoxinas producidas por *Fusarium verticillioides*:

**Fusarina C.-** Es un compuesto estructuralmente inestable (Figura 2A) que se degrada espontáneamente y en respuesta a radiación UV (Jackson *et al.*, 1990). Así mismo, la fusarina C (C<sub>23</sub>H<sub>29</sub>NO<sub>7</sub>) es un metabolito mutagénico iniciador de cáncer esofágico (Nelson *et al.*, 1993), cuya actividad mutagénica es dada al parecer, por la 2-pirrolidona de su estructura (Jackson *et al.*, 1990).

**Moniliformina.-** La moniliformina (Figura 2B) es una sal de sodio o potasio de 1-hidroxíciclobuten-1-eno-3,4-diona (Scott *et al.*, 1987), la cual es producida en cantidades muy bajas por *Fusarium verticillioides*. Este compuesto es altamente tóxico, observándose en modelos animales la rápida aparición de lesiones histológicas degenerativas y necrosantes en el miocardio. Su mecanismo de acción, al parecer, es una inhibición del sistema enzimático piruvato y  $\alpha$ -ketoglutarato deshidrogenasa (Rabie *et al.*, 1982).

**Ácido Fusárico.-** El ácido fusárico (ácido 5-butilpiridina-2-carboxílico) es una micotoxina de toxicidad baja a moderada que presenta actividad sinergista con otras micotoxinas. Se encuentra ampliamente distribuida en los granos maíz y los alimentos a base de éstos (Bacon *et al.*, 1996). El ácido fusárico (Figura 2C) tiene actividad quelante de metales pesados, particularmente del hierro, resultando en una inhibición de enzimas como la porfirina oxidasa, causando una reducción en la respiración de la planta (Sánchez-Rangel, 2003).

**Beauvericina.-** Es una toxina hexadecapéptido cíclica (Figura 2D) con propiedades insecticidas. Su mecanismo de acción se basa en la inhibición específica de la colesterol aciltransferasa. La beauvericina es sumamente tóxica en células humanas, ya que induce una muerte celular programada parecida a la apoptosis, además de causar citólisis acompañada de fragmentación de DNA internucleosomal (Logrieco *et al.*, 1998).

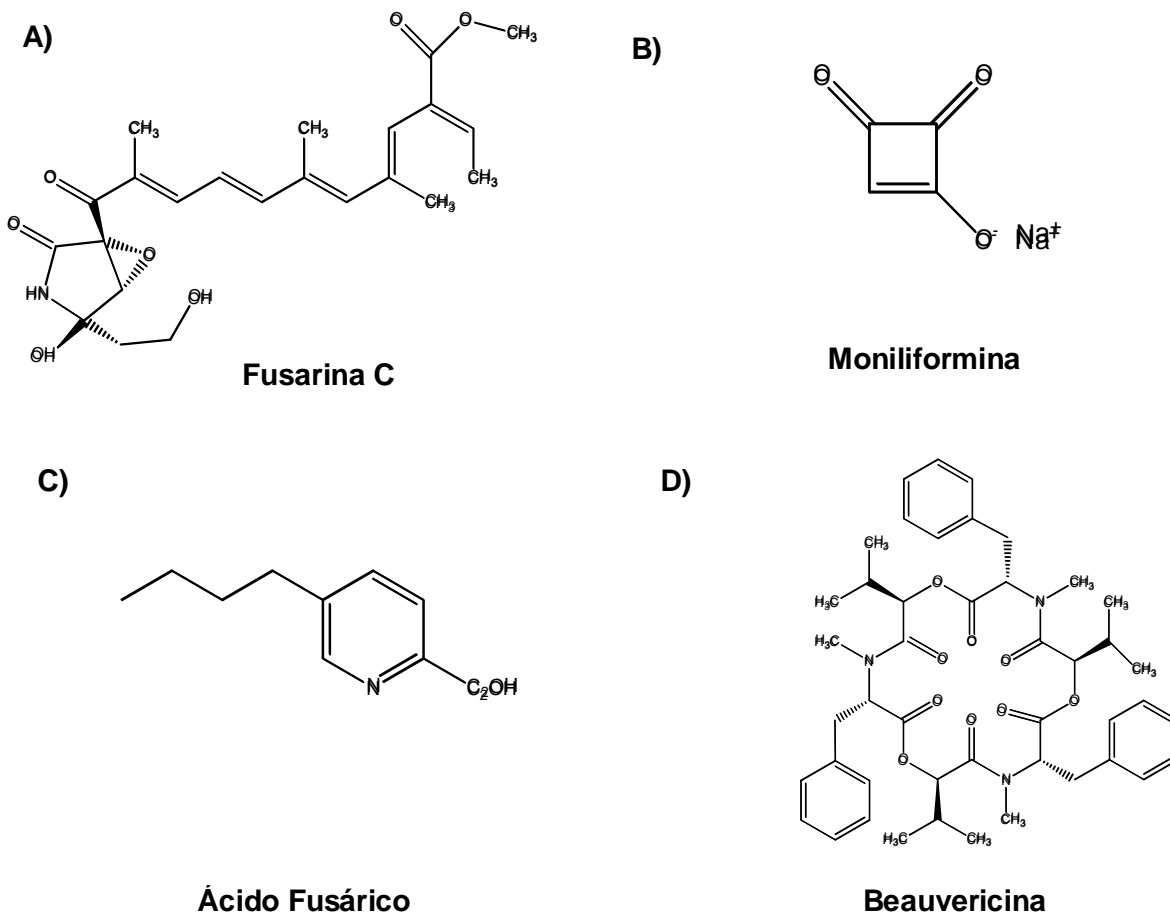


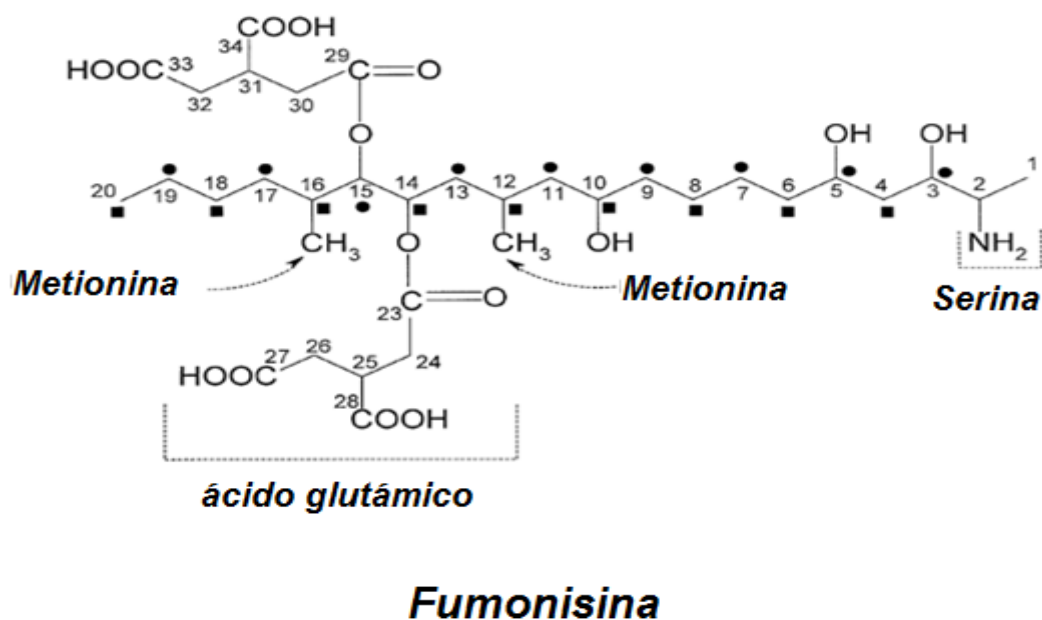
Figura 2.- Estructuras químicas de las principales micotoxinas producidas por *Fusarium verticillioides*.

**Fumonisin:** Familia de micotoxinas, químicamente polialcoholes de cadena larga que varían en la posición y número de los grupos hidroxilos (Desjardins *et al.*, 2000). Son compuestos polares solubles en agua y en soluciones acuosas como metanol y acetonitrilo, pero no son solubles en compuestos no polares. Las fumonisin no tienen una estructura cíclica, como las que se encuentran en otras micotoxinas. Se caracterizan por presentar cadenas amino polihidroxi alcalinas de de 19 o 20 carbonos di-esterificadas con grupos ácido propano-1,2,3 tricarbóxico, lo que lleva a agruparlas en grupos químicamente relacionados (A, B, C y P). Entre las formas que más se han estudiado ampliamente se encuentran la



fumonisina B1 (FB1), la fumonisina B2 (FB2) y la fumonisina B3 (FB3), todas pertenecientes a la serie B de las fumonisinas.

La serie A difiere de la serie B por la presencia de un grupo N-Acetil amida en vez de un grupo amina en el carbono 2. Por su parte, la serie C difiere de la B por la falta de un grupo metilo terminal en el carbono 1, mientras que la serie P contiene un grupo 3-hidroxipiridina en el carbono 2 en vez de la amina presente en la serie B (Wan Norhasima *et al.*, 2009).



**Figura 3.- Estructura química de Fumonisina B1 (origen biosintético)** (Tomado y adaptado de Wan Norhasima *et al.*, 2009).



### II.3.6 Fumonisina B1 y toxicidad

También conocida como macrofusina, la FB1 (Figura 3) es la micotoxina más abundante de la familia de las fumonisinas, encontrándose en una proporción del 70-80 % del contenido total de fumonisinas en cultivos de *Fusarium verticillioides* y alimentos naturalmente contaminados (Wan Norhasima *et al.*, 2009). La incidencia natural de esta micotoxina es un problema de salud, ya que se ha encontrado que causa leucoencefalomalacia en caballos, mulas, burros y conejos (Desjardins *et al.*, 1997; Sánchez *et al.*, 2005); edema pulmonar en cerdos, cáncer de hígado en ratas; además de que se han reportado varios casos de cáncer esofágico en humanos en las regiones de Transkei (Sudáfrica), en China y al noreste de Italia asociados a esta micotoxina (Bennett *et al.* 2003). Por ello la Agencia Internacional de Investigación del Cáncer la ha incluido en el grupo 2B como posible carcinógeno en humanos (Sánchez *et al.* 2005). Por otra parte, algunos estudios indican que el grupo de aminas primarias que se encuentran en la serie B y C de las fumonisinas, son necesarias para provocar la toxicidad de FB1, que tiene como órganos blanco al hígado y al riñón en casi todos los animales.

El mecanismo de acción molecular de las fumonisinas se encuentra relacionado con la interrupción del metabolismo de esfingolípidos. La fumonisina B1 y otros miembros de la serie B de las fumonisinas, son potentes inhibidores de la ceramida sintasa (esfinganina *N*-acetyl transferasa), la cual es la enzima responsable de la acetilación de la esfinganina, el palmitato y otros ácidos grasos. (Bush, 2001).

### II.3.7 Importancia económica de las micotoxinas.

Las enfermedades en plantas son una importante limitación en la producción de cultivos a nivel mundial, ya que se pierde del 10-30% de la cosecha global cada año. Como consecuencia las enfermedades en cultivos representan una significativa amenaza en la seguridad alimentaria. Para alimentar a la creciente



población humana será necesario el doble de la producción para el 2050, lo cual requerirá de la intensificación sustentable del mundo de la agricultura en una era de cambios climáticos impredecibles, por lo que controlando las principales enfermedades que representan las mayores amenazas, tales como las enfermedades en cultivos asociadas a hongos, será posible una producción adecuada (Talbot, 2010). Expertos de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) han estimado que arriba del 25% de los cultivos a nivel mundial se pierden debido a contaminaciones por micotoxinas, a las cuales contribuyen substancialmente especies del genero *Fusarium*.

El impacto económico de las micotoxinas en el ser humano y la agricultura animal puede ser evaluado por múltiples criterios como la pérdida de recursos humanos y la vida animal, la salud y los gastos de atención veterinaria, pérdida de la producción ganadera y de cultivos de forraje y alimentos; costos de reglamentación y gastos de investigación centrados en aliviar el impacto y la gravedad del problema de las micotoxinas.

Las pérdidas en pudrición de mazorcas por brotes de *Fusarium* pueden ser más graves de lo que se piensa, ya que por ejemplo, solamente en Kentucky y Virginia hubo por lo menos 38 muertes de caballos por leucoencefalomalacia como resultado del brote de 1995, cuando el maíz utilizado para su alimentación estaba contaminado con fumonisinas en 15 mg/Kg. En 1991 en Indiana, otro brote de *Fusarium* provocó que 43% de las mazorcas presentaran daños en más del 3% de sus granos. En cerca de 101 muestras correspondientes a 113 muestras analizadas se detectó que estaban contaminadas con fumonisinas y 50 de esas muestras tenían concentraciones mayores a los 50 mg/kg, lo que ciertamente causa efectos adversos sobre la salud de caballos, cerdos y otros animales. Suponiendo que el 15-25% del maíz del caso anterior estuviera contaminado, las pérdidas de mercado estarían entre 27.5-45.8 millones de dólares. La pérdida de caballos sería de alrededor de 315 000 dólares si 100 muertes en todo el país fueran por Leucoencefalomalacia debida al brote (Wan Norhasima *et al.*, 2009).



## II.4 Maíz

### II.4.1 Características generales de la planta de maíz.

El maíz (*Zea mays*), como todos los demás miembros de la familia de las gramíneas (Poaceae), están constituidas mayoritariamente por tejido foliar. Su tallo principal es una barra esbelta y segmentada, que presenta a lo largo de ella una serie de nodos, y que soporta dos filas de hojas únicas opuestas una de la otra. Mientras que la mayoría de las gramíneas tienen inflorescencias bisexuales, el maíz (Figura 4), las presenta unisexuales. Las inflorescencias masculinas (estaminadas) se localizan a lo largo de estructuras ramificadas llamadas espigas, las cuales se encuentran en la parte superior de la planta. Las inflorescencias femeninas (pistilo) se encuentran en una disposición compacta alrededor de un eje y colectivamente forman la mazorca. Cada mazorca se localiza al final de una rama corta lateral (brote) a lo largo de la región media de la planta (Vincent, 2002).

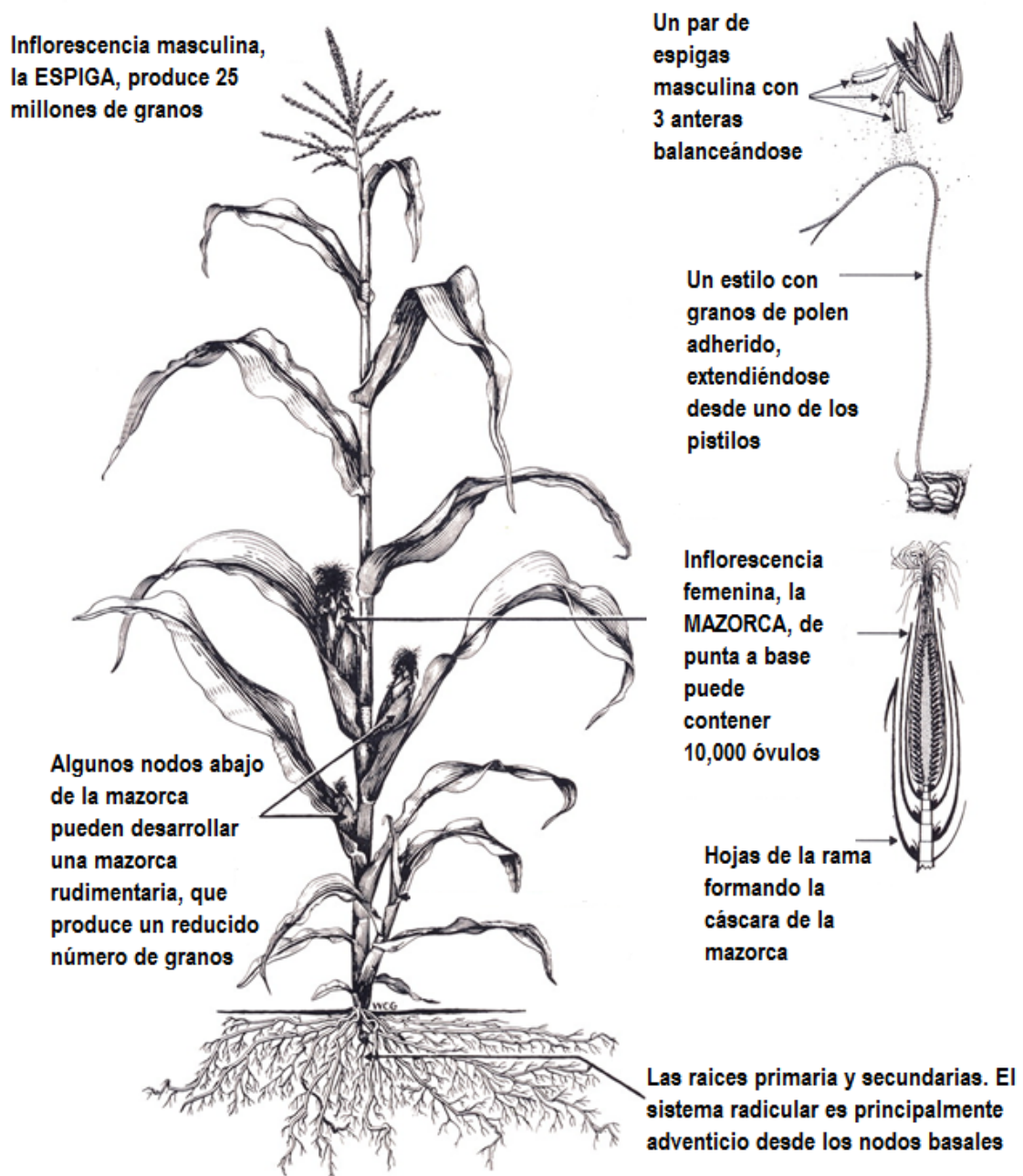


Figura 4.- Anatomía general de la planta de maíz (*Zea mays*) (Tomado y adaptado de Strable *et al.*, 2009).



#### II.4.1.1 Estructura y composición de la semilla de maíz.

El proceso de formación de la semilla de maíz, comienza con la doble fertilización, es decir, ocurre una fertilización de los núcleos presentes en el saco embrionario en el ovario, con los dos núcleos espermáticos producidos en el grano de polen. Un núcleo espermático se fusiona con un óvulo para formar un cigoto diploide ( $2n$ ), mientras que el otro núcleo espermático se fusiona con dos núcleos polares, para formar una célula con un núcleo triploide (Sánchez-Nieto, 1999). Una vez que la semilla (cariopsis) ha madurado, se pueden distinguir sus tres principales partes: el pericarpio, el endospermo y el embrión (Figura 5).

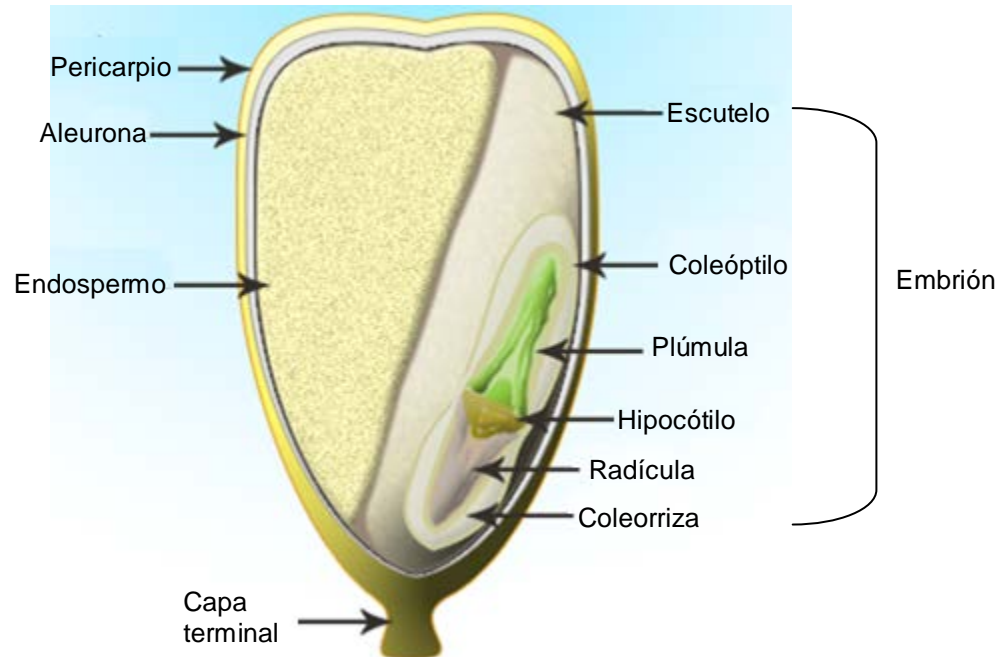
**Pericarpio.-** Es la capa dura exterior y transparente de la semilla que envuelve al endospermo y al embrión, ambos contienen material genético del tejido materno y paterno, que representan la siguiente generación.

**Endospermo.-** Contribuye aproximadamente con el 85% del peso de la semilla y es la fuente de alimento del embrión varios días después de la germinación. Este alimento almacenado toma la forma de granos de almidón intracelular y cuerpos proteicos. Asimismo, el endospermo presenta una única parte denominada **aleurona** capaz de mostrar pigmentación (debido al contenido de antocianinas), la cual es visible a través del pericarpio transparente.

**Embrión.-** El embrión se encuentra incrustado en la parte ancha de la semilla hacia la mazorca. Está constituido por varios tejidos entre los que destacan el escutelo y el eje embrionario.

**Escutelo.-** Es considerado como el equivalente a un cotiledón, sin embargo nunca funciona como una verdadera hoja de follaje, pero sirve para digerir y absorber los compuestos almacenados en el endospermo durante el crecimiento del embrión y la plántula. Es un tejido con alta capacidad metabólica.

**Eje embrionario.**- Esta formado por la plúmula, coleóptilo y la coleorriza desde la testa. El coleóptilo encierra a la plúmula, la cual presenta de tres a cinco primordios foliares. (Vincent, 2002)



**Figura 5.- Semilla de maíz y sus diferentes partes** (Tomado y adaptado de GeoChembio, 2010).

Existen diferencias importantes en la composición química de las principales partes de la semilla de maíz (Tabla 1), la cual está constituida en un 21% por amilosa, una cadena lineal de moléculas de glucosa vinculadas entre sí por enlaces glucosídicos  $\alpha(1-4)$ , por un 79% de amilopectina y en menor proporción azúcares libres como fructuosa o glucosa (Wilson *et al.*, 2004). El pericarpio se caracteriza por un alto contenido de fibra cruda de alrededor del 87 %, que a su vez está constituida esencialmente por hemicelulosa (67%), celulosa (23 %) y lignina (0.1 %). Por otra parte, el endospermo contiene un alto nivel de almidón (87,6 %) y niveles de proteína de alrededor del 8 %. El contenido de lípidos en el endospermo es relativamente bajo, pero en el embrión es de cerca del 33% (FAO,



1992). En cuanto a las reservas de nutrimentos que se encuentran en el propio embrión, se encuentran los lípidos, localizados preferencialmente en el escutelo (27% en base seca), aunque también contiene carbohidratos solubles, del total de éstos 93% es sacarosa, mientras que fructuosa y glucosa oscilan entre el 2.1% y 4.0% respectivamente (Gómez-Calderas, 2008). La aleurona es relativamente alta en su contenido de proteínas (19 %) así como en fibra cruda. El endospermo aporta la mayor cantidad de nitrógeno, seguida por el embrión y en menor proporción el pericarpio (FAO, 1992).

Componente	Pericarpio	Endospermo	Embrión
<b>Proteínas</b>	3.7	8.0	18.4
<b>Fibra Cruda</b>	86.7	2.7	8.8
<b>Almidón</b>	7.3	87.6	8.3
<b>Otros Azúcares</b>	0.34	0.62	10.8

Tabla 1.- Composición química de las principales parte del grano de maíz (Tomado y adaptado de FAO, 1992).

#### II.4.2 Enfermedades asociadas al maíz

##### Pudriciones de mazorca por *Gibberella* y *Fusarium*

###### *Naturaleza de los daños*

- Los primeros signos de la infección son la formación de micelios blancos, que van descendiendo desde la punta de la mazorca y dan una coloración rojiza y rosada a los granos infectados. El hongo produce micotoxinas que son tóxicas para varias especies animales.
- El daño que causa *Fusarium verticillioides* se manifiesta principalmente en granos individuales o en ciertas áreas de la mazorca.
- El hongo produce micotoxinas conocidas como fumonisinas, que son tóxicas para algunas especies animales.





### Signos

- Los granos infectados desarrollan un moho algodonoso o rayas blancas en el pericarpio, y además dichas semillas germinan estando aún en el olote.
- Las mazorcas invadidas por barrenadores del tallo son infectadas por *Fusarium verticillioides*

### Factores que favorecen el desarrollo

- *Gibberella*, el estado sexual del patógeno, es más común en las zonas frías y húmedas.
- La pudrición de la mazorca por *Gibberella* suele ser más frecuente cuando los desechos de los cultivos infectados pasan el invierno.
- La enfermedad se asocia frecuentemente con lesiones en la mazorca causadas por los barrenadores.

### Distribución geográfica

- Se presenta ampliamente en regiones de cultivo de maíz del mundo.

### **Pudriciones de tallo por *Gibberella* y *Fusarium***

#### *Naturaleza de los daños*

- Pudriciones de tallo por *Gibberella* y *Fusarium* puede causar extensos daños a los cultivos por muerte prematura de plantas, la interferencia con la translocación de agua y nutrientes durante el llenado del grano.

#### *Signos*

- Las plantas marchitas permanecen erectas cuando se secan.
- Aparecen lesiones pequeñas de color café oscuro en los entrenudos inferiores.
- Al partirlas verticalmente, se observa que el floema de los tallos infectados es café oscuro y que hay un oscurecimiento conspicuo general de los tejidos.



- En las etapas finales de la infección, la médula es destruida y los tejidos adyacentes pierden su color.

*Factores que favorecen el desarrollo*

- *Fusarium verticillioides* es más común en climas secos y cálidos. Es particularmente dañino si comienza antes de la floración.
- El aumento de la densidad de cultivo y dosis de nitrógeno favorecen la gravedad de la enfermedad.
- Los cultivos bajo estrés (por ejemplo, debido a enfermedades foliares) son más propensos a la pudrición del tallo, como los tallos están ya debilitados, los azúcares del tallo se desvían para el llenado del grano (Centro Centro Internacional de Mejoramiento del Maíz y el Trigo, 2010)

A continuación, en la Tabla 2 se mencionan las principales enfermedades asociadas al maíz tanto por hongos como por plagas.

<b>Enfermedades foliares</b>	Mancha bandeada de hoja y vaina Mancha foliar por <i>Curvularia</i> Rayado foliar por <i>Macrospora</i> Tizón foliar por <i>maydis</i> Mancha foliar por <i>Phaeosphaeria</i> Roya por <i>Polysora</i> Mildiú sorgo del maíz
<b>Pudrición de tallo</b>	<b>Pudriciones de tallo por <i>Gibberella</i> y <i>Fusarium</i></b> Carbón de la espiga Pudrición de tallo por <i>Pythium</i> Pudrición de tallo por <i>Stenocarpella</i>
<b>Pudrición de mazorca</b>	Pudrición de mazorca por <i>Aspergillus</i> Carbón común <b>Pudrición de mazorca por <i>Fusarium</i></b> Pudriciones de mazorca por <i>Penicillium</i> Pudrición de mazorca por <i>Stenocarpella</i>
<b>Enfermedades causadas por virus y mollicutes</b>	Achaparramiento del maíz Mosaico del enanismo del maíz Virus del rayado del maíz Mosaico de la caña de azúcar



<b>Plagas que afectan a la planta</b>	Barrenador africano del tallo de maíz Pulgón de la hoja de maíz Barrenador europeo del maíz Gusano cogollero Pulguilla negra Saltamontes, langostas y chapulines Barrenador oriental del maíz Barrenador del maíz Barrenador moteado del tallo de sorgo Barrenador de la caña de azúcar Termitas Gallina ciega
<b>Plagas que afectan el grano</b>	Polilla de los cereales Gusanos eloteros Gusanos de la mazorca Barrenadores del grano Gorgojos del grano Roedores y pájaros

**Tabla 2.- Principales enfermedades del maíz asociadas a hongos y otras plagas**  
(Tomado y modificado del Centro Internacional de Mejoramiento del Maíz y el Trigo (CIMMYT), 2010).

#### II.4.2.1 Ciclo de vida de *Fusarium verticillioides* en maíz.

Los patógenos fúngicos de las plantas causan las mayores pérdidas y afectan la calidad y la seguridad de los alimentos al infectar la materia vegetal. Diferentes hongos han desarrollado diversas estrategias para hacer frente a sus hospederos. Las plantas infectadas son mantenidas vivas para garantizar un suministro prolongado de carbono orgánico y otros compuestos para el patógeno (hongo biotrófico), o son destruidas y el hongo se alimenta de tejido vegetal muerto o moribundo (hongo necrotrófico). Otros hongos comienzan con una infección biotrófica y cambian a un comportamiento necrotrófico en etapas posteriores de la infección, y/o bajo ciertas condiciones ambientales (hongos hemibiotróficos). (Wahl *et al.*, 2010), tal es el caso de *Fusarium verticillioides*, que puede cambiar de una fase biotrófica a una necrotrófica una vez que causa la pudrición de tallos, mazorcas y raíces, lo cual lleva a ocasionar severos daños y cambios en las condiciones de crecimiento de la planta, además de que durante ambas fases produce micotoxinas tóxicas para diferentes animales (Rutherford *et al.*, 2002). El



reconocimiento de tales patógenos por la planta infectada, resulta en la producción de especies reactivas de oxígeno y células con muerte celular de reacción de hipersensibilidad. Las respuestas de defensa de la planta que resultan en la muerte celular serán muy eficaces contra hongos biotróficos, mientras que los patógenos necrotróficos incluso podrían beneficiarse con la muerte de la célula huésped, por lo que las plantas usan diferentes respuestas de defensa para los hongos biotróficos y necrotróficos. (Wahl *et al.*, 2010).

*Fusarium verticillioides* es asociado a enfermedades en todos los estados de desarrollo de la planta del maíz, infectando las raíces, los tallos y los granos. Este patógeno no es sólo el más común en el maíz, sino que también es uno de los que más frecuentemente se encuentran colonizando asintóticamente a la planta, por lo que se le considera un compañero constante de la planta y sus semillas, lo que lleva en muchos casos a ignorar su presencia al no mostrarse daños visibles en el hospedero. Algunas observaciones indican que la infección por *Fusarium verticillioides* puede estimular el crecimiento y el desarrollo del maíz, posiblemente debido a la producción de hormonas promotoras del crecimiento vegetal, además de que dicho hongo protege al hospedero de otros patógenos e insectos más destructivos, pues algunos estudios indican una reducción de *Aspergillus flavus* y un decremento de aflatoxinas en mazorcas de maíz que han sido co-inoculadas con *Fusarium verticillioides* (Munkvold *et al.*, 1997).

El ciclo de infección y enfermedad en el sistema *Fusarium verticillioides*-maíz (Figura 6) es complejo, y la importancia relativa de sus componentes continúa siendo objeto de debate. El hongo sobrevive en los residuos de los cultivos, pero por lo general no se encuentra entre los más comunes del género *Fusarium* que se pueden hallar. No produce clamidosporas, pero puede producir engrosamiento de hifas que aparentemente prolongan su supervivencia. Este hongo es transmitido por la semilla, asociándose a esta fase de la infección con plántulas enfermas, no obstante el papel de transmisión de las semillas no es claro en el tallo ni en la pudrición del grano.



*Fusarium verticillioides* produce abundantes macroconidios y microconidios que están en el aire sobre los campos de maíz. Los microconidios, por su parte, pueden moverse libremente dentro de la planta. La fuente de conidios aéreos se debe a los residuos en los cultivos, pero la esporulación de los hongos en los estilos o pistilos pueden también contribuir a la infección de las estigmas del maíz, las cuales igualmente logran infectarse por el aire o agua contaminada con conidios. El estado fisiológico de los estigmas también afecta aumenta la susceptibilidad a ser infectado (Munkvold *et al.*, 1997). Algunos factores que pueden predisponer a la mazorca para ser infectada por hongo son los daños causados por otros hongos, o aquellos de naturaleza ambiental, tales como la temperatura y la disponibilidad del agua, pues se ha demostrado que climas cálidos y secos favorecen el desarrollo de *Fusarium verticillioides* (Granjo *et al.*, 2007). Por otro lado, los insectos juegan un papel importante en la infección del maíz, ya que éstos causan lesiones en los sitios característicos de la infección fúngica, tanto de tallo como de mazorca. No obstante, algunos insectos pueden actuar como vectores, como el barrenador europeo del maíz, *Ostrinia nubilalis*. Existen otros insectos que han sido investigados como vectores o agentes que participan en la infección por *Fusarium verticillioides*; éstos incluyen al gusano de maíz, al gusano de la raíz del maíz (en estado adulto y larvario) y a algunos escarabajos (Munkvold *et al.*, 1997).

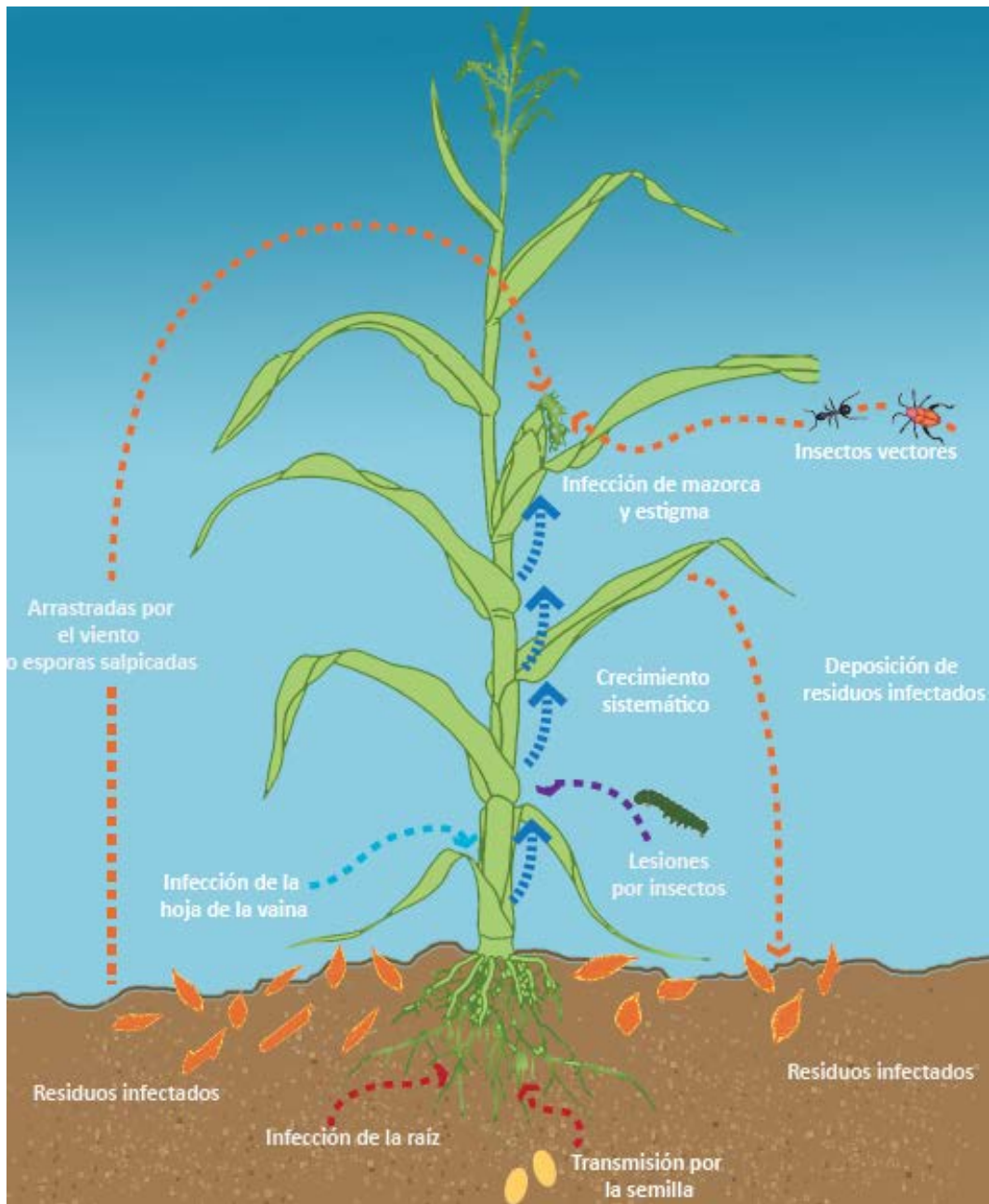


Figura 6.- Ciclo de infección y enfermedad en el sistema *Fusarium verticillioides*-maíz (Tomado y adaptado de Munkvold *et al.*, 1997 ; Mackean, 2010).



## II.5 Germinación

La germinación en las semillas se define como la suma de eventos que comienzan con la hidratación de la semilla y culminan con la salida de la radícula (Srivastava, 2002). La germinación resulta de una combinación de varios eventos metabólicos y celulares, coordinados por una red regulatoria compleja que incluye la dormancia<sup>1</sup> de las semillas, una capacidad intrínseca para bloquear temporalmente la elongación radicular con el fin de optimizar el periodo de germinación (Bove *et al.*, 2001). Los acontecimientos posteriores, incluidas la movilización de las principales reservas almacenadas, están asociados con el crecimiento de la plántula. Prácticamente todos los eventos metabólicos y celulares que se conocen ocurren antes de que la germinación se complete (Bewley, 1997), como por ejemplo: la hidratación de los componentes celulares, cambios a nivel estructural y respiratorio, síntesis de macromoléculas y elongación celular, no obstante ninguno de estos eventos son únicos de la germinación (Bewley y Black, 1994). La germinación es afectada al mismo tiempo por factores ambientales como la disponibilidad del agua, oxígeno, luz, así como la temperatura; y por factores intrínsecos como son la permeabilidad de la testa al agua y al oxígeno, la obstrucción de la salida de la radícula por el endospermo y la dormancia, la cual puede retrasar a la germinación por procesos que involucran interacciones entre dos factores de crecimiento de la planta, el ácido abscísico y las giberelinas (Bove *et al.*, 2001).

---

<sup>1</sup> La dormancia en las semillas es definida en un sentido funcional. Las semillas que no germinan aún cuando se les proporciona las condiciones óptimas como temperatura, agua, y oxígeno se consideran dormantes, mientras que aquellas que si logran germinar se les llama no dormantes. La dormancia en las semillas es común en la naturaleza y de extrema importancia para la supervivencia natural de las poblaciones. Tanto las semillas dormantes, como las no dormantes, exhiben cambios similares en el metabolismo y la respiración cuando son embebidas, sin embargo sólo las no dormantes completan la germinación. Este fenómeno se sustenta en bases genéticas, pero su grado de expresión es debido a factores ambientales y señales del desarrollo. La dormancia se divide en dos tipos: la dormancia primaria, que es adquirida durante el desarrollo/maduración de la semilla, y la dormancia secundaria, que resulta de diversos factores(ambientales) que atacan a la semilla después de que ha madurado, y que también es relacionada con aumentos en el contenido endógeno de ácido abscísico (Srivastava, 2002).



La toma de agua por las semillas maduras y secas, es un proceso trifásico (Figura 7), donde la primera fase presenta una rápida toma de agua seguida de una meseta (Fase II). Un nuevo aumento en la captación de agua se produce sólo después de que se ha completado la germinación y se han alargado los ejes embrionarios (Bewley, 1997). A continuación se describe cada fase de la toma de agua por semillas (Figura 7).

**Fase I.-** Fase de rápida imbibición en la que se pone en marcha la reanudación del metabolismo basal. Durante ésta fase conocida como imbibición “física”, la activación paso por paso de las rutas metabólicas resultan del aumento gradual de la hidratación. Entre las actividades metabólicas que se reanudan destacan la reparación de DNA, la respiración, la reparación de las mitocondrias, el metabolismo de aminoácidos, la síntesis de proteínas, la síntesis de mRNA. La entrada de agua a las células resulta en una perturbación temporal de tipo estructural, particularmente de las membranas, las cuales permiten una rápida e inmediata pérdida de solutos y metabolitos de bajo peso molecular en la solución de imbibición que la rodea (Bewley, 1997; Bove *et al.*, 2001).

**Fase II.-** Durante esta fase también denominada “fase lag” o “fase estacionaria”, los procesos metabólicos se encuentran ya activos y son requeridos para que el embrión crezca y se complete la germinación (Bradford, 2004). Esta fase se establece cuando el nivel de hidratación es superior al 60%, lo que lleva a una reducción en la tasa de hidratación y los nuevos mecanismos fisiológicos que preparan la expansión celular en los ejes embrionarios, culminando con el inicio de la elongación celular. Además, se acumulan sustancias osmóticamente activas como azúcares, aminoácidos e iones potasio y se acidifica la pared celular, lo que conduce a la relajación de las uniones entre los polímeros de la pared celular, evento que coincide con la activación de la ATPasa de H<sup>+</sup> en la membrana plasmática, lo que se traduce en un incremento en la toma de agua, que a su vez coincide con el debilitamiento de tejidos circundantes como el endospermo y la elongación del eje embrionario, lo que lleva a finalizar la germinación, pero no sin

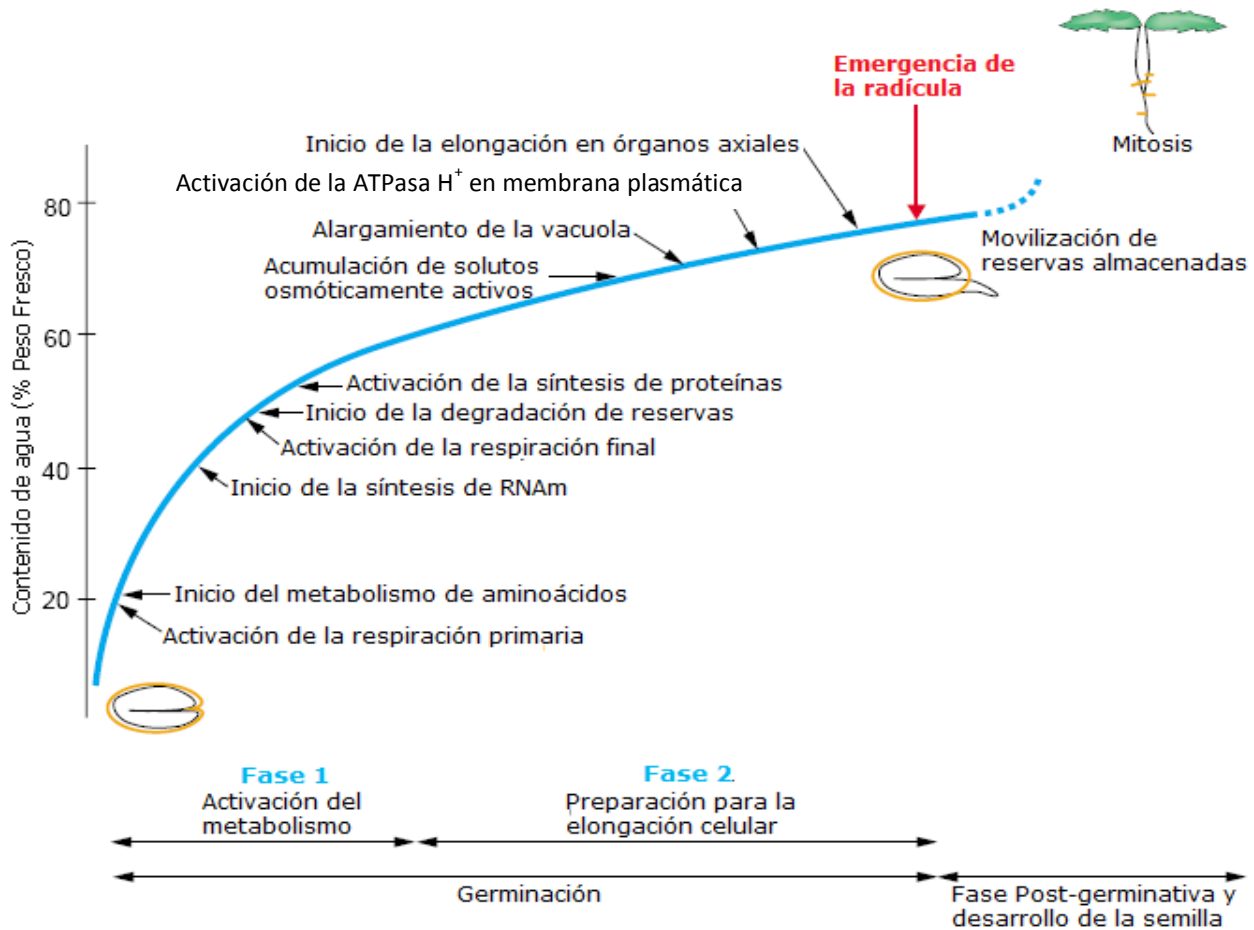




antes iniciar la movilización de nutrientes almacenados tales como el almidón, lípidos y proteínas que se encuentran acumulados en el cotiledón del embrión y/o en el endospermo (Bove *et al.*, 2001).

Esta fase es dependiente de la temperatura y el potencial hídrico ( $\psi$ ), pues una baja temperatura y un bajo  $\psi$  prolongan la duración de esta etapa, donde se presentan interacciones entre factores antagónicos endógenos del crecimiento vegetal, como el ácido abscísico y giberelinas que pueden evitar la dormancia (Bove *et al.* 2001; Bradford, 2004).

**Fase III.-** A diferencia de las fases anteriores, esta fase no es considerada como una etapa germinativa, por lo cual se le ha denominado post-germinativa. Se caracteriza por un incremento considerable en el contenido de agua de la semilla, donde además son utilizados los nutrientes almacenados para sostener a la planta joven en sus etapas tempranas de crecimiento. Por otra parte, también ocurren eventos celulares como la mitosis y la síntesis de DNA (Bove *et al.*, 2001; Bradford, 2004; Srivastava, 2002).



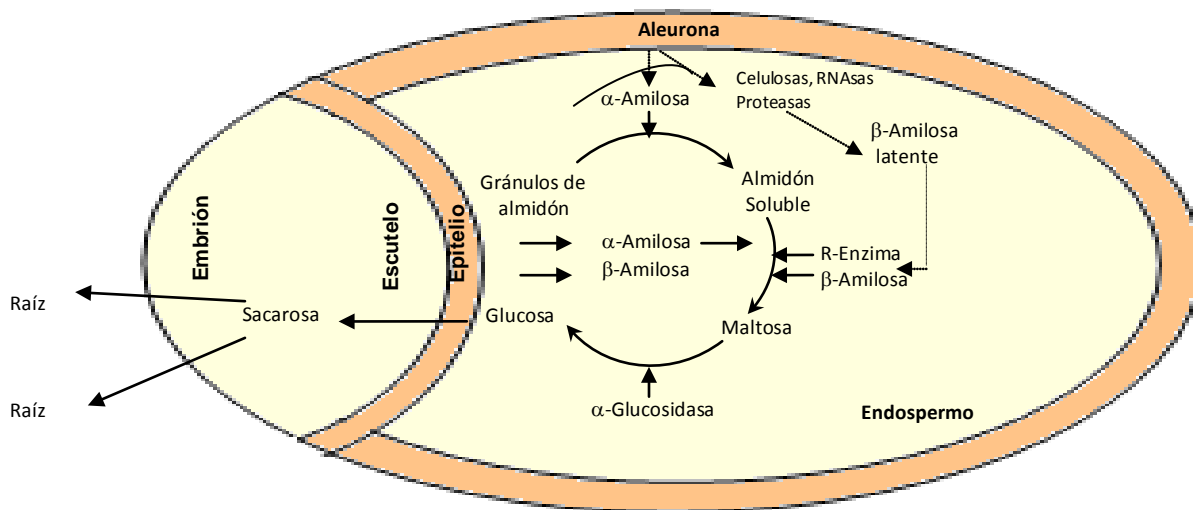
**Figura 7.- Curva de toma de agua por semilla.** Eventos celulares y metabólicos provocados por la absorción de agua durante la germinación de semillas (Tomado y adaptado de Bove *et al.*, 2001).

### II.5.1 Movilización de reservas nutrientes durante la germinación

La germinación de la semilla y la movilización de reservas de nutrientes son procesos altamente regulados por factores ambientales tales como la luz, la temperatura y por el desarrollo mismo (Pritchard *et al.*, 2002). Dicha movilización es esencialmente lo contrario al almacenamiento de las reservas de nutrientes durante el desarrollo de la semilla (Bradford, 2004). Una amplia gama de

hidrolasas ácidas sintetizadas en la aleurona y el escutelo son las responsables de hidrolizar las reservas de la semilla (Pritchard *et al.*, 2002). Estas reservas pueden ser almidón y proteínas en el endospermo, lípidos y proteínas en células de la capa aleurona, y polisacáridos en las paredes de la aleurona y el escutelo (Bewley, 2006). Durante el proceso de germinación, el almidón, otros carbohidratos, y lípidos son convertidos de nuevo en sacarosa para su transporte al eje. Las proteasas descomponen las proteínas almacenadas en péptidos y aminoácidos que serán utilizados en la síntesis de proteínas o exportadas a la plántula. La fitasa es activada para descomponer a la fitina liberando así fosfatos y minerales (Bradford, 2004).

La movilización de reservas ocurre esencialmente en dos partes: la primera durante la fase del periodo germinativo, en donde las semillas utilizarán las reservas de corto alcance, es decir aquellas con las que el tejido se quedó cuando se llevó a cabo el periodo de secado y maduración de la semilla. La segunda etapa ocurre previa a la salida de la radícula y hasta que la plántula se establezca como organismo autotrófico, las reservas que se movilizan en esta etapa se localizan en el tejido extraembrionario (Ramírez- Sóstenes, 2008).



**Figura 8.-Vía de movilización de reservas de carbohidratos en el embrión, desde el almidón hasta la sacarosa** (Tomado y adaptado de Bradford, 2004).



**Movilización de carbohidratos.-** La fuente inicial de carbohidratos para el eje embrionario son la sacarosa, la rafinosa, y otros oligosacáridos que se almacenan en él. Sin embargo, la fuente más importante de carbohidratos es el almidón. La movilización de las reservas del endospermo o el cotiledón generalmente inician sólo después de la protrusión de la radícula. Seguida de la imbibición y bajo el control de hormonas, (particularmente ácido giberélico), las células de la aleurona sintetizan un grupo de enzimas hidrolíticas que son secretadas dentro del endospermo (Figura 8). De éstas enzimas la más estudiada es la  $\alpha$ -amilasa, la cual rompe los enlaces internos  $\alpha$ -1-4 del almidón, no obstante la más abundante en el endospermo es la  $\beta$ -amilasa, enzima que toma de sustrato los productos de hidrólisis de la  $\alpha$ -amilasa. Sin embargo, estas amilasas no pueden hidrolizar los enlaces  $\alpha$ -1,6 de la amilopectina, lo que hace que enzimas específicas denominadas desramificantes hidrolicen la amilopectina, para así liberar amilosa que posteriormente podrá ser hidrolizada por las amilasas (Figura 8). Por otra parte, la maltosa es convertida en glucosa por la  $\alpha$ -glucosidasa, y la glucosa es transformada a sacarosa por la vía de UDP-Glc pirofosforilasa y la sacarosa-6P sintetasa. Algunas semillas tienen además, inhibidores de las  $\alpha$ -amilasas de insectos para prevenir que éstos consuman sus reservas; de igual forma, las semillas en las que sus mayores reservas de carbohidratos son las galactomananas, presentan otro tipo de enzimas hidrolíticas (Bradford, 2004).

**Movilización de proteínas.-** La movilización de reservas de proteínas, localizadas en el endospermo, es uno de los eventos post-germinativos más importantes en el desarrollo y crecimiento de la plántula. Durante la germinación, las reservas de proteínas son degradadas por una variedad de proteasas (endopeptidasas, aminopeptidasas y carboxipeptidasas), que convertirán a las reservas de proteínas insolubles en péptidos solubles y aminoácidos libres, los cuales serán movilizados hacia el eje embrionario para contribuir en su crecimiento, proporcionando además, energía por la oxidación del esqueleto de carbono aumenta después de la desaminación de los aminoácidos. En los cereales, las proteasas responsables de la hidrólisis de las proteínas de reserva



son sintetizadas en la aleurona, dicha síntesis es regulada positivamente por las giberelinas y negativamente por el ácido abscísico (Ramakrishna, 2005).

**Movilización de lípidos.-** En la semillas, las reservas de lípidos se encuentran en forma de triacilgliceroles (TAG) (Pritchard *et al.*, 1997), los cuales son hidrolizados por lipasas, liberando ácidos grasos que posteriormente serán transportados al glioxisoma, un organelo especializado en la movilización de reservas de lípidos, donde el acetil CoA es convertido en malato y succinato por el ciclo del glioxilato, posteriormente el succinato es convertido en malato en la mitocondria, para subsecuentemente exportarse al citosol y por acción de la malato deshidrogenasa convertirse en oxalacetato, que a su vez será transformado, por la fosfoenol piruvato carboxicinasa, en fosfoenolpiruvato que entrará a la vía de la gluconeogénesis y eventualmente a la síntesis de glucosa y sacarosa. (Bradford, 2004; Ramírez-Sóstenes, 2008).

## II.6 Transportadores de carbohidratos

### II.6.1 Generalidades

En las plantas superiores, los carbohidratos juegan un papel importante tanto como nutrientes como moléculas señal durante su ciclo de vida. Mientras que las partes verdes fototróficas (fuente) de la planta sintetizan azúcares como productos de su actividad fotosintética durante el día, las partes no verdes (demanda) dependen de la constante importación de carbohidratos que son tomados del floema a donde fueron liberados por los tejidos fuente. Las células fuente y demanda asignan a los azúcares a los diferentes compartimientos celulares (Büttner, 2007). Ésta es una regulación importante llevada a cabo durante el crecimiento y desarrollo de la planta y su pobre regulación podría traer efectos negativos en los cultivos debido a que hasta un 80% del carbono fijado se dirige a los tejidos demanda (Vaughn *et al.*, 2002). Factores exógenos como estrés abiótico o infección por patógenos pueden influir en la compartimentación y distribución de los carbohidratos, por tanto se deben asumir complejos



mecanismos que integran la expresión de enzimas relacionadas con la producción de carbohidratos en los tejidos fuente y su utilización en los tejidos demanda (Roitsch, 1999).

El xilema y el floema, los sistemas de traslocación a larga distancia de la planta, juegan un papel crítico en el desarrollo de un sistema circulatorio efectivo de nutrientes y que constituyen una red de comunicación en la planta entera, ya que la distribución, a los distintos órganos de la planta, de nutrimentos como aminoácidos y azúcares se efectúan a través del floema, mientras que el agua y los minerales se distribuyen vía xilema; por lo que el sistema de transporte a distancia funciona en coordinación con los distintos procesos fisiológicos que ocurren en órganos específicos y con eventos de desarrollo que se presentan en tejidos meristemáticos como raíces, tallos y flores (Ruiz-Medrano *et al.*, 1999).

## **II.6.2 Transportadores de sacarosa**

### **II.6.2.1 Transporte de sacarosa a distancia: transporte simplástico y apoplástico**

La sacarosa y sus derivados representan la mayor forma de transporte de carbono asimilado fotosintéticamente en las plantas. La sacarosa se sintetiza en las hojas verdes (células mesófilas) y es exportada vía floema, por una red de distribución a distancia para suministrar a los órganos no fotosintéticos de energía y fuentes de carbono. Dicho carbohidrato no sólo funciona como un metabolito de transporte, sino que también dirige las fuerzas osmóticas para la translocación en el floema (flujo másico) y sirve como señal para activar o reprimir genes específicos de diferentes tejidos.

El sistema de transporte a distancia de sacarosa depende de una familia de proteínas que actúan como transportadores de los carbohidratos (Lalonde *et al.*, 1999) y de un conjunto de células especializadas denominadas elementos de la

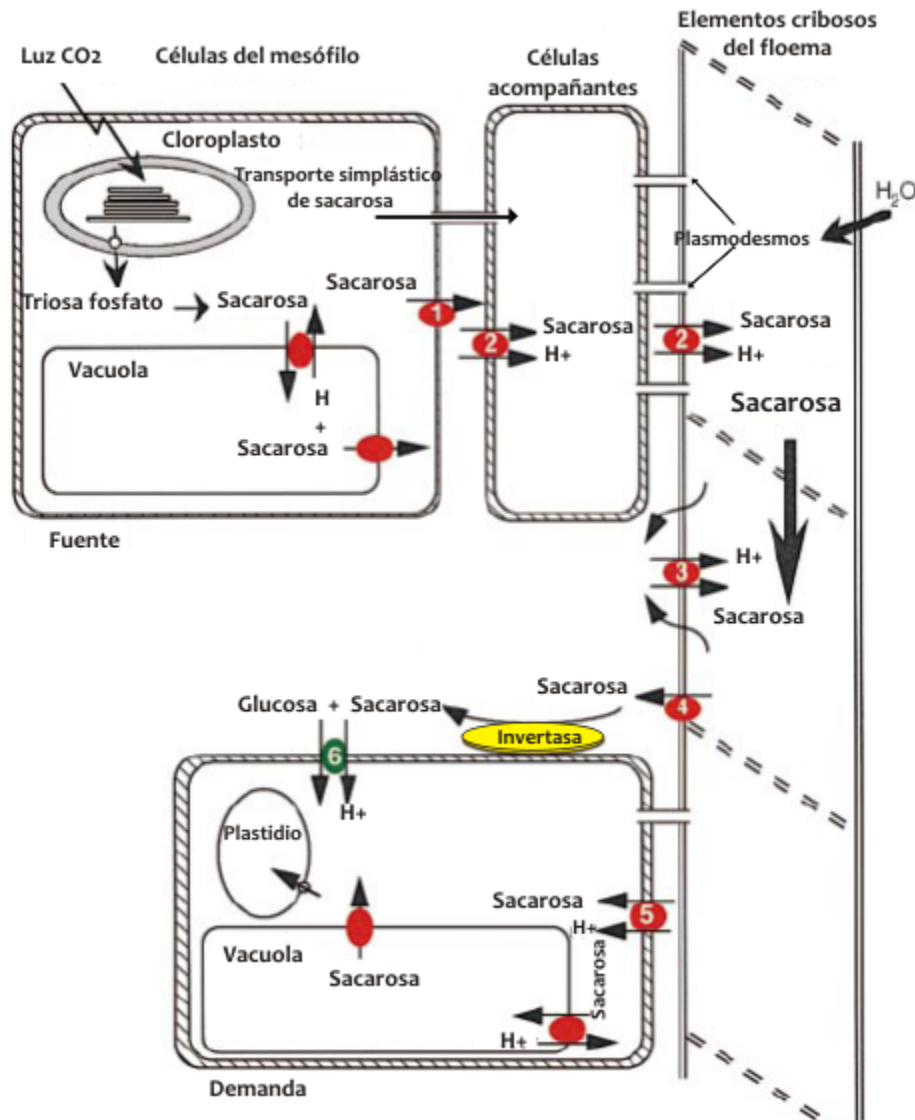


savia (ES) y células acompañantes (CA). Hay dos rutas principales que se conocen para el transporte de solutos en las plantas: el transporte simplástico y el apoplástico (Figura 9; Lalonde *et al.*, 1999).

**El transporte simplástico** se basa en un movimiento del soluto a través de las conexiones denominadas plasmodesmata. Los plasmodesmata son canales que sirven de puente de comunicación y transporte de nutrientes entre células. Se encuentran constituidos por retículo endoplásmico y proteínas, formando un conducto que tiene un diámetro variable y que puede mediar el paso de solutos pequeños como la sacarosa o tan grandes como el RNA de algunos virus. El número y el diámetro de los plasmodesmata pueden variar no solo de planta en planta sino con el estadio del desarrollo o del tejido.

Mientras que en el **transporte apoplástico** el movimiento de solutos de una célula a otra es a través de proteínas localizadas en la membrana plasmática, el soluto es transportado desde los apoplastos e introducidos a las células que los necesitan (Lamberts *et al.*, 2008). El transporte de carbohidratos en específico puede ser llevado a cabo por dos grandes familias de transportadores, los transportadores de sacarosa y los transportadores de hexosas. De los primeros son los que se tiene mayor información.

Es posible que las plantas utilicen diversos mecanismos de descarga en los diferentes tejidos que las constituyen, y que incluso puedan cambiar de un mecanismo apoplástico a un simplástico dependiendo de las condiciones de crecimiento.



**Figura 9.- Transporte a distancia de carbohidratos.-** Desde el punto de síntesis en el mesófilo, la sacarosa puede cargarse en el complejo ESs/CAs, tanto por los plasmodesmata como por la vía apoplástica. El mecanismo apoplástico de llenado requiere la exportación de sacarosa (1) desde el mesófilo hasta la recaptación (2) en el complejo ESs/CAs. La presión hidrostática dirige el movimiento de la savia hacia el tejido demanda. A lo largo del camino pueden presentarse fugas pasivas (flechas onduladas), sin embargo la recaptación también puede ocurrir (3). La descarga apoplásmica del floema requiere de un exportador de sacarosa para el tejido demanda (4). Subsecuentemente, para importar sacarosa y otros solutos hacia el tejido demanda pueden emplearse los plasmodesmata o transportadores de sacarosa (5). Además, la toma por los plasmodesmata y transportadores es mediada por las células demanda que toman la sacarosa, después de que ésta es hidrolizada a hexosas por las invertasas apoplásticas (6). Finalmente, en la vacuola puede efectuarse la toma y liberación de sacarosa por los antiportadores  $H^+$ /sacarosa o uniportadores. CAs = Células acompañantes, ES = Elementos de la Savia (Tomado y adaptado de Lalonde *et al.*, 1999).





### II.6.2.2 Tipos de transportadores de sacarosa

Los transportadores de sacarosa en plantas pueden ser de tres tipos:

- I. **Los transportadores de la membrana plasmática.**- Éstos transportadores son los responsables de la entrada de sacarosa a la célula y son del tipo simportador protón ( $H^+$ )/sacarosa.
- II. **Los transportadores del tonoplasto (transporte vacuolar).**-Se caracterizan por trabajar como un anti portador  $H^+$ /sacarosa, debido a que el interior de la vacuola es más ácida en comparación con el citoplasma.
- III. **Los transportadores de flujo en la membrana plasmática.**- Son los responsables, por ejemplo, de la descarga de sacarosa en los órganos demanda o de la salida de este carbohidrato, desde las células mesófilas al floema. Se ha propuesto como modelo de este tipo de transportadores a los facilitadores o antiportadores (Lemoine, 2000).

#### II.6.2.2.1 Transportadores de la membrana plasmática: Simportadores $H^+$ /sacarosa

La acumulación de sacarosa en el floema es un paso esencial en la compartimentación, ya que produce un gran potencial osmótico, el cual genera presión hidrostática positiva que impulsa el transporte de sacarosa a distancia. Un factor clave en este sistema es la asignación de recursos por el simportador  $H^+$ /sacarosa, el cual transporta la sacarosa dentro del floema en contra de un marcado gradiente de concentración. Las propiedades de transporte y la bioenergética del simportador  $H^+$ /sacarosa, fueron inicialmente descritas en sistemas de tejidos intactos. El simportador  $H^+$ /sacarosa es un transportador activo secundario que permite el paso de la sacarosa a través la membrana plasmática

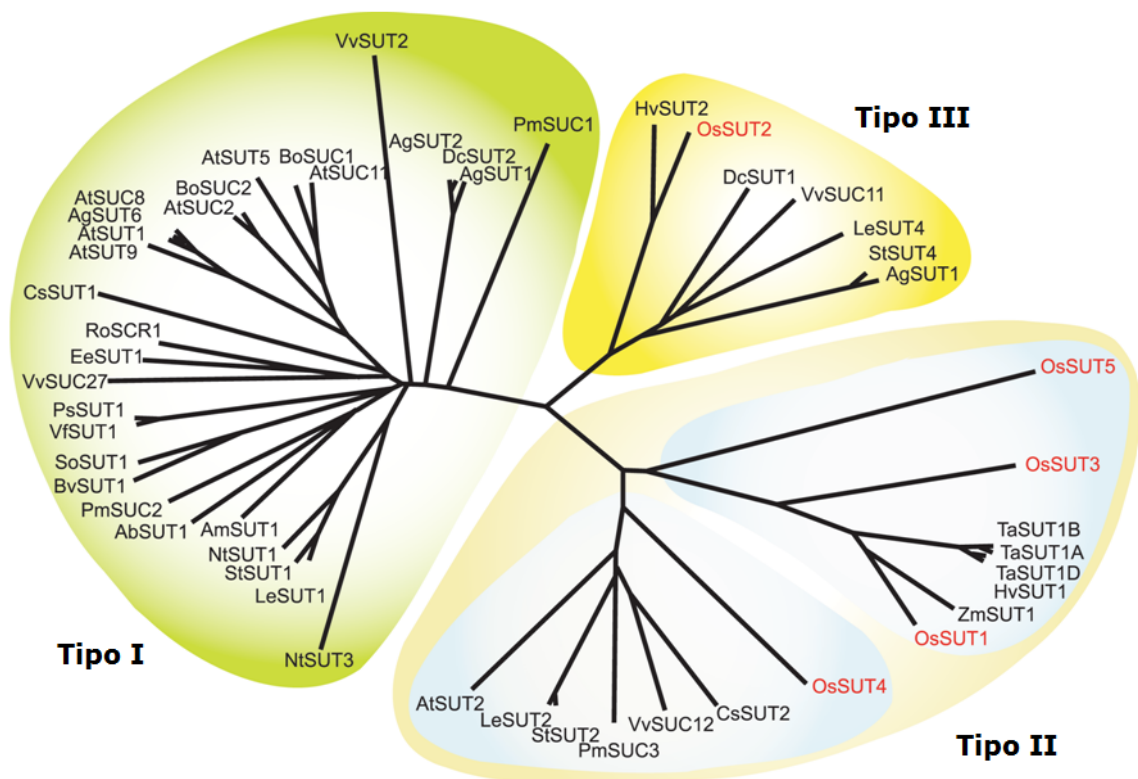


por la fuerza generada por la ATPasa de  $H^+$  (Lu *et al.* 1998), la cual es una importante proteína funcional localizada en la membrana plasmática, que establece un gradiente electroquímico de protones (Liu *et al.*, 2009). El transportador es específico para la sacarosa con una aparente  $K_m$  de 1 a 11 mM. La reacción de transporte es electrogénica y la estequiometría protón: sacarosa es 1:1, sin embargo, dicho simportador puede ser inhibido por diferentes compuestos, como por ejemplo, por el dietil pirocarbonato (DEPC) cuyo mecanismo de inhibición se basa en una modificación química de un residuo de histidina (Lu *et al.*, 1998).

**Clasificación de los transportadores  $H^+$ /Sacarosa (SUTs).**- Los transportadores de carbohidratos en diferentes organismos, incluidos los humanos, las plantas y los hongos, pertenecen a la Superfamilia de facilitadores mayores (MSF de sus siglas en inglés), en donde al menos 69 transportadores homólogos de carbohidratos se han encontrado en *Arabidopsis*, clasificándose en ocho grandes familias: Transportadores de sacarosa (SUC/SUTs), transportadores de hexosas (STP/HXT), transportadores de polioles (PLT), transportadores de *myo*-inositol (ITR/MIT), transportadores plasmáticos de glucosa (pGlcT), proteínas sensoras putativas de monosacáridos (AZT/MSSP), SFP y una no caracterizada familia de transportadores de monosacáridos (Shiratake, 2007).

La familia de SUTs se clasifica con base en la comparación deducida de sus secuencias de aminoácidos, categorizándose dentro de tres grandes grupos (Figura 10): SUT1 (Tipo I), SUT2/SUC3 (Tipo II), y SUT4 (tipo III), clasificación que además refleja su afinidad por el sustrato. Los SUTs tipo I son de alta afinidad/baja capacidad de transporte ( $K_m = 139 \mu M - 1.5 \text{ mM}$ ), los tipo III muestran baja afinidad por sustrato/ alta capacidad de transporte ( $K_m = 5 - 6 \text{ mM}$ ). De acuerdo a la comparación de las secuencias de aminoácidos, los miembros de los SUTs tipo II son inusuales, debido a que poseen una secuencia extendida en el *N*-terminal y en su *loop* (asa) central, en comparación con los otros dos tipos y que se ha sugerido que le dan las propiedades de ser sensor de carbohidratos, por

homología con lo que sucede en levadura, proteína con semejanza estructural a un transportador pero que funciona como receptor de la señal de glucosa. La familia tipo I está presente sólo en las dicotiledóneas, mientras que las familias tipo II y tipo III, se encuentran tanto en dicotiledóneas como monocotiledóneas. Por otro lado, se ha observado que las vías de señalización dependientes de sacarosa, pueden modular en las hojas el transporte de este carbohidrato, lo cual es apoyado por las características de sensor a sacarosa que han mostrado los SUTs tipo II de las dicotiledóneas (Dae Lim *et al.*, 2006).



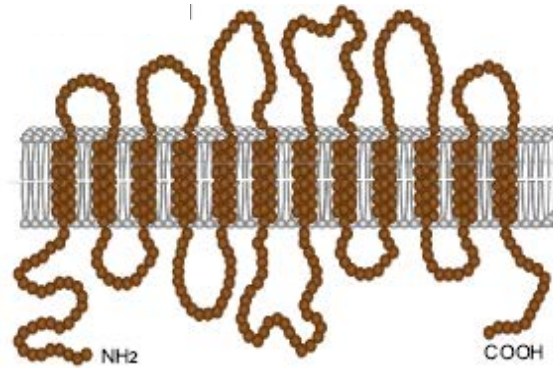
**Figura 10.- Familias de transportadores de sacarosa (SUTs).** Arabidopsis (AtSUC1, AtSUC2, AtSUT2 (AtSUC3)-AJ289165, AtSUT4, AtSUC5, AtSUT6, AtSUT7, AtSUT8, AtSUT9), *Brassica oleracea* (BoSUC1, BoSUC2), *Citrus sinensis* (CsSUT1, CsSUT2), *Beta vulgaris* (BvSUT1), *Euphorbia esula* (AF242307), *Daucus carota* (DcSUT1, DcSUT2), *Hordeum vulgare* (HvSUT1, HvSUT2), *Lycopersicon esculentum* (LeSUT1, LeSUT2-, LeSUT4), *Nicotiana tabacum* (NtSUT1, NtSUT3), *Oryza sativa* (OsSUT1, OsSUT2, OsSUT3, OsSUT4, OsSUT5), *Plantago major* (PmSUC1, PmSUC2, PmSUC3), *Pisum sativum* (PsSUT1), *Ricinus communis* (RCSCR1), *Spinacia oleracea* (SoSUT1), *Solanum tuberosum* (StSUT1, StSUT2, StSUT4), *Triticum aestivum* (TaSUT1A, TaSUT1B, TaSUT1D), *Vicia faba* (VfSUT1), *Vitis vinifera* (VvSUC11, VvSUC12, VvSUC27, VvSUT2), ***Zea mays*** (ZmSUT1), *Asarina barclaiana* (AbSUT1), *Apium graveolens* (AgSUT1, AgSUT2), y *Alonsoa meridionalis* (AmSUT1) (Tomado y adaptado de Dae Lim *et al.*, 2006).



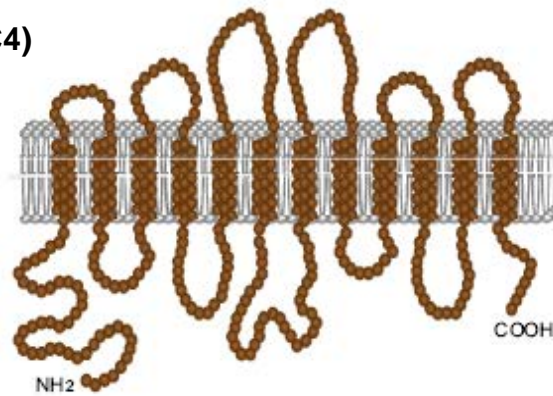
**Localización Celular de SUTs.-** Se ha considerado que la familia SUC/SUT se localiza en la membrana plasmática. En plantas, la vacuola es el organelo más importante de almacenamiento de sacarosa, no obstante algunos organelos y tejidos especializados pueden almacenar también éste carbohidrato. Aunque la mayoría de los transportadores son altamente conservados en su estructura primaria, su localización celular puede variar dependiendo de las especies y los órganos, pues por ejemplo, PmSUC2 (*Plantago major*) se localiza predominantemente en las células acompañantes del floema, mientras que LeSUT1 (*Lycopersicon esculentum*) se haya principalmente en los elementos amorfos de la savia (Dae Lim *et al.*, 2006; Shiratake, 2007).

**Topología de los SUTs.-** La familias SUC/SUT presentan estructuras típicas de las MSF, como son los 12 dominios o cruces transmembranales y 11 asas (Figura 11), mientras que el N- y el C- terminal se localizan en el citosol. Como se mencionó anteriormente, la familia tipo II difiere de las otras dos familias en las estructuras de su gen y proteína, ya que con excepción del arroz, posee un dominio extendido en el loop central (cerca de 50 aminoácidos más grande que las otras familias) y un N-terminal de alrededor de 30 aminoácidos más grande (Shiratake, 2007). El transportador de sacarosa de maíz se encuentra incluido dentro de esta subfamilia.

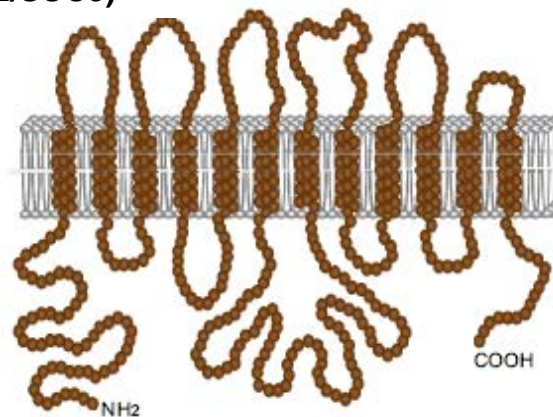
**Tipo I (SU1)**



**Tipo III (SUC4)**



**Tipo II (SUT2/SUC3)**



**Figura 11.- Topologías de los transportadores de los tres grupos de la familia SUT**  
(Tomado y adaptado de Shiratake, 2007).



### II.6.2.2.2 Transportadores de flujo en la membrana plasmática.

Hasta el momento se ha encontrado una enorme diversidad (isoformas) de transportadores de sacarosa en plantas, todos ellos clasificados como simportadores, por lo que se ha sugerido que el simportador podría funcionar *in vivo* como un transportador difusional de salida (Gómez-Calderas, 2008). En teoría el flujo de sacarosa puede ocurrir por un sistema antiporte de protones, pero la dirección del gradiente de concentración de sacarosa (concentración alta en la célula vs. concentración baja en apoplasto), no está a favor de un flujo energizado (Lemoine, 2000). Algunos resultados experimentales demuestran la posibilidad de que el transporte de sacarosa ocurre en ausencia de un gradiente de protones, en el 2005 se demostró que el transportador de sacarosa de maíz colocado en ovocitos de *Xenopus* era capaz de exportar la sacarosa (Carpaneto *et al.*, 2005).

### II.6.3 Transportadores de monosacáridos.

Mientras que la sacarosa es la forma más importante de transporte a distancia de azúcares en el floema, el transporte de monosacáridos juega un papel importante en los cambios intracelulares en los tejidos fuente y demanda. La glucosa y la fructuosa son fácilmente sintetizados desde los productos primarios de la fotosíntesis que han sido asimilados (Delrot *et al.* 2001). Por largo tiempo se asumió que cada planta sólo tenía un transportador de sacarosa y uno para monosacáridos. Sin embargo, después del aislamiento de la primera proteína transportadora de carbohidratos (AtSPT1) de plantas superiores usando el gen *HUP1* del alga unicelular *Chlorella kessleri* como sonda (Büttner, 2007), se obtuvo evidencia definitiva de la presencia de más de un gen para el transportador y que el mecanismo de transporte dependía de un gradiente electroquímico, asumiendo que el transportador es del tipo  $H^+$ /glucosa. Hoy en día varios transportadores de monosacáridos se han clonado de diferentes plantas como *Arabidopsis*, tabaco, tomate, uvas, entre otras; expresándose funcionalmente en *S.cerevisiae* y ovocitos de *Xenopus* (Delrot *et al.*, 2001). Los patrones de expresión de varios transportadores de monosacáridos, sugieren que estas proteínas de membrana



funcionan en la toma de hexosas en los tejidos demanda. El análisis de su expresión muestra que los transportadores de monosacáridos en plantas son altamente regulados, como en respuesta a la infección por patógenos o después de una herida, lo que permite una reasignación del carbono fijado (Lalonde *et al.* 1999).

### II.6.3.1 Clasificación de los transportadores de monosacáridos MST(-like)

Los transportadores de monosacáridos, transportadores MST(-like), se pueden agrupar en las siguientes subfamilias de genes que los codifican : STP, proteínas que transportan hexosas y en algunos casos pentosas; VGT transportadores vacuolares de glucosa; TMT, transporte tonoplástico de monosacáridos; pGlcT, transporte plasmático de glucosa; SGB1, supresor de proteína G beta 1; PLT, transportador de polioles; INT, transportador de inositol, ERD6-like, proteínas de respuesta temprana a la deshidratación (Büttner, 2007).

### II.6.4 Transportadores de carbohidratos en las interacciones planta-patógeno.

Se encuentran pocos ejemplos sobre el efecto de los patógenos sobre los transportadores de carbohidratos, como por ejemplo el caso del transportador AtSTP4 (MST) que fue inducido aproximadamente cuatro veces en plántulas de *Arabidopsis* que fueron infectadas con *Alternaria brassicicola* o por *Fusarium oxysporum*. Los autores proponen a AtSTP4 como un transportador de monosacáridos que responde al estrés modificando el flujo de carbono en la célula demanda. La inducción de la expresión de AtSTP4 (MST) también fue observada durante la interacción biotrófica entre *Arabidopsis* infectada por *Eryphe cichoracearu*, la expresión de AtSTP4 fue inducida dramáticamente en las hojas fuente que fueron infectadas por el moho, además de que el hongo fue confinado en las células epidermales de la hoja. En uva se encontró que el gen para el



transportador VvHT5 se induce, y de manera paralela también la invertasa apoplástica, además se encontró que existe una correlación positiva entre el contenido de carbohidratos y el transportador de hexosas (Haves *et al.*, 2010). Interesantemente el transportador VvHT5 parece responder a ABA y en general aumenta en presencia de otros tipos de estrés, por lo que los autores sugieren que ABA podría ser la molécula clave en la regulación del transportador VvHT5 cuando la planta se somete a diferentes tipos de estrés (Haves *et al.*, 2010).

Las vías de señalización que son afectadas cuando ocurren la infección son desconocidas, y el papel central de los transportadores en estas interacciones no es claro, sin embargo se sugiere que el incremento en la actividad de los transportadores aumenta la importación de carbohidratos hacia los tejidos infectados, con el fin de hacer frente al aumento en la demanda relacionada con los mecanismo de defensa, o para recuperar los azúcares desde el apoplasto (particularmente si la célula hospedera aumenta su permeabilidad) y así reducir la pérdida de carbohidratos por el patógeno (Williams *et al.*, 2000). Por lo que el estudio del efecto del patógeno en los transportadores de carbohidratos contribuye al entendimiento en las vías de señalización que afectan la distribución del carbono en situaciones de estrés.





### III.JUSTIFICACIÓN

En el maíz se ha encontrado que existe un único transportador de sacarosa, denominado **ZmSUT1**, dicho transportador presenta una influencia importante en el cargado del floema, ya que la supresión del gen produce un aumento en la concentración de sacarosa en la hoja, reduce el número de raíces y el crecimiento en general de la planta está disminuido (Slewiniski *et al.*, 2009). Adicionalmente, el transportador ZmSUT1 es un transportador que tiene la capacidad de funcionar como simportador con protones concentrando sacarosa en las células, así como también de ser capaz de transportar a la sacarosa en eflujo (Carpaneto *et al.*, 2005). Trabajo anterior en el laboratorio mostró que sólo los escutelos y no los ejes embrionarios contienen al transportador de sacarosa (Gómez-Calderas, 2008), lo cual es interesante, ya que los escutelos tienen las enzimas encargadas de sintetizar sacarosa a partir de los lípidos abundantes en este tejido (Luna-Löaiza, 2010); sin embargo, la sacarosa sintetizada no es para uso exclusivo del escutelo sino para exportarla al eje embrionario en crecimiento (Zavala-Zendejas, 2001). Si bien el eje embrionario no contiene al transportador de sacarosa si tiene una alta actividad de invertasas en sus apoplastos (Martínez-Marcelo, 2008), por lo que el carbono que proviene de la sacarosa es convertido a hexosas para nutrir al eje embrionario, que contiene transportadores de hexosas, mismos que han sido detectados con anticuerpos (Ramírez-Verdejo, 2009).

Hay que señalar que a la fecha no hay en la literatura ningún transportador de hexosas reportado en maíz, y el transcrito que se analizó en este trabajo corresponde al del gen de un transportador putativo de hexosas que fue encontrado en el banco de EST de endospermos de maíz y que en un trabajo previo fue localizado en los embriones de maíz, encontrándose que el transcrito se expresa con un nivel mayor al que hay en las hojas (Gómez-Calderas, 2008). La expresión del gen de este transportador putativo de hexosas se altera cuando el contenido de carbohidratos del medio fue modificado. El análisis de la secuencia traducida del gen mostró una gran similitud con los transportadores de hexosas de plantas (Gómez-Calderas, 2008). Sin embargo, hasta que no sea expresada la



proteína producto de este gen en un sistema heterólogo de expresión y se realice la actividad de transporte de hexosas, le llamaremos transportador putativo de hexosas, ZmHT.

De lo anterior resulta interesante encontrar cuál es el mecanismo que regula la expresión de los transportadores de carbohidratos en ciertos tejidos y bajo circunstancias ambientales que naturalmente percibirá la planta. Uno de los factores ambientales con los que se puede enfrentar la semilla es la presencia de patógenos fúngicos. Si bien se conoce que la presencia de algunos patógenos en maíz puede afectar el metabolismo de la planta, como por ejemplo llevar a un aumento en la cantidad de carbohidratos importados a los tejidos infectados y su disminución en el resto de la planta (Isaac, 1992), es necesario encontrar a nivel molecular si la regulación de sus transportadores es lo que modifica la distribución de los contenidos de carbohidratos y por tanto la función de las células infectadas.

Por lo que el presente trabajo se enfoca en determinar y evaluar el efecto que *Fusarium verticillioides* produce sobre la germinación de embriones de maíz, fase crítica y fundamental en el desarrollo de la planta de maíz que decide la viabilidad o la pérdida del cultivo, además de que se centra en la caracterización de la influencia del hongo sobre los cambios metabólicos del embrión de maíz, como son la variación en la tasa de respiración, el contenido de carbohidratos y el perfil de expresión de los transportadores de carbohidratos como ZmHT y ZmSUT. Éste es un primer estudio sobre la regulación de los transportadores de sacarosa y de hexosas de maíz bajo la presencia de un patógeno, como un modelo para conocer los efectos ambientales en la movilización de carbono y los probables mecanismos de su regulación a través de la expresión de los transportadores de carbohidratos.



#### IV. HIPÓTESIS

*Fusarium verticillioides* es un común y agresivo invasor del maíz, que necrosa el tejido vegetal, modifica el balance hídrico, incrementa la tasa de respiración y altera la movilización de carbohidratos en los tejidos infectados de maíz, por tanto es de esperarse que el perfil de expresión de los transportadores de carbohidratos en embriones de maíz a nivel de RNAm se vea modificado en presencia del patógeno y coincida con cambios en el contenido de carbohidratos.



## V. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto del patógeno *Fusarium verticillioides* en el perfil de expresión de dos transportadores de carbohidratos de embriones de maíz a nivel de RNAm, el transportador putativo de hexosas, ZmHT, y el transportador de sacarosa, ZmSUT.

## VI. OBJETIVOS PARTICULARES

**1. Evaluar el efecto fisiológico que *Fusarium verticillioides* produce en los embriones de maíz, mediante las siguientes determinaciones:**

- a) Obtención de la curva de germinación de embriones infectados con *Fusarium verticillioides*.
- b) Medición del consumo de oxígeno en embriones infectados y sin infectar durante el proceso de germinación del maíz.
- c) Cuantificación de carbohidratos solubles (glucosa, fructuosa y sacarosa) de embriones de maíz infectados con el hongo y de embriones no infectados a diferentes tiempos de germinación.

**2. Medir el efecto de *Fusarium verticillioides* en los niveles de transportadores de carbohidratos.**

- a) Obtención de RNA de los embriones de maíz expuestos al patógeno durante diferentes tiempos.
- b) Amplificación específica del RNAm para el transportador de sacarosa ZmSUT1 del RNA de los embriones del punto a).
- c) Amplificación específica del RNAm para el transportador putativo de hexosas ZmHT del RNA de los embriones del punto a).
- d) Comparación de los niveles de transportadores de carbohidratos con los niveles de carbohidratos detectados durante los diferentes tiempos de infección con el patógeno o sin infectar.



## VII. MATERIALES Y MÉTODOS

### VII.1 Esquema General de Trabajo

A continuación se esquematiza la metodología experimental que se efectuó a lo largo de presente trabajo (Figura 12), en la cual todas las técnicas empleadas parten de un mismo material biológico, embriones de maíz infectados con *Fusarium verticillioides* y no infectados (control), cada una de las determinaciones se realizaron al menos en dos lotes distintos de embriones y por triplicado cada uno. La cepa empleada de *Fusarium verticillioides* fue proporcionada por el Dr. Francisco Javier Plasencia de la Parra.

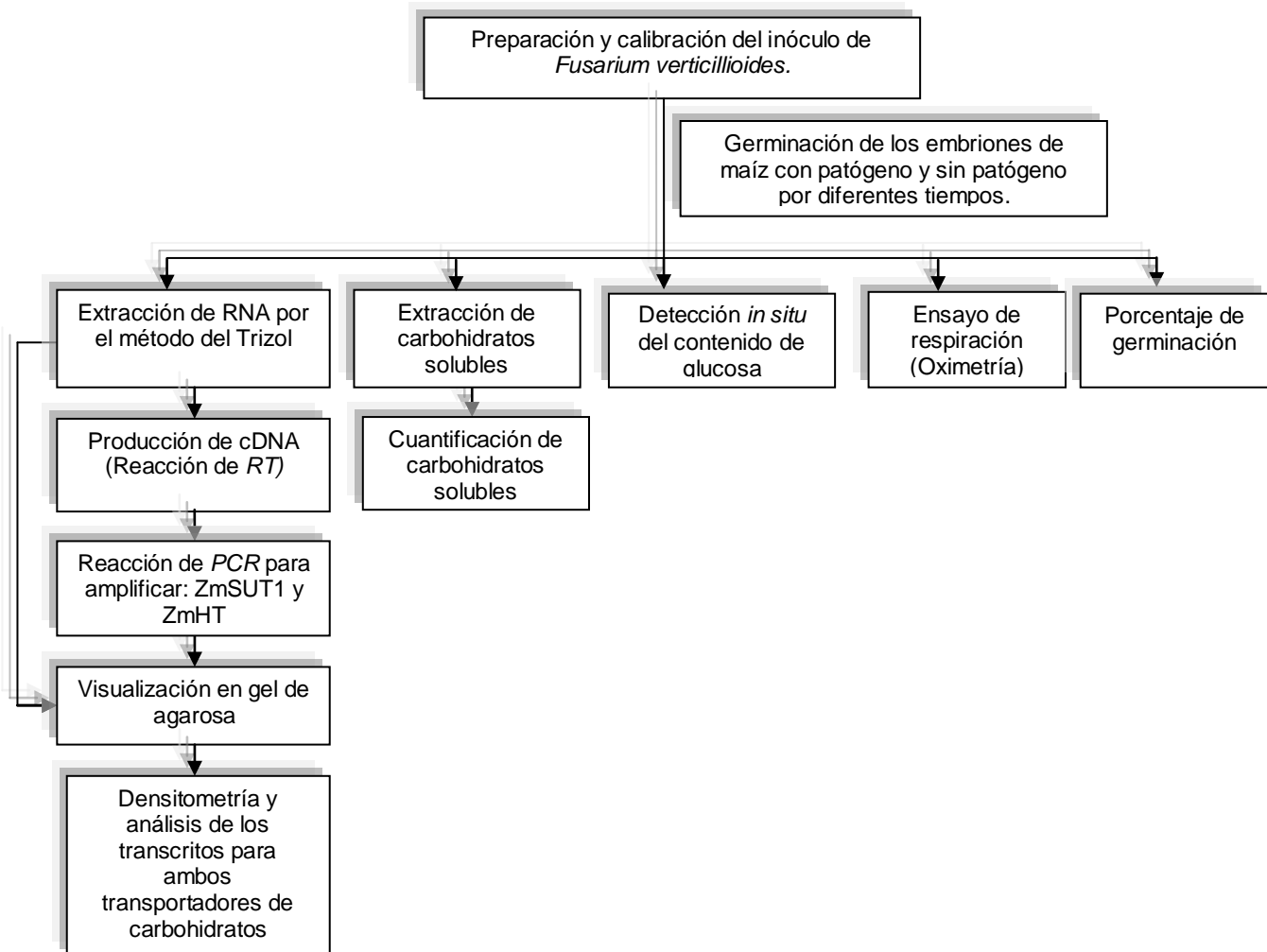


Figura 12.- Esquema general de trabajo realizado.



## VII.2 Preparación y calibración del inóculo de *Fusarium verticillioides*

En condiciones de esterilidad, se agregaron 5.0 mL de agua estéril desionizada a un cultivo de *Fusarium verticillioides* de dos semana de crecimiento, el cual se encontraba en una caja petri con Papa Dextrosa Agar (PDA) al 0.5X. Posteriormente, dicha caja se colocó en agitación constante y moderada por 30 min a temperatura ambiente. Después se recolectó la “suspensión de conidios” en tubos eppendorf estériles de 1.5 mL. Posteriormente se centrifugo a 13000 rpm, por un lapso de 15 min a 4°C en una centrífuga Universal 320 R Heittich Zentrifugen.

Se desecharon las tres cuartas partes del sobrenadante y se resuspendieron los botones obtenidos, se juntaron las suspensiones de los botones en un solo tubo eppendorf aforándolo a 1.5 mL. Nuevamente, se centrifugó a 13000 rpm por 15 min a 4°C, se desechó el sobrenadante y se resuspendió el botón en 1.0 mL de agua estéril desionizada, obteniéndose así una *suspensión concentrada de conidios*. En un tubo eppendorf, *no estéril* de 1.5 mL, se agregaron 990.0  $\mu$ L del agua estéril desionizada y 10.0  $\mu$ L de la suspensión concentrada de conidios, dilución 1:100, de la cual se tomaron 10.0  $\mu$ L para cargar la Cámara de Neubauer (véase Anexo III: Fórmulas y Cálculos) y realizar el conteo de conidios en cada uno de los cuadrantes con el microscopio óptico Olympus CH30. Con los datos obtenidos del conteo, se calculó el volumen necesario de la suspensión concentrada de conidios que se necesitaba para preparar un inóculo de 6500 conidios/ $\mu$ L. Finalmente, para mantener al patógeno, se sembraron 10  $\mu$ L de la suspensión concentrada de conidios en cajas petri con PDA 0.5X, y todo el material que estuvo en contacto con el hongo se dejó en hipoclorito de sodio comercial por una noche.



### VII.3 Germinación de los embriones de maíz en presencia o ausencia de patógeno

**Extracción y desinfección de embriones.-** Se obtuvieron embriones de maíz (*Zea mays var. Chalqueño*) por disección manual, posteriormente se lavaron con una solución de hipoclorito de sodio al 2.0% por 2 min, y se enjuagaron al menos 5 veces con 200 mL de agua estéril desionizada, hasta que el olor del hipoclorito de sodio desapareció.

**Germinación.-** Se colocaron de 12 a 15 embriones en cajas petri con Agar al 1.0%, se incubaron a 29°C en oscuridad por 8,12,18,24,36 y 48 h (tratamientos control), utilizando para ello la incubadora Incubator Lab-Line. Para la germinación de embriones de maíz con el patógeno *Fusarium verticillioides* (tratamiento con patógeno), se repitió el procedimiento antes descrito, salvo que antes de incubarse, a cada embrión se le inoculó con 10µL de la suspensión de conidios calibrada anteriormente (6500 conidios/µL), ya que se requiere que cada embrión sea infectado por 65000 conidios aproximadamente. Pasado el tiempo de germinación correspondiente, los embriones tratados se almacenaron a -70°C hasta su uso.

### VII.4 Porcentaje de germinación

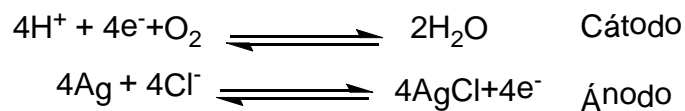
Se colocaron 25 embriones en una caja petri con Agar al 1%, y se incubaron a 29°C en oscuridad por 48 h continuas, monitoreando el número de embriones que habían germinado a las 8, 12, 18, 24, 36 y 48 h, para lo cual se realizó una inspección visual en busca de la radícula que nos indicase el fin de la germinación. Este procedimiento se repitió para los embriones infectados por el patógeno en estudio.



## VII.5 Ensayo de respiración (oximetría)

**Fundamento.-** Los embriones de maíz muestran una escasa actividad respiratoria, aumentando el consumo de O<sub>2</sub> después de iniciada la imbibición, dicho consumo de O<sub>2</sub> puede ser medido utilizando un electrodo tipo Clark, el cual consiste en un cátodo de platino rodeado por un ánodo de plata inmersos en una solución saturada de KCl, y separados del exterior por una membrada de teflón permeable al oxígeno.

La reacción redox que ocurre es:



Así, 4 moléculas de oxígeno son reducidas por 4 electrones que fluyen en el circuito. Como el O<sub>2</sub> es eliminado en el cátodo, un gradiente pO<sub>2</sub> se extiende al exterior a lo largo del medio circundante, así el tamaño de la señal generada por el electrodo es proporcional al flujo de las moléculas de oxígeno en el cátodo. (Warner Instruments, 2010).

**Técnica.-**Para este ensayo los embriones de maíz infectados con *Fusarium verticillioides* y los no infectados (controles) se germinaron tal y como se describió anteriormente, sin embargo **no** se almacenaron a -72°C, sino que se utilizaron inmediatamente después de cumplir su periodo de germinación (el número de embriones empleados en cada periodo de germinación fue diferente). Posteriormente se midió el consumo de oxígeno en un vaso de vidrio que contenía 5.0 mL de agua y utilizando un electrodo tipo Clark conectado a un oxímetro 5300 A Oxygenmonitor. La medición se realizó por 4 min a una velocidad de 10. Finalmente se analizó el registro gráfico y se obtuvo el consumo de O<sub>2</sub> a partir de la ecuación 1 (véase *Anexo III: Fórmulas y Cálculos*):





Ecuación 1:

$$\text{Consumo de O}_2 = \frac{(1200 \text{ nanoátomos de O}_2)(60\text{min})(\epsilon)}{(20\text{cm})(1\text{h})(1\text{min})(\text{Número de embriones})}$$

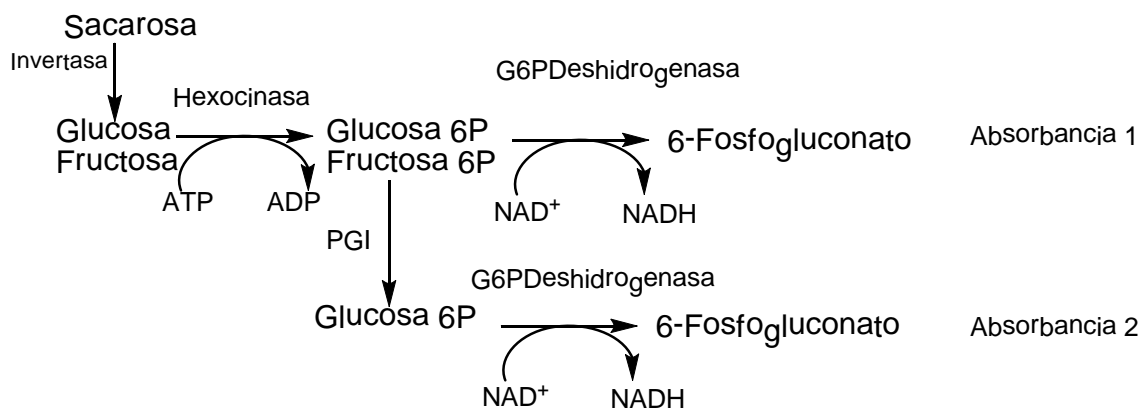
En donde:

1200 nanoátomos/20 cm = Corresponden al número de nanoátomos de O<sub>2</sub> en 20 cm de la escala del papel graficador.

$\epsilon$  = La distancia en cm que se obtiene en la pendiente de trazo problema y que corresponde al número de nanoátomos de O<sub>2</sub> consumidos por el embrión en 1 min (véase *Anexo III: Fórmulas y Cálculos*).

## VII.6 Extracción y cuantificación de carbohidratos solubles

**Fundamento.-** Los carbohidratos son moléculas orgánicas constituidas de carbono, oxígeno e hidrógeno, sus estructuras se distinguen principalmente por la orientación de sus grupos hidroxilo (-OH), lo cual les da sus características químicas y bioquímicas tales como la solubilidad (Wade, 2004). En este ensayo se utilizó el reactivo de Ensayo de Glucosa SIGMA, el cual se basa en la siguiente reacción (Figura 13):



**Figura 13.- Cadena de reacciones involucradas en la técnica enzimática para determinar carbohidratos solubles.**

Donde la glucosa es fosforilada por el adenosin trifosfato (ATP) en la reacción catalizada por la hexocinasa. Luego la glucosa-6-fosfato es oxidada a 6-



fosfogluconato en presencia del dinucleótido de nicotinamida adenina ( $\text{NAD}^+$ ), en una reacción catalizada por la glucosa-6-fosfatodeshidrogenasa (G6P Deshidrogenasa). Durante esta oxidación, una cantidad equimolar de  $\text{NAD}^+$  es reducida a NADH. La formación de NADH produce un incremento en la absorbencia a 340nm, que es directamente proporcional a la concentración de glucosa (Sigma, 2010).

**Técnica.-** En un mortero limpio se colocaron 5 embriones de maíz, se molieron con  $\text{N}_2$  líquido hasta obtener un polvo fino. De éste tejido molido se pesaron 0.2 g y se le adicionó 1.0 mL de etanol 80% (v/v) a 70°C, posteriormente se le agregó 1.0 mL de agua en ebullición para realizar la extracción. Se transfirió el extracto a un tubo eppendorf y se centrifugó a 3500 rpm por 10 min. Pasado el tiempo, el sobrenadante se transfirió a un tubo de ensaye y se colocó en un bloque de calentamiento a 60°C durante dos o tres días, para evaporar la mezcla de etanol-agua. Una vez evaporada la mezcla de extracción, la muestra se reconstituyó con 300  $\mu\text{L}$  de agua desionizada estéril y se determinaron los niveles de glucosa, fructosa y sacarosa mediante la técnica enzimática. Este procedimiento se repitió para cada tratamiento (embriones con patógeno y sin patógeno).

**Glucosa y fructuosa.-** La cuantificación de fructuosa y glucosa se realizó en una placa de Elisa. Se colocó la muestra problema (máximo 12  $\mu\text{L}$ ) en un pozo de la placa, agregándole agua desionizada c.b.p 12  $\mu\text{L}$  y se le adicionó 200  $\mu\text{L}$  del reactivo de ensayo de glucosa, el cual consta de ATP 1.0 mM,  $\text{NAD}^+$  1.5 mM, hexocinasa 1.0 U/mL, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa 1.0 mM, y se incubó a 25°C por 20 min; pasado este tiempo se leyó la absorbancia a 340nm, obteniéndose un valor que es directamente proporcional a la concentración de la glucosa en la muestra. Posteriormente, para determinar la concentración fructuosa se le añadió al mismo pozo 2  $\mu\text{L}$  de glucosa 6P isomerasa (PGI) a una concentración de 1.2 U/mL, la cual cataliza la conversión de fructosa 6P que no reaccionó en el paso anterior a glucosa 6P. Se mezcló e incubó por 5 min y se leyó la segunda absorbancia. La diferencia entre la segunda absorbancia con la



primera lectura, corresponde a la concentración de fructosa. Para calcular el contenido de la hexosa en mg/g de tejido se empleó la ecuación 2 (véase Anexo III: Fórmulas y Cálculos).

**Sacarosa.-** La determinación de la sacarosa se realizó por una hidrólisis en medio ácido de la sacarosa de la muestra (12  $\mu\text{L}$  máximo), adicionando 4  $\mu\text{L}$  de invertasa de levadura de SIGMA a una concentración de 80 mg/mL disuelta en acetato de magnesio 100mM a pH de 4.5, se incubó por 2 h a 37°C en una incubadora Mini Incubator BioRad y se determinó el contenido de glucosa como se describió anteriormente, ya que es proporcional a la concentración de sacarosa.

Las determinaciones de glucosa, fructuosa y sacarosa, tanto para los controles como para la muestras con patógeno se realizaron por cuadruplicado, variando el volumen de la muestra problema que se empleó. Así mismo, se realizó una curva a partir de una mol.

Ecuación 2

$$\text{Glucosa } X = \frac{(\text{Abs}_m - \text{Abs}_b)(0.00614)(\text{Fd})(\text{Vol}_{\text{susp}})}{(\text{Vol}_{\text{muestra}})(\text{g}_{\text{tejido}})} = \text{mg/g}_{\text{tejido}}$$

Donde:

$\text{Abs}_m$  = absorbancia de la muestra

$\text{Abs}_b$  = absorbancia del blanco

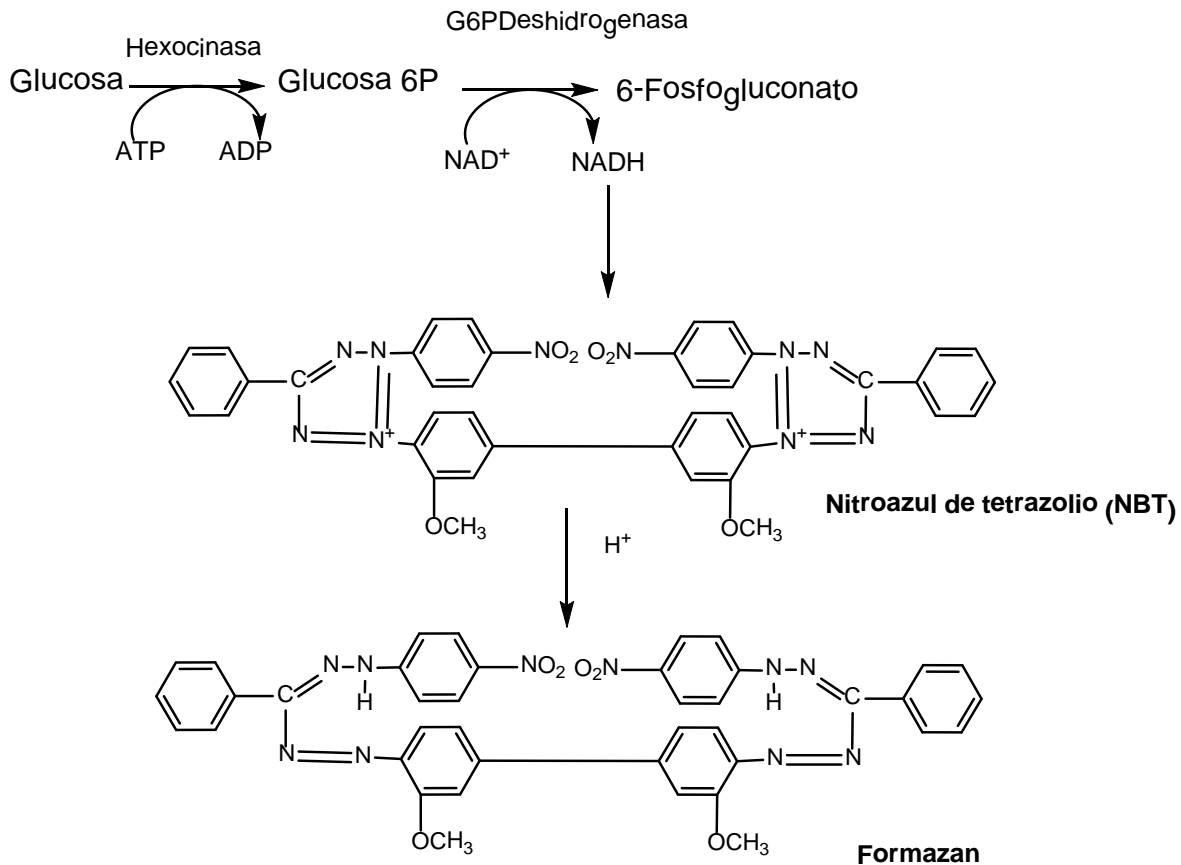
Fd = Factor de dilución

$\text{Vol}_{\text{susp}}$  = Volumen de la suspensión (en este caso 300  $\mu\text{L}$ )

$\text{Vol}_{\text{muestra}}$  = Volumen empleado de la muestra problema.

## VII.7 Detección *in situ* de la glucosa en los embriones de maíz

**Fundamento.-** El nitroazul de tetrazolio (NBT) es probablemente la más común de las sales de tetrazolio usadas por las enzimas deshidrogenasas en la histoquímica (Figura 14), debido a que precipitan en formazan, la enzima remueve hidrógenos del sustrato y los transfiere a un aceptor de hidrógenos, usualmente una coenzima, que a su vez lo transfiere al tetrazolio, el cual es consecuentemente reducido en un colorido e insoluble compuesto de formazan (Primurlyn, 2010).



**Figura 14.-Reacción de reducción del NBT por protones.** La glucosa se detectó realizando un ensayo acoplado a la reducción del NBT. El precipitado que se forma es la sal de formazan.

### **Técnica**

**Fijación.-** Se colocaron dos embriones de maíz en un tubo eppenforf de 1.5 mL, posteriormente se les adicionó 1.0 mL de una solución compuesta por



paraformaldehído al 2%, polivinilpirrolidona-40 al 2% y DTT 1 mM, luego se centrifugaron a 4000 rpm por h, al cabo de este tiempo, se desecho el sobrenadante, se lavó con 1.0 mL de agua destilada centrifugando por 5 min, y se repitieron estos lavados 4 veces más. Al final del último lavado, nuevamente se desechó el sobrenadante y se almacenaron los embriones ya fijados toda la noche a 4°C (Baud y Graham, 2006).

**Detección y registro.-** Una vez fijados los embriones de maíz se colocaron nuevamente 2 de ellos en un tubo eppendorf de 1.5 mL, se les agregó 987.7 µL del reactivo de ensayo de glucosa y 12.3 µL de NBT 30 mM para tenerlo a una concentración de 0.37 mM. Se agitaron por inmersión brevemente e inmediatamente después se sacaron de la solución para tomarles una fotografía digital con el microscopio estereoscópico Motic Microscopes. Posteriormente se regresaron a la solución, y se realizó un monitoreo visual y gráfico cada 10 min por 1 h, en todos los casos se tomaron fotografías.

Se repitió este ensayo para cada tratamiento, tanto para el control como para los embriones de maíz infectados con el hongo. El ensayo se realizó en dos ensayos por duplicado cada uno.

### **VII.8 Extracción de RNA, reacción de RT-PCR y densitometría.**

**Fundamento.-** En la extracción de RNA se utilizó el reactivo de Trizol, que está constituido por una solución monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina, en la cual los tejidos se rompen debido a la homogeneización en la solución de desnaturizante que libera el RNA e inactiva ribonucleasas. El RNA total es entonces purificado selectivamente lejos de proteínas, mientras que el DNA y otros contaminantes son extraídos por ácidos orgánicos. El Fenol; Cloroformo: Alcohol isoamílico, que también es empleado durante la extracción de RNA, remueve contaminantes por extracción ácida con el fenol, donde el DNA y una porción de las proteínas quedan en la fase orgánica, mientras que el RNA



permanece en la fase acuosa, y es concentrado por precipitación debida al isopropanol, para posteriormente lavarse con etanol (Barrón, 1997).

**Técnica de Extracción de RNA.-** En un mortero libre de RNAasas (véase Anexo II: Preparación de Material y Recomendaciones) y trabajando en condiciones de esterilidad, se colocaron 5 embriones de maíz de un tratamiento, posteriormente se pulverizaron con N<sub>2</sub> líquido hasta obtener un polvo fino, del cual se pesaron 100 mg y se colocaron en un tubo eppendorf estéril de 2.0 mL (previamente enfriado en N<sub>2</sub> líquido). A éste tubo se le agregó 1.0 mL del reactivo de Trizol y se agitó por inversión hasta obtener una pasta homogénea. El tubo con la muestra se incubó a temperatura ambiente por 5 min, al cabo de este tiempo se centrifugó a 13000 rpm durante 10 min a 4°C. El sobrenadante se transfirió a otro tubo de 2.0 mL previamente frío, se le agregó 200 µL de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) y se agitó por inversión durante 15 s, luego de centrifugarlo a 13000 rpm durante 10 min a 4°C, la fase acuosa resultante se colocó en otro tubo de 2.0 mL previamente frío, se le añadió 200 µL de CHCl<sub>3</sub> y se incubó por 5 min a temperatura ambiente, subsecuentemente se centrifugó a 13000 rpm a 4°C por 10 min. El sobrenadante se transfirió a un tubo eppendorf de 2.0 mL (previamente frío), al cual se le agregaron 500µL de isopropanol, se agitó por inversión, se incubó por 10 min a temperatura ambiente y se centrifugó bajo las mismas condiciones antes descritas. El sobrenadante se decantó, y el botón se dejó secar durante 1 min, después se lavó con 1.0 mL de Etanol al 75% golpeando suavemente el tubo (El botón no se resuspende). Posteriormente, se centrifugó a 13000 rpm durante 5 min a 4°C, al finalizar el tiempo se descartó el sobrenadante y dejando destapado el tubo, el botón se secó a temperatura ambiente durante 15 min, finalmente el botón se resuspendió en 100.0 µL de H<sub>2</sub>O-DEPC, y se almacenó la muestra de RNA total a -70°C.

**Visualización del RNA en gel de agarosa.-** Una vez que se extrajo el RNA de todas las muestras, se colocaron 5 µL de RNA en tubo eppendorf de 1.5 mL, se le agregaron 45 µL de agua estéril desionizada, para tener así una dilución 1:10,



posteriormente la dilución se transfirió a una celda de cuarzo de 1.0 cm de paso óptico, y utilizando un espectrofotómetro se leyeron las absorbancia a 260 nm y a 280 nm, ya que los ácidos nucleicos tienen su máximo de absorción a 260 nm mientras que las proteínas lo tienen a 280 nm; por lo tanto, la relación entre ambas absorbancias ( $A_{260/280}$ ) proporciona el grado de pureza de la preparación, valores con relaciones mayores a 1.6 muestran una preparación con pureza aceptable. Posteriormente, se calculó el volumen de RNA total extraído que era necesario para tener 1  $\mu\text{g}$  de RNA, partiendo de la relación de que 1 unidad de absorbancia equivale a 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de RNA (véase *Anexo III: Fórmulas y Cálculos*). Se preparó un gel de agarosa al 1.0% con buffer TBE (Tris-Borato-EDTA) 1X y bromuro de etidio 0.5  $\mu\text{L}/\text{mL}$ , a este gel se le cargó la muestra que contenía la cantidad de RNA calculada, 2  $\mu\text{L}$  de buffer de carga y  $\text{H}_2\text{O-DEPC}$  c.b.p. 15  $\mu\text{L}$ ; para así poder correrlo en una cámara de electroforesis BIORAD Mini Sub Cell GT con buffer TBE 1X frío, a 90 mV (fuente Hoeffer EPS2A200) por 45 min. Una vez concluido el tiempo de corrida, el gel se visualizó en un transiluminador de UV y posteriormente las imágenes fueron capturadas con el equipo Fluor-STM Multilmager (Bio-Rad).

### **Reacción de RT-PCR (Transcriptasa Reversa - Reacción en cadena de la polimerasa)**

**Fundamento RT.-** La transcriptasa reversa es una enzima que tiene como función sintetizar una molécula de doble cadena (DNA) a partir de una molécula de cadena sencilla (RNA). Una vez que se tiene el DNA, se utiliza en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Rodríguez *et al.* 2004).

Para obtener el perfil de los transcritos para el transportador putativo de hexosas y de sacarosa, se corrieron geles de agarosa al 1% con las muestras de RNA de todos los tratamientos realizados (con patógeno y sin patógeno), como anteriormente se describió. Se ajustaron los volúmenes empleados de RNA cuando fue necesario, para asegurarnos de que la cantidad de RNA que se utilizaba en la producción de cDNA era la misma en todos los tratamientos.



**Técnica Reacción de RT.-** La reacción se efectuó agregando en un tubo eppendorf 1  $\mu$ L de Oligo dT (62  $\mu$ M), el volumen de RNA ajustado previamente y H<sub>2</sub>O-DEPC c.b.p. 10  $\mu$ L. Posteriormente, éste tubo se colocó en un bloque de calentamiento a 70°C por 5 min para desnaturalizar el RNA, al finalizar el tiempo se colocó en hielo por 5 min y se le agregaron 10  $\mu$ L de la mezcla preparada (Tabla 3), luego se calentó a 25°C por 5 min para realizar el alineamiento, después a 42° por 1 h, y finalmente, para inactivar a la enzima se calentó a 70°C durante 15 min, utilizando un termociclador 2720 Thermal Cycler Applied biosystems. El cDNA obtenido se almacenó a -20°C hasta el momento de su uso.

Reactivo	Volumen ( $\mu$ L)
Buffer ImProm-II 5X	4.0
MgCl <sub>2</sub> 25mM	2.4
dNTP's 10mM	1.0
TR (Transcriptasa reversa)	1.0
H <sub>2</sub> O-DPC	1.6 (c.b.p.10 $\mu$ L)

Tabla 3.- Mezcla de reacción de RT

**Fundamento PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa).-** Método *in vitro* de síntesis de DNA con el que un segmento particular de éste es específicamente amplificado al ser delimitado por un par de cebadores que lo flanquean. Su copiado se logra en forma exponencial a través de ciclos repetidos en presencia de una enzima DNA polimerasa termoestable (Rodríguez *et al.*, 2004).

**Técnica PCR.-** La reacción de PCR se realizó en un volumen final de 25  $\mu$ L con los componentes que se muestran en la Tabla 4.

Reactivo	Hexosas ( $\mu$ L)	Sacarosa ( $\mu$ L)
PCR Buffer Master Mix 2X	12.5	12.5
Oligonucleótido Sentido	0.25	0.1
Oligonucleótido Antisentido	0.25	0.1
cDNA	1.0	1.0
H <sub>2</sub> O libre de DNAsas (c.b.p. 25 $\mu$ L)	11.0	11.3

Tabla 4.-Preparación de la mezcla de reacción para la técnica de PCR, tanto para el transportador putativo de hexosas como el de sacarosa.





La técnica de PCR se llevó a cabo en un termociclador 2720 Thermal Cycler Applied Biosystems. Las condiciones de amplificación se describen en la Tabla 5.

Pre-desnaturalización	Amplificación PCR/ ciclo (38ciclos)	Extensión final
94°C por 3 min	Desnaturalización, 94°C por 30 s Templado, 60°C por 1min Extensión, 72°C por 2 min	72°C por 10 min

**Tabla 5.- Condiciones empleadas para la realización de la reacción de PCR**

A los 25µL de producto amplificado se les agregó 2.0 µL de buffer de carga Blue/Orange 6X de la marca Promega, se visualizaron en un gel agarosa al 1.0% con buffer TBE 1X, bromuro de etidio 0.5µL/mL y usando TBE 1X como amortiguador de corrida. Así mismo, se corrió en el mismo gel un marcador de peso molecular de 1 Kb, al que también se le agregaron 2.0 µL del buffer de carga Blue/Orange 6X de la marca Promega y 4 µL de agua estéril desionizada. Las bandas de DNA se visualizaron en un transiluminador de UV, posteriormente las imágenes fueron capturadas con el equipo Fluor-STM Multimager (Bio-Rad), para con ello realizar y analizar las densitometrías correspondientes con el programa de análisis Quantity One®. Los oligonucleótidos que se emplearon para amplificar el transcrito del transportador putativo de hexosas y el de sacarosa fueron obtenidos en un trabajo previo en el laboratorio (Gómez-Calderas, 2008), las secuencias aparecen en la Tabla 6.

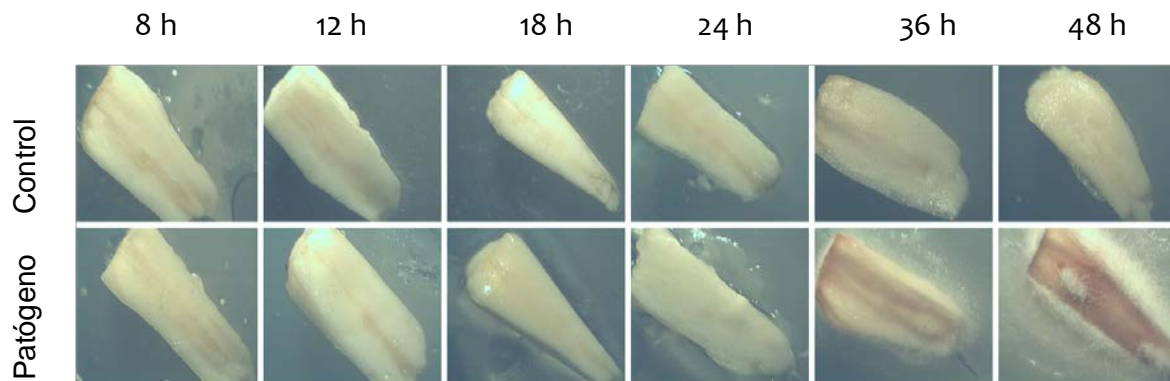
Transportador	Dirección de amplificación	Secuencia del oligonucleótido	TM (50mM Na <sup>+</sup> )	Longitud (Pb)	Contenido de GC (%)
Hexosas	Sentido	CTTCTACGCGCCGGTCC	62,9	17	70,5
	Antisentido	GCGATGACGAAGGTGAAGAG	60,94	20	54,5
Sacarosa	Sentido	TCCTCTGGTTCCACAAACAAC	60	21	48
	Antisentido	ACGAGCTGAATCCTAGAACGA	59	21	48

**Tabla 6.- Oligonucleótidos empleados para la amplificación de transcrito para el transportador putativo de hexosas y de sacarosa en los embriones de maíz.**

## VIII. RESULTADOS

### VIII.1 Infección de embriones de maíz por *Fusarium verticillioides*.

Se infectaron los embriones de maíz con *Fusarium verticillioides*, el progreso de la infección a diferentes tiempos de la germinación (8,12,18, 24, 36 y 48 h) se muestra en la Figura 15. Se observa que el inicio de la formación del micelio aéreo de color blanco fue a las 24 h, no obstante en donde se observa la mayor cantidad de micelio aéreo fue a las 48 h, también se observó un cambio en la coloración en el embrión, misma que puede deberse al hongo, tal y como se observa cuando el patógeno crece en PDA; o por la necrosis del tejido embrionario por la actividad fúngica. No obstante, los embriones de maíz sin infectar, carecen de la coloración violácea que existe en el tejido infectado. Algo interesante es que tanto en los embriones infectados como en los controles se observa la salida de la radícula a partir de las 24 h.

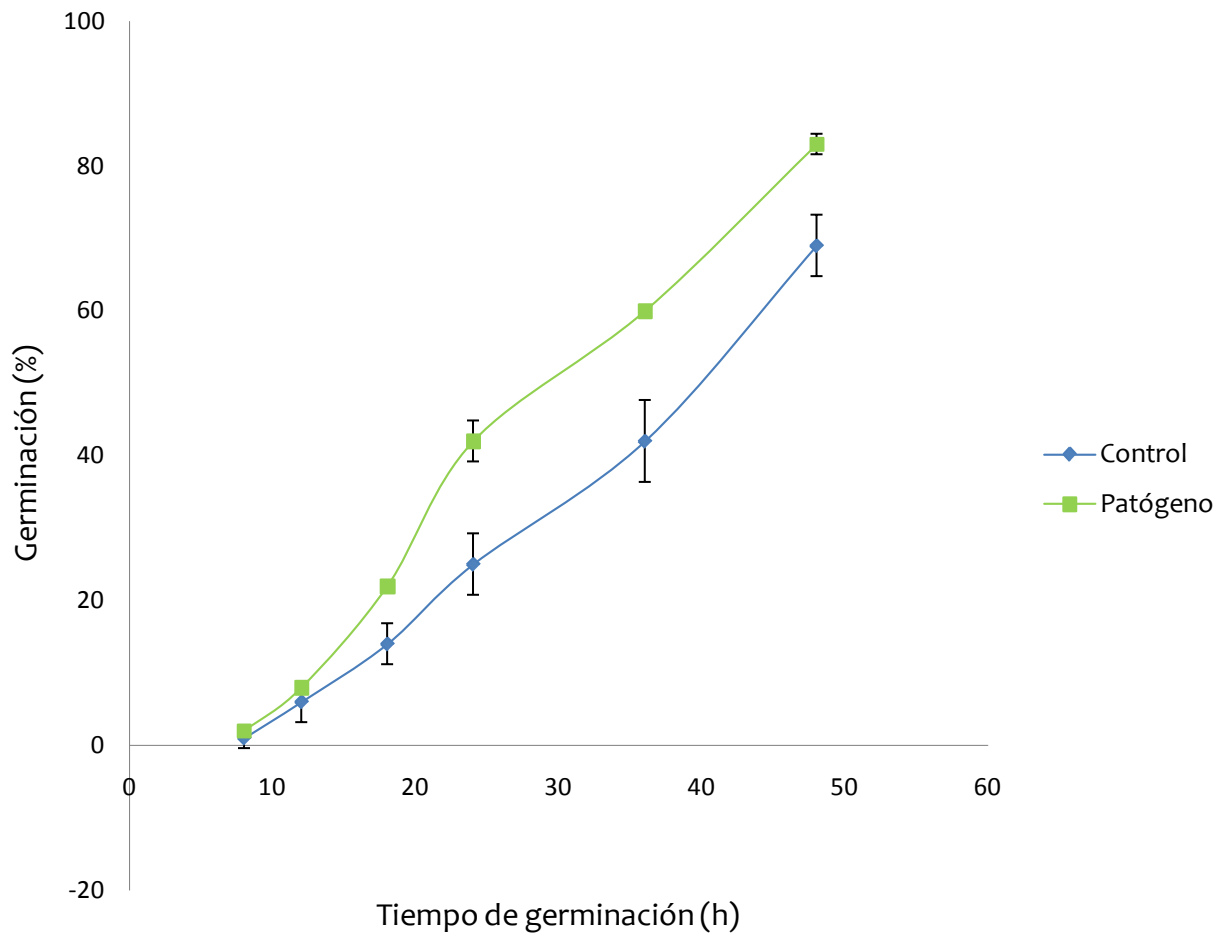


**Figura 15.- Embriones de maíz infectados y no infectados por *Fusarium verticillioides*.** La figura muestra las diferencias macroscópicas de embriones de maíz que fueron infectados y no infectados por el hongo *Fusarium verticillioides* a diferentes tiempos de germinación. Destaca el hecho de que en las primeras 24 h el hongo es visualmente indistinguible y le permite al embrión germinar a pesar del hongo, cosa contraria a lo que ocurre 24 h después.



## VIII.2 Porcentaje de Germinación

La germinación abarca una serie de eventos que comienzan con la toma de agua por la semilla seca, y termina con la elongación del eje embrionario en la radícula (Bewley, 1997). Sin embargo, factores externos como la temperatura o la infección por patógenos pueden modificar el curso natural de la germinación, ya que éste último, por ejemplo, puede modificar los patrones del flujo de agua en el hospedero (Isaac, 1992), por lo cual se obtuvo el perfil del porcentaje de germinación, tanto para embriones de maíz infectados por el hongo *Fusarium verticillioides*, como para los no infectados (control). Se encontró un notable aumento en el porcentaje de germinación en los embriones infectados por el patógeno con respecto de aquellos que no fueron infectados, ya que por ejemplo (Figura 16) en los dos primeros tiempos de germinación, 8 y 12 h, el porcentaje de embriones germinados es similar en ambos tratamientos, no obstante se observa a las 24 h de germinación un aumento de más del 17% de embriones germinados con el hongo respecto a los del control, sin embargo dicha diferencia porcentual se reduce a las 48 h en más de 10%, pero pese a dicha recuperación, al finalizar el ensayo el número o porcentaje de embriones germinados en el control (69%) es menor en contraste con los embriones que fueron infectados (83%). Por tanto se observó que el adelanto en el número de embriones germinados se reduce al progresar el tiempo de germinación, pero se siguen manteniendo los porcentajes por arriba del control.

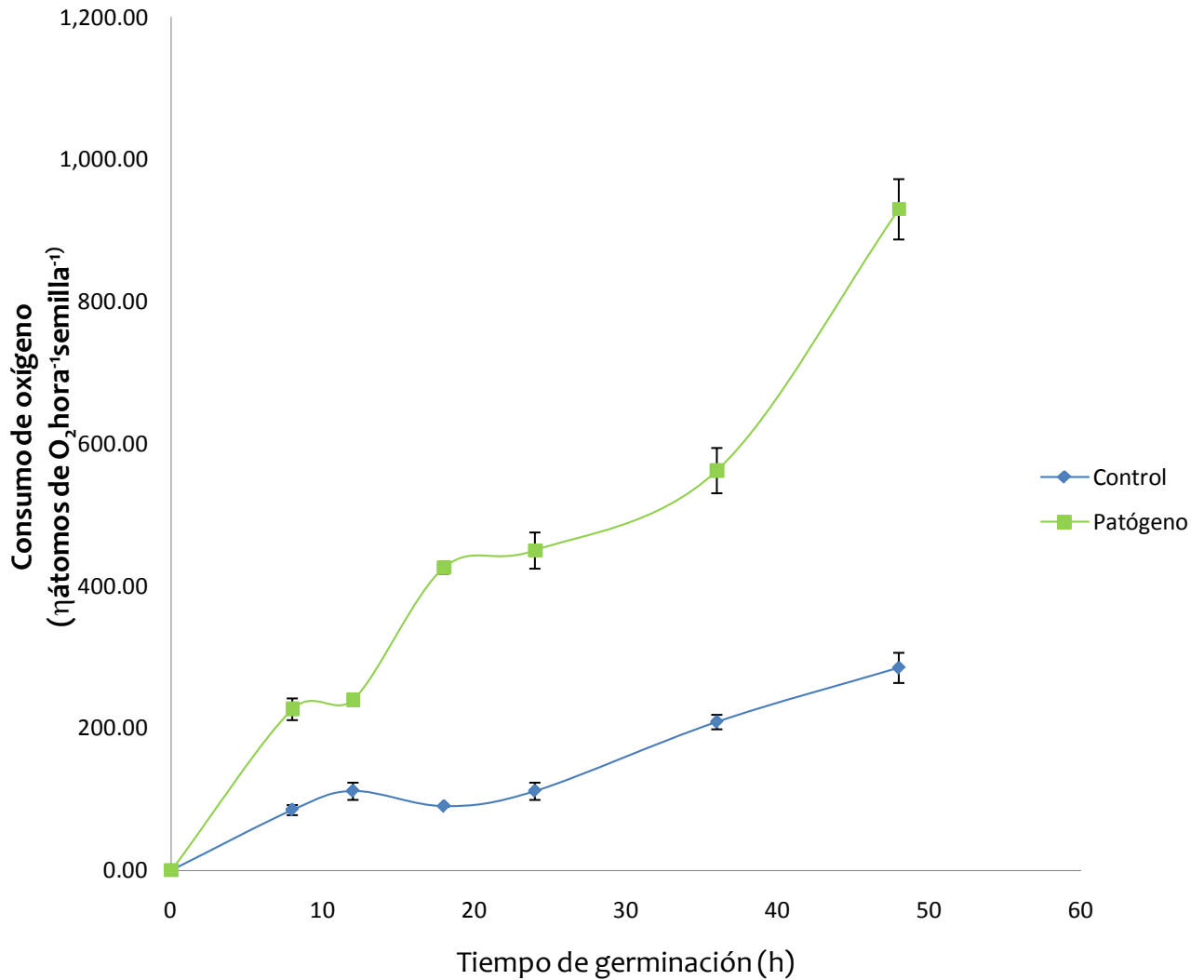


**Figura 16.-** Curva de Germinación de embriones de maíz (*Zea mays*) bajo dos tratamientos diferentes, infectados con *Fusarium verticillioides* y no infectados (control). Los embriones fueron germinados por las condiciones descritas en *Materiales y métodos*. Datos expresados en medias  $\pm$  desviación estándar,  $n=3$  con dos replicas.



### VIII.3 Ensayo de respiración (oximetría)

Ya que hubo al parecer un aumento en el porcentaje de germinación de embriones infectados con el hongo, medimos si también la capacidad de respiración se incrementaba. En la Figura 17 se observa una mayor demanda en el consumo de oxígeno por parte de los embriones infectados en todos los periodos de germinación, pues desde las primeras 8 h el consumo de oxígeno en los embriones infectados fue de  $226.8 \mu\text{átomos de O}_2 \text{ h}^{-1}\text{semilla}^{-1}$  cerca de 250% más respecto al control ( $85 \mu\text{átomos de O}_2 \text{ h}^{-1}\text{semilla}^{-1}$ ), pese a que a ese tiempo no se observa crecimiento de micelio. Conforme transcurre el tiempo de germinación se observa que el embrión infectado continúa presentando una tasa de consumo de oxígeno incrementada: a las 48 h los embriones control han consumido 285  $\mu\text{átomos de oxígeno}$ , mientras que aquellos que fueron infectados han utilizado 930  $\mu\text{átomos de oxígeno}$ , lo anterior probablemente se debe a que tanto el embrión como el hongo están respirando y consumiendo oxígeno, y al parecer el metabolismo del embrión está siendo estimulado si tomamos en cuenta los aumentos en el porcentaje de germinación del embrión. Por otra parte, debe notarse que entre las 18 y 36 h de germinación de los embriones infectados se presenta una meseta, que sugerimos se debe al cambio en el tipo de respiración, puesto que en esos tiempos es cuando la mayor parte de los embriones han terminado de germinar y el hongo se está adecuando para sobrevivir con el tejido necrosado.

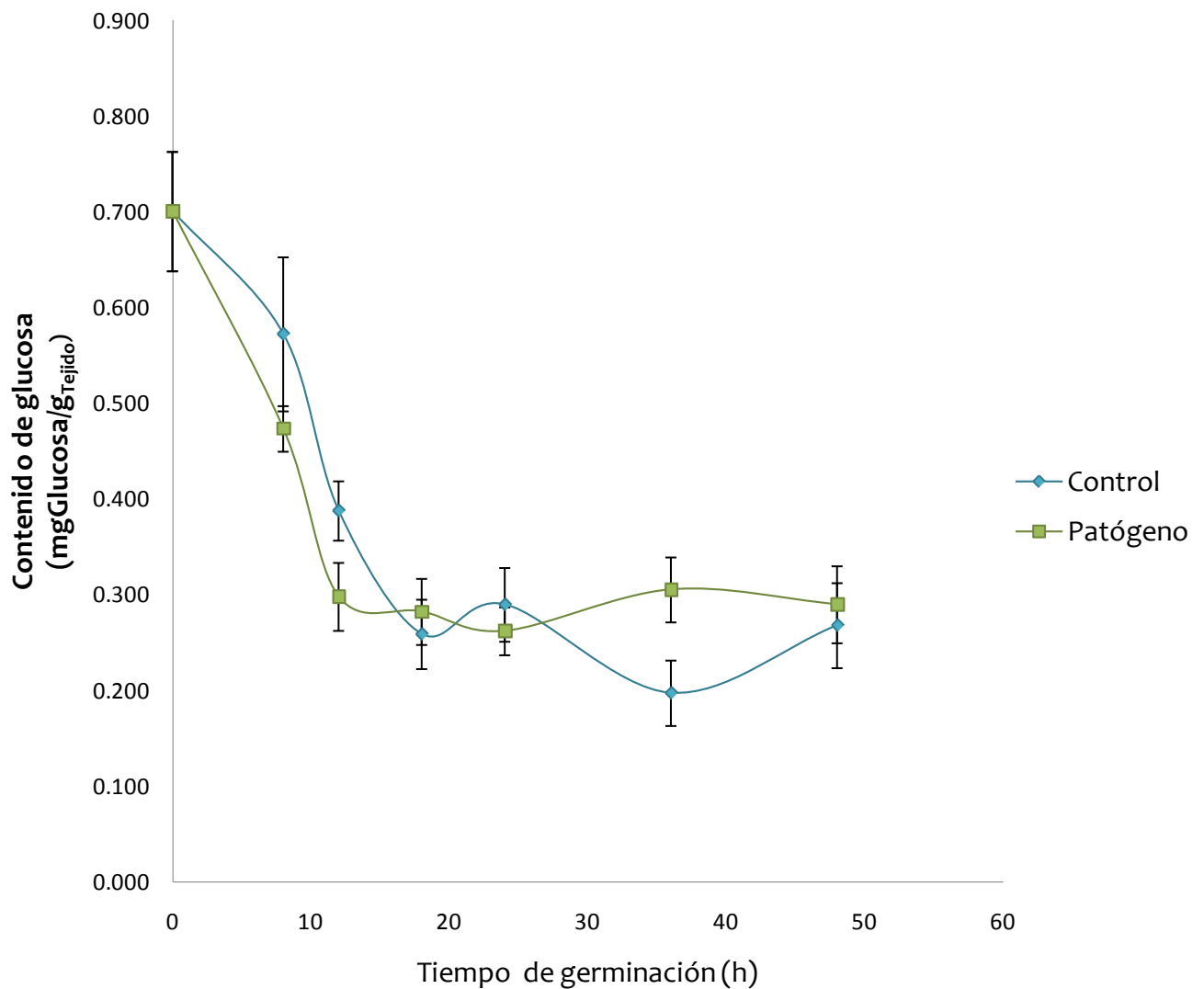


**Figura 17.- Comparación del consumo de oxígeno entre los embriones infectados por *Fusarium verticillioides* y los embriones control, sometidos a diferentes periodos de germinación. El consumo de oxígeno se midió bajo las condiciones descritas en *Materiales y métodos* y se expresó en  $\eta$ átomos de  $O_2$  h $^{-1}$ semilla $^{-1}$ . Datos expresados en medias  $\pm$  desviación estándar n=2 con dos replicas.**



#### **VIII.4 Cuantificación de carbohidratos solubles: glucosa, fructosa y sacarosa.**

En las primeras h de la germinación, las fuentes de carbohidratos que utiliza el eje embrionario son la sacarosa, la rafinosa y otros carbohidratos sencillos que se encuentran en él, ya que la movilización de las reservas del endospermo o el cotiledón generalmente inician sólo después de la protrusión de la radícula (Bradford, 2004). Para conocer el perfil del contenido de carbohidratos solubles en embriones de maíz que fueron infectados por el hongo, y poder compararlos con los embriones control, se realizó un ensayo enzimático. En cuanto al contenido de glucosa (Figura 18), es de notarse su cambio en los embriones tratados, ya que en un inició la cantidad de glucosa disponible es menor respecto a los últimos tiempos estudiados, puesto que se observa que en los dos primeros periodos de germinación (8 y 12 h) el contenido de glucosa en el control es mayor, posteriormente se observa una fase en la que tanto el control como los embriones tratados por el patógeno presentan un contenido similar, sin embargo en los últimos periodos de germinación, la cantidad de dicho carbohidrato aumenta en los embriones infectados.



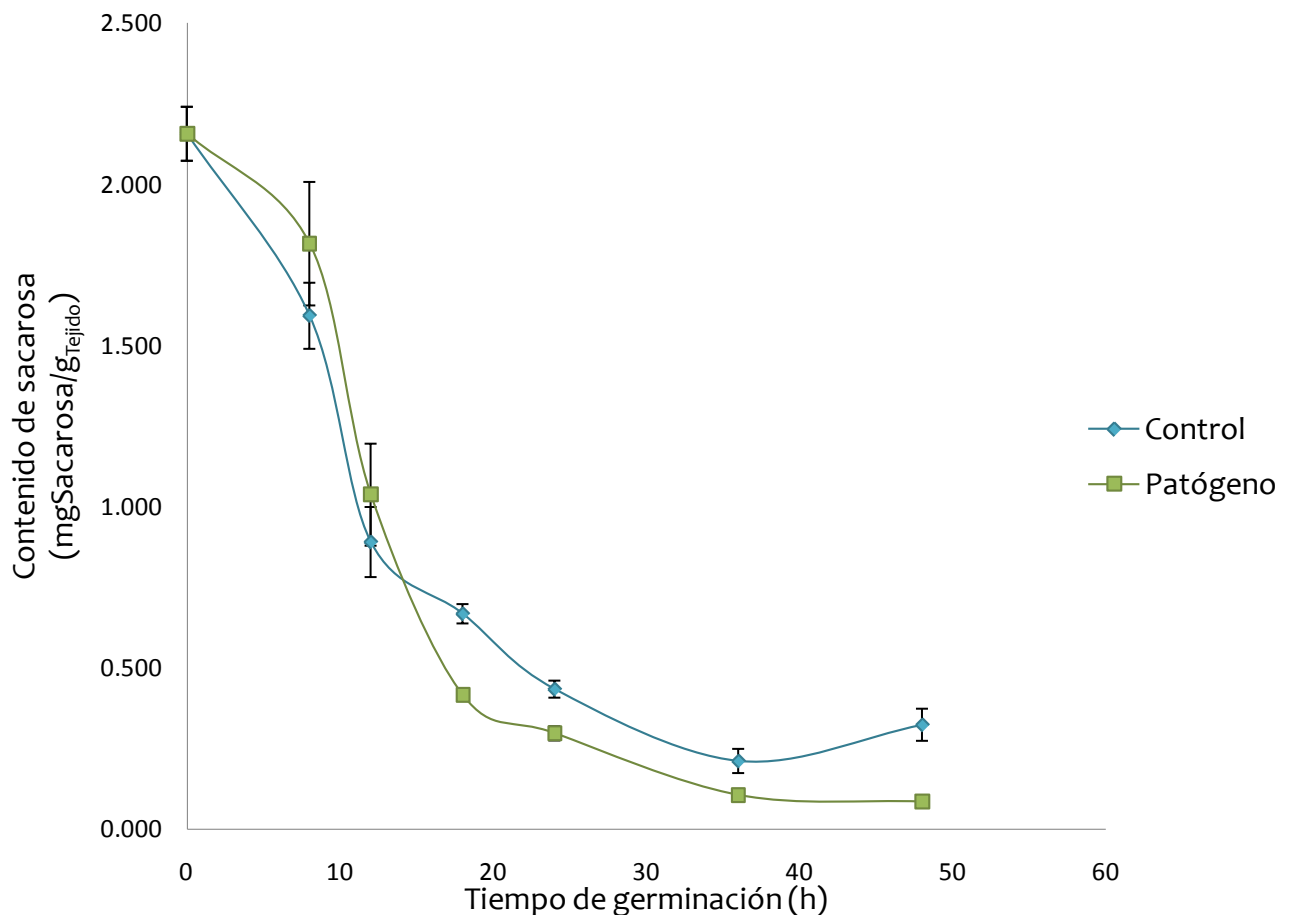
**Figura 18.- Contenido de glucosa en embriones de maíz infectados y no infectados por el patógeno.** La cantidad de glucosa se determinó por el ensayo enzimático descrito en *Materiales y Métodos*. Datos expresados en medias  $\pm$  desviación estándar,  $n = 4$ , con 12 replicas.

También se determinó el contenido de sacarosa en ambos modelos experimentales (Figura 19), observándose que el contenido disponible de sacarosa es mayor en los embriones control después del tercer tiempo de germinación estudiado, y no así en los embriones infectados, ya que estos





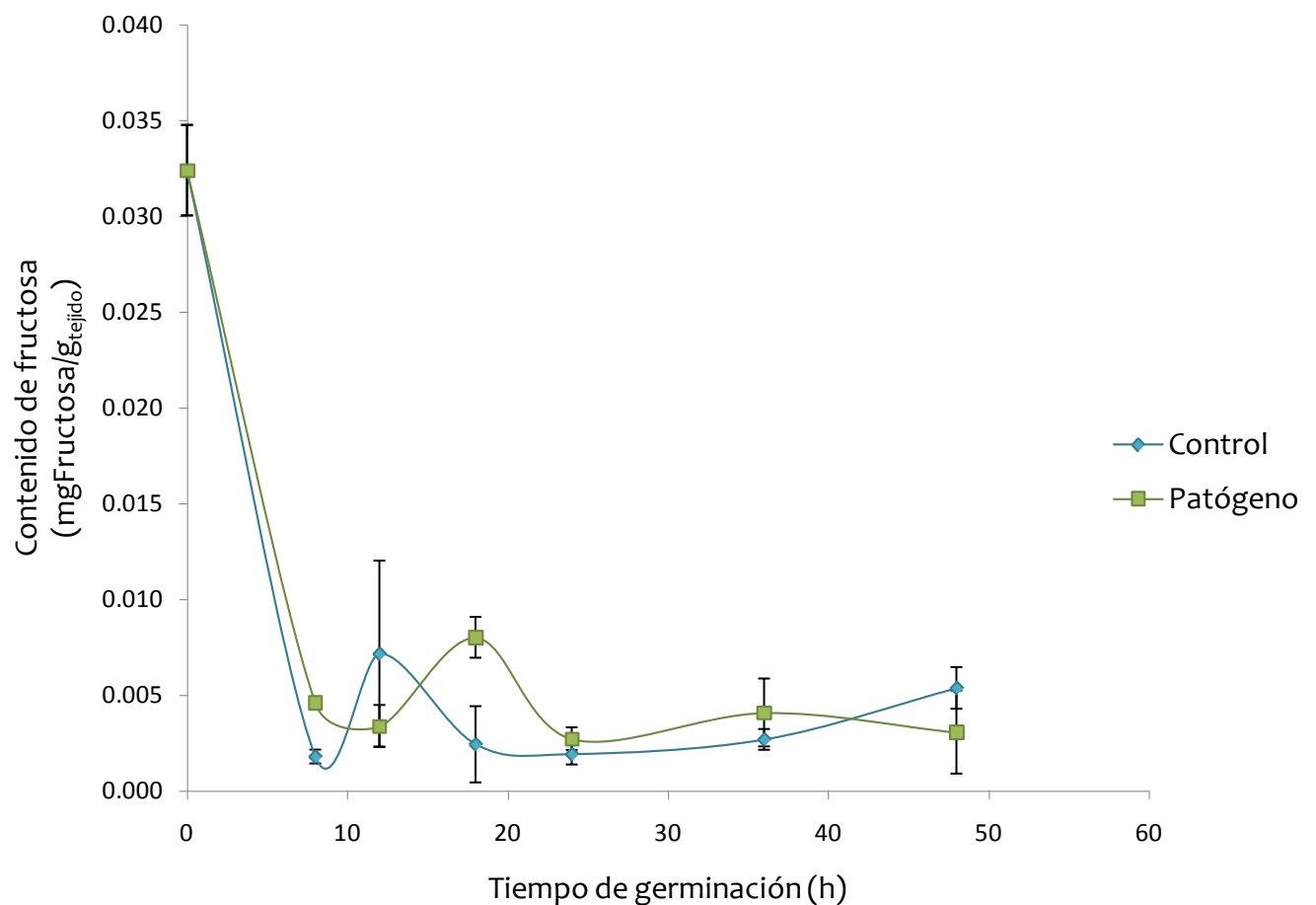
muestran mayor sacarosa en un inicio, pues a partir de las 18 h los embriones control mostraron mayor contenido de sacarosa que los embriones tratados, posiblemente la sacarosa es hidrolizada por invertasas fúngicas o de la planta, suministrando así una fuente de carbono para el patógeno o para la planta, y que explicaría el aumento en la glucosa (Figura 18) y un decremento en la sacarosa disponible (Figura 19). Así mismo, es de notarse que la cantidad total de sacarosa es mayor en contraste con la de glucosa o fructosa.



**Figura 19.- Contenido de sacarosa en embriones de maíz infectados y no infectados por el patógeno.** La cantidad de sacarosa se determinó por el ensayo enzimático descrito en *Materiales y Métodos*. Datos expresados en medias  $\pm$  desviación estándar,  $n = 4$ , con 12 replicas.



En la Figura 20, se muestra la cantidad de fructosa en los embriones control y en los tratados con el hongo, observándose que el contenido de fructosa tanto para los embriones infectados, como para los no infectados varía a lo largo de los periodos de germinación, sin embargo al parecer el contenido de fructosa en los embriones tratados, en la mayor parte del periodo de germinación, es mayor respecto al control. Por otro lado, también se muestra que de los tres tipos de carbohidratos solubles extraídos, la fructosa es la que está contenida en mucho menor cantidad, tal y como se ilustra en el gráfico.



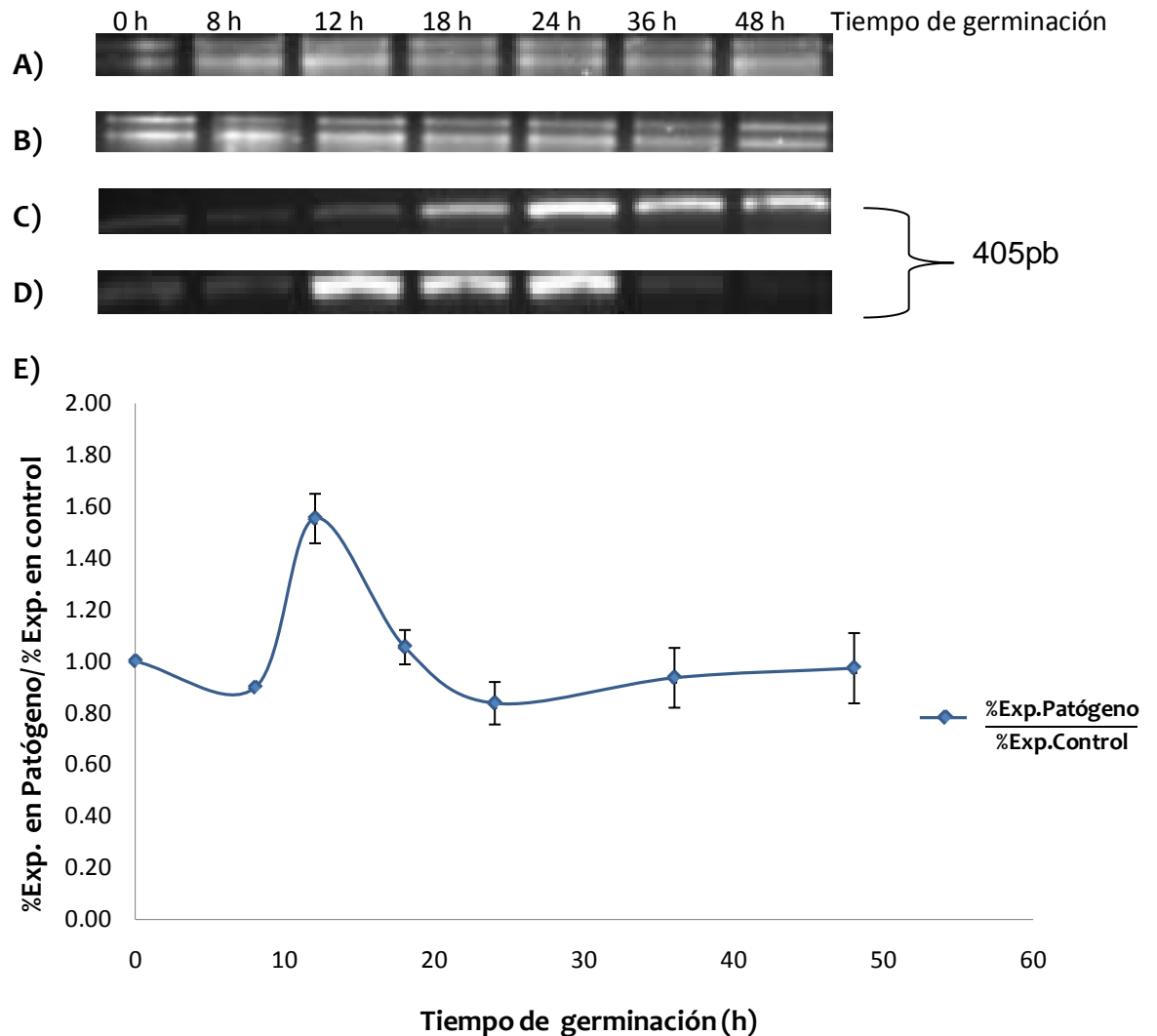
**Figura 20.- Contenido de fructosa en embriones de maíz infectados y no infectados por el patógeno.** La cantidad de fructosa se determinó por el ensayo enzimático descrito en *Materiales y Métodos*. Datos expresados en medias  $\pm$  desviación estándar,  $n = 4$ , con 12 replicas.



### VIII.5 Efecto de *Fusarium verticillioides* sobre la expresión del transportador putativo de hexosas ZmHT y de sacarosa ZmSUT1

Se encontró que para el caso del transportador ZmHT su expresión se adelanta 6 h cuando el hongo infecta al embrión en contraste con los embriones no infectados (Figura 21), y que existen 12 h de adelanto en el máximo nivel de expresión entre los embriones infectados respecto al control, ya que los embriones tratados tiene su máximo a las 12 h de germinación, mientras que en los embriones control es a las 24 h. No obstante, en los últimos tiempos de germinación, 36 y 48 h, la expresión en ambos modelos experimentales es similar, pues el cociente de los porcentajes de expresión (patógeno/control) se acercan a la unidad, lo cual nos sugiere en primer instancia que las hexosas han dejado de ser importadas debido a su agotamiento, lo que trae consigo un decremento en la expresión del transportador en los embriones infectados con el hongo, o bien que estamos detectando el nivel de transcrito residual ya que el embrión ha dejado de llevar a cabo la transcripción general de sus genes.

Así mismo, también se observa que la expresión del transportador no llega a ser el doble respecto a la expresión que pudiera darse en el tiempo de 0 h.



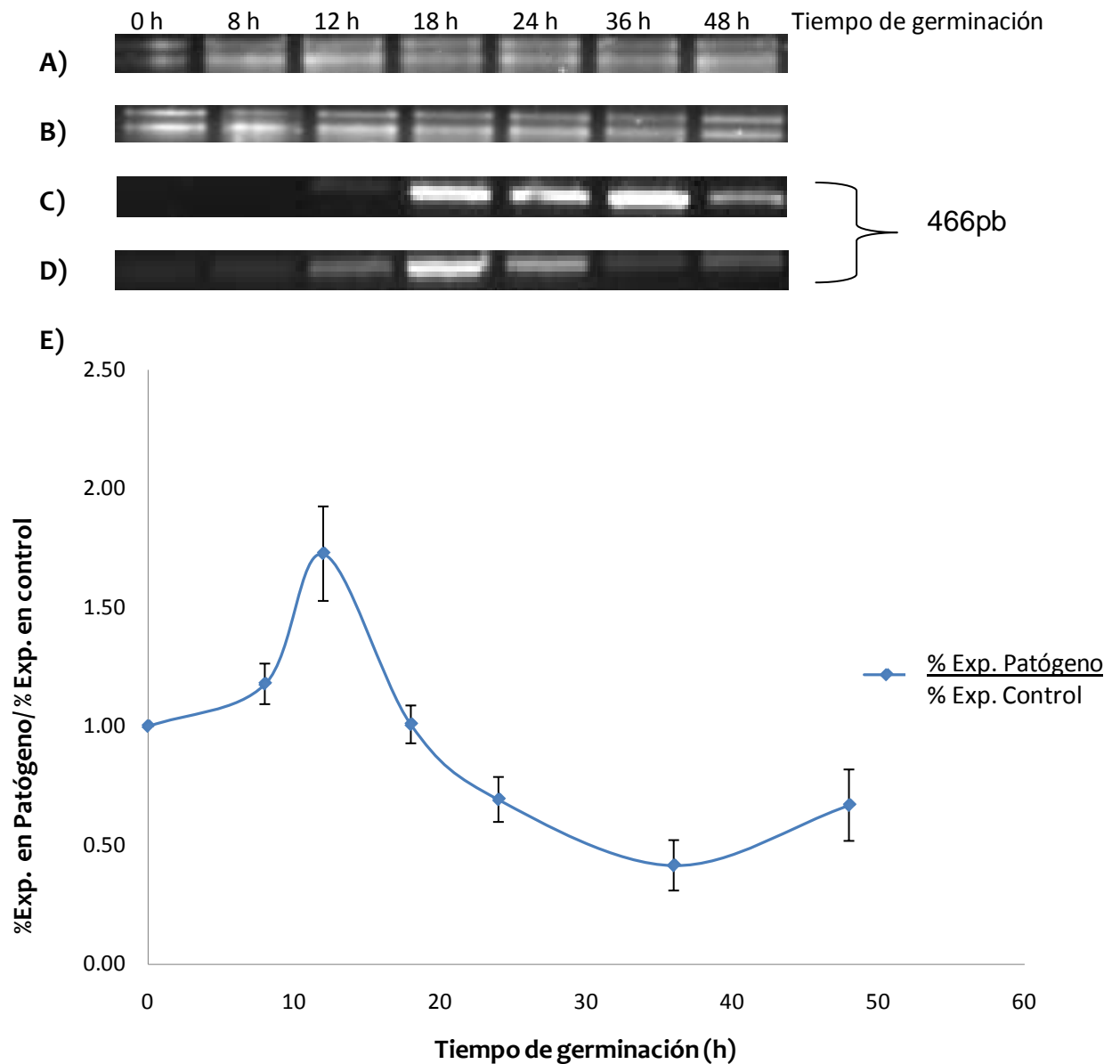
**Figura 21.-Perfil de expresión del transcrito del transportador de hexosas ZmHT, tanto en embriones infectados por *Fusarium verticillioides* como para los embriones control. A.** Gel de Agarosa en el que se muestra el control de cargado de RNA del control. **B.** Gel de Agarosa en el que se muestra el control de cargado de RNA de la muestra con patógeno. **C.** Gel de agarosa en donde se muestra la expresión del transcrito de ZmHT del control. **D.** Gel de agarosa en donde se muestra la expresión del transcrito de ZmHT de la muestra con patógeno. **E.** Se realizó la densitometría de las bandas en C y D, tomándose la densidad de la banda del tiempo 0 como 100% y posteriormente se obtuvo el cociente entre el %Exp.Patógeno/%Exp.Control. Datos expresado en medias  $\pm$  desviación estándar estándar, n=3.



Por otro lado, la expresión en el transportador ZmSUT de sacarosa es diferente a la del transportador de hexosas, ya que se observa (Figura 22) que van aumentando los transcritos de manera similar conforme avanza la germinación en ambos lotes y alcanzan un nivel máximo de expresión de ZmSUT, en los embriones infectados ocurre a las 18 h, seguido de un rápido decremento, mientras que en el caso de los embriones control su máximo de expresión ocurre a las 36 h, por lo que la relación de la expresión (patógeno/control) es menor a la unidad, y además de una reducción más lenta del transcrito. A pesar de las diferencias con el perfil de transcrito del transportador de hexosas, en lo que sí es similar es que hay un anticipo en la expresión de ZmSUT en los embriones tratados con el hongo adelantándose 6 h respecto al nivel del control.

Cabe destacar que la expresión en el transportador de sacarosa para el patógeno a las 18 h, es similar respecto al control ya que el cociente de los porcentajes de expresión (patógeno/control) se acercan a la unidad, a pesar de que es el máximo de expresión para los embriones tratados.

Este fenómeno descrito para el transportador de sacarosa puede deberse a un rápido consumo de este carbohidrato, lo que coincide con la disminución rápida de la sacarosa en los dos lotes de embriones tratados y control (Figura 19).



**Figura 22.-Perfil de expresión del transcrito del transportador de sacarosa ZmSUT, tanto en embriones infectados por *Fusarium verticillioides* como para los embriones control. A.** Gel de Agarosa en el que se muestra el control de cargado de RNA del control. **B.** Gel de Agarosa en el que se muestra el control de cargado de RNA de la muestra con patógeno. **C.** Gel de agarosa en donde se muestra la expresión del transcrito de ZmSUT del control. **D.** Gel de agarosa en donde se muestra la expresión del transcrito de ZmSUT de la muestra con patógeno. **E.** Se realizó la densitometría de las bandas en C y D, tomándose la densidad de la banda del tiempo 0 como 100% y posteriormente se obtuvo el cociente entre el %Exp.Patógeno/%Exp.Control. Datos expresado en medias  $\pm$  desviación estándar estándar, n=3.

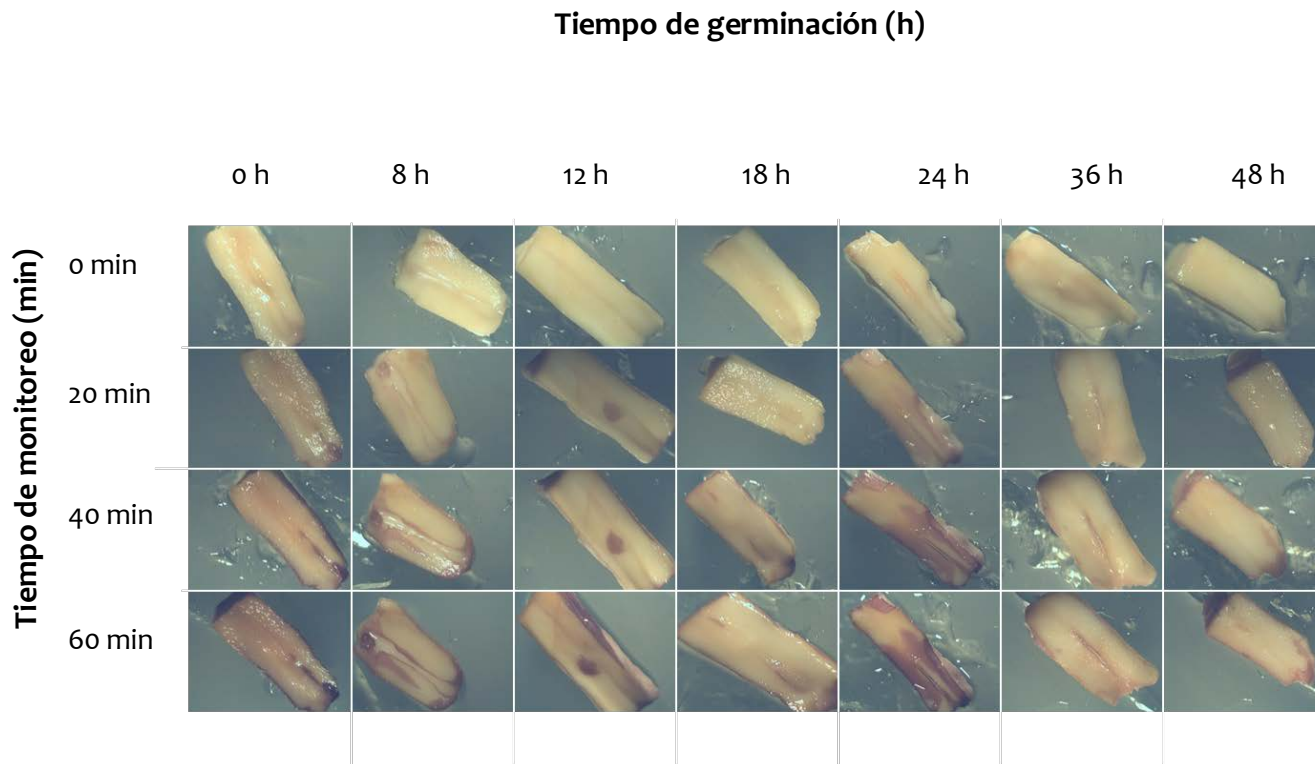


### VIII.6 Detección *in situ* de los niveles de glucosa.

Para corroborar que los embriones se encuentran activamente produciendo y utilizando la glucosa, tanto en los controles como en los embriones infectados con el hongo, se detectó *in situ* el contenido de glucosa del embrión a lo largo de los diferentes tiempos de la germinación.

Asimismo, se observa que en los embriones control (Figura 23) hay un uso moderado de la glucosa, ya que aparentemente conforme transcurre el tiempo de germinación se producen hexosas que al parecer son transportadas vía el tejido vascular, y que conducen la glucosa hacia el eje embrionario en crecimiento, ya que es de notarse el hecho de que existe un uso de glucosa un tanto controlado, pues por ejemplo en los embriones de 12 h de germinación, se presenta una detección de glucosa en el tejido vascular, la cual se hace más evidente conforme transcurre el tiempo de monitoreo. No obstante, el patrón de distribución y detección de glucosa en el tiempo de 24 h es muy evidente a lo largo de todo el embrión. Del mismo modo, la figura también muestra que en ninguno de los casos se detectó al dicho carbohidrato en el tejido del eje embrionario.

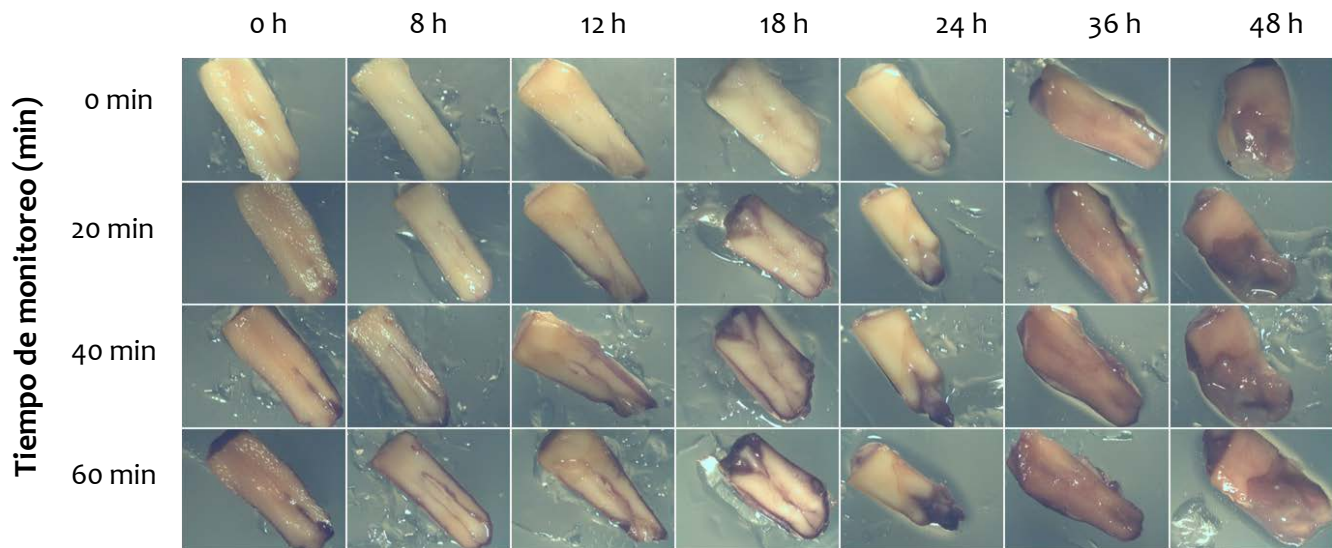
En los embriones infectados con *Fusarium verticillioides* (Figura 24) se observa que la movilización de carbohidratos se inicia antes, ya que hay mayor contenido de glucosa en el tejido desde tiempos cortos, pues desde el tiempo de 20 min se puede detectar fácilmente dicho carbohidrato, tal y como se muestra en los tiempos de germinación de 12, 18 y 24 h, y se incrementa conforme avanza el tiempo de germinación, así mismo dicho aumento se da abundantemente en la radícula conduciendo a que la germinación se dé anticipadamente. No obstante, en contraste con lo observado en la Figura 23, es de notarse que en el tejido de la radícula en el tiempo de 24 h se detectó glucosa, lo cual fue incrementado conforme avanzó el tiempo de monitoreo. Finalmente, la Figura también muestra que los embriones de los tiempos de 36 y 48 h de germinación, presentan una coloración más oscura probablemente debida al patógeno mismo y/o a la necrosis del tejido embrionario.



**Figura 23.- Detección *in situ* de los niveles de glucosa en embriones control.** La figura muestra cuatro intervalos de tiempo (de 20 min cada uno), en los cuales se detectaron de manera *in situ* los niveles de glucosa bajo las condiciones descritas en *Materiales y métodos*. Así mismo sólo se muestran las imágenes más representativas de 3 experimentos de un periodo de monitoreo de 10 min por una h.



## Tiempo de germinación (h)



**Figura 24.- Detección *in situ* de los niveles de glucosa en embriones infectados.** La figura muestra cuatro intervalos de tiempo (de 20 min cada uno), en los cuales se detectaron de manera *in situ* los niveles de glucosa en el tratamiento con patógeno bajo las condiciones descritas en *Materiales y métodos*. Así mismo sólo se muestran las imágenes más representativas de 3 experimentos de un periodo de monitoreo de 10 min por una h.



## IX. DISCUSION

### IX.1 Efecto de *Fusarium verticillioides* en la germinación y respiración de los embriones de maíz.

*Fusarium verticillioides* es capaz de infectar en todos los estadios de desarrollo de la planta de maíz, encontrándose en las raíces, los tallos, las mazorcas y los granos (Munkvold *et al.*, 1997). La infección con *Fusarium verticillioides* fue visible en los embriones a partir de las 24 h, sin embargo desde las 18 h hubo un aumento en el número de embriones germinados. Además de que a tiempos más tempranos de germinación, cuando aún a las 8 h no se logran observar signos de la infección, se observa un incremento en la tasa respiratoria de los embriones.

El incremento en el porcentaje de embriones germinados podría explicarse de varias maneras, una de ellas es que el patógeno tiene que encontrar una vía de entrada a las células del embrión. Se conoce que *Fusarium verticilloides* no es capaz de formar estructuras de penetración como los apresoria (Duncan y Howard, 2010), por lo que el hongo tiene que encontrar una abertura natural o una herida, si no la hay entonces el patógeno secretará enzimas degradativas de los diferentes componentes de la pared celular, entre las que se encuentran las celulasas, pectinasas, glucanasas y también proteasas (Cantu *et al.*, 2008). Por lo que la acción de estas enzimas en las paredes celulares de los escutelos podrían favorecer la salida anticipada de la radícula. No obstante el incremento en el porcentaje de germinación observado, no se encontró que el desarrollo del embrión estuviera favorecido (Figura 15), probablemente debido a que es el punto en el que el patógeno es capaz de penetrar e invadir a las células internas del embrión, y la continua secreción de las enzimas degradativas por parte del patógeno ocasionaría el reblandecimiento del tejido embrionario.



Un factor que contribuye al incremento de la respiración del embrión podría ser un aumento de suministro de  $O_2$  a través de la capa externa u otras estructuras de los alrededores debido a su ruptura por las hidrolasas del patógeno.

El adelanto e incremento en la respiración que encontramos en los embriones que fueron infectados por el patógeno puede llevar a un incremento en las especies reactivas de oxígeno (ROS). El denominado estallido oxidativo o aumento en la concentración de las ROS, es uno de los mecanismos conocidos de defensa activa y rápida de las plantas resistentes para producir metabolitos o proteínas relacionados con la defensa (Isaac, 1992). Mientras que en las plantas sensibles, el incremento en las ROS no logra encender las respuestas necesarias para superar la capacidad invasora del patógeno. En plántulas de maíz se ha encontrado que hay un incremento en las especies reactivas de oxígeno con la infección por *Fusarium verticillioides*, así como un incremento en su capacidad antioxidante. Las mismas plántulas de maíz infectadas por el hongo y posteriormente colonizadas por la micorriza *Piriformospora indica*, también muestran el estallido oxidativo pero en este caso, las enzimas antioxidantes decrecen respecto al de la plántula infectada con *F. verticillioides* y la plántula es capaz de sobrevivir, acumular mayor biomasa y producir más raíces secundarias que con la presencia del patógeno solo. Los autores sugieren que el incremento en las enzimas antioxidantes para reducir las especies reactivas de oxígeno, durante la infección por *F. verticillioides*, es excesivo y no logra proteger a las plántulas de la infección, por lo que su reducción mejora su capacidad de crecimiento (Kumar *et al.*, 2009).

Adicionalmente, se ha propuesto que durante la infección, el metabolismo del hospedero se ve estimulado para dar una respuesta rápida a la invasión por el patógeno, el estímulo en el metabolismo lo observamos en este estudio como un incremento en el consumo de  $O_2$  de los embriones embebidos desde tiempos muy tempranos en la germinación. El aumento en la respiración supone un incremento en la concentración de ATP disponible para los diferentes procesos metabólicos



del embrión, sin embargo al aumentar su tasa de respiración también puede promover la esporulación del hongo llevando a que el hospedero no pueda mantener sus funciones mínimas, montar una respuesta de defensa y continuar su crecimiento (Isaac, 1992).

## **IX.2 Alteración de los niveles de carbohidratos por la presencia de *Fusarium verticillioides***

El incremento en la respiración, lleva a un mayor y más rápido uso de las reservas de carbohidratos, lo cual puede explicar el hecho de que durante las 48 h de germinación con el patógeno, una u otra reserva de carbohidratos varía, llegando a presentar entre las 24 y 48 h niveles de carbohidratos por debajo de los embriones sanos. La determinación de la concentración de glucosa *in situ* muestra que a las 24 h hay mayor cantidad de glucosa en los embriones infectados, sobre todo en las radículas de los ejes embrionarios, y en general con una distribución distinta que en los controles, sugiriendo un uso diferente de los carbohidratos del embrión y que por consiguiente afecta su distribución. Lo anterior podría haber ocurrido por una síntesis distinta de sus proteínas transportadoras, o bien a un incremento en las invertasas de la pared celular de los embriones. Así mismo, se ha reportado que al agotarse los nutrimentos, el hongo inicia un crecimiento micelial invadiendo todos los órganos del hospedero (Pucheta *et al.*, 2006), tal y como se muestra en la figura 15 a partir de 24 h, que es justo cuando ya no se detectan niveles considerables de glucosa en los embriones control de la figura 23. En hojas de *Vitis vinífera* se encontró que tanto las invertasas de la pared celular como uno de los 7 transportadores de hexosas en la hoja, el transportador VvHT5, se incrementaba en presencia del patógeno (Hayes *et al.*, 2010), sugiriendo que hay una relación entre los contenidos de glucosa de las células y la actividad de los transportadores de hexosas. Estudios sobre el efecto de patógenos en el metabolismo de carbohidratos han encontrado que las invertasas de la pared celular se incrementan y que llevan a una alteración del flujo de carbono en la planta. El cambio en el contenido de carbohidratos también



repercute en la expresión de genes involucrados en el metabolismo de carbono (Berger *et al.*, 2007).

### **IX.3 Efecto de la infección por *Fusarium verticillioides* en los niveles de los transcritos para el transportador de hexosas y su relación con los contenidos de glucosa.**

Se ha propuesto que la asociación de las plantas con microorganismos supone una necesidad de mayor adquisición de nutrimentos por los tejidos demanda (Gupta y Kaur, 2005). Sin embargo, no se ha examinado si los cambios en los contenidos de carbohidratos se producen por la modificación en la expresión de sus transportadores de carbohidratos. Aunque sí se tienen reportes de que la colonización de las raíces con micorrizas como la invasión de *Medicago trunculata* por la micorriza *G. yersiforme* induce la expresión del transportador MtST1, sobre todo en las zonas que se encuentran altamente colonizadas por el hongo (Harrison, 1996). Un aumento en la transcripción de LeST3 de jitomate en las hojas y no en las raíces, se produce al infectar con *Glomus intraradices*, *Glomus mosseae* y *Phytophthora parasitica* (García-Rodríguez *et al.*, 2005). En el caso de la infección por patógenos en *Arabidopsis thaliana* y *Vitis vinífera* se tiene documentado que un transportador de los diferentes que contienen cada una de estas plantas es el que se incrementa en presencia del patógeno (Fotopoulos *et al.*, 2003; Hayes *et al.*, 2010). Lo anterior sugiere que el transporte de monosacáridos es importante para responder al incremento en la demanda de carbohidratos de las células colonizadas al alterarse su metabolismo de carbono.

Si observamos el gráfico comparado de los niveles de transcrito para el transportador ZmHT y los contenidos de glucosa podremos encontrar que hay tres fases durante la infección del hongo (Figura 25). Una fase entre las 0 y 12 h cuando hay un incremento sustancial de la cantidad del transcrito ZmHT, adelantándose 12 h en su expresión respecto al del embrión no infectado y una aparente disminución en el nivel de glucosa en el embrión infectado con *Fusarium*

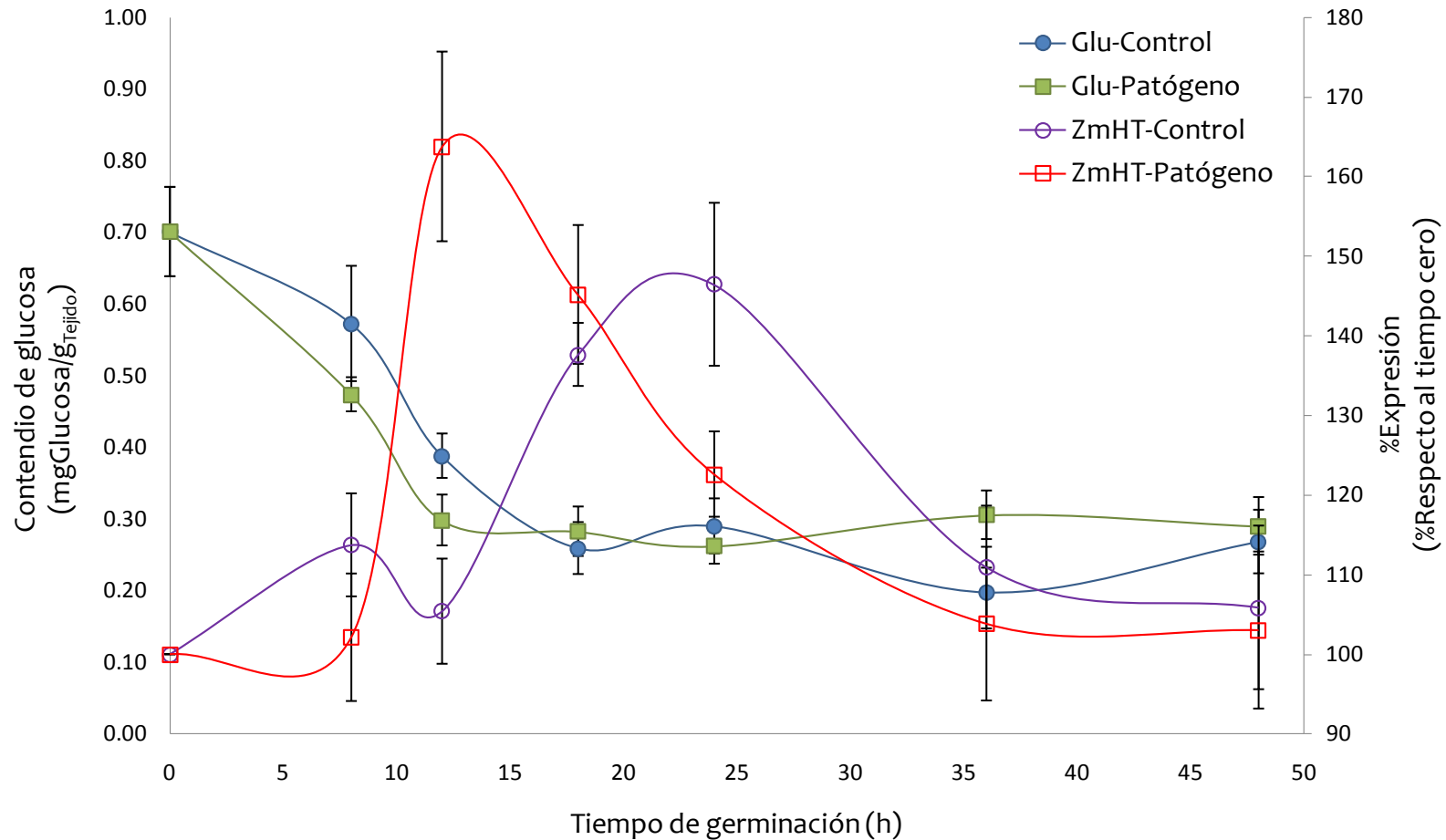


*verticillioides*. Probablemente, a tiempos cortos las células del embrión están intentando contender con la invasión por el patógeno, incrementando su capacidad de uso de glucosa y su transporte.

La segunda fase ocurre entre las 12 y 18 h, cuando empieza a degradarse el transcrito para ZmHT pero aún se mantiene en un nivel similar al de los embriones no infectados y con los niveles de glucosa también similares a los del control (Figura 25).

En la tercera fase entre las 18 y 48 h encontramos que el transcrito de ZmHT continua degradándose o reduciendo su síntesis hasta llegar a un nivel de transcrito menor al del control (2.1 veces más abajo), mientras que la concentración de glucosa se incrementa por arriba de los embriones sin infectar (1.5 veces más arriba). Lo anterior ocurre probablemente debido a que la sacarosa está siendo activamente hidrolizada y por eso observamos mayor contenido de glucosa que los embriones, sin embargo la glucosa es utilizada por el hongo más que por las células embrionarias, ya que la invasión del patógeno se está estableciendo. Las invertasas de la pared celular de las células embrionarias podrían estar produciendo la glucosa adicional que se observa cuando están siendo invadidas por el patógeno (Berger *et al.*, 2007; Fotopoulos *et al.*, 2003, Sturm 1999), no obstante, si se ha detectado el incremento simultáneo en la glucosa y las invertasas en la infección por patógenos, sin embargo, en un trabajo se encontró que la actividad de invertasa no provenía de la planta sino más bien del patógeno (Wahl *et al.*, 2010).

La disminución en la transcripción del gen para el transportador de hexosas puede deberse a que en general se ha afectado el mecanismo de transcripción. Estudios en ejes embrionarios en presencia de una de las toxinas del hongo, FB1, demuestran que la toxina es capaz de inducir la degradación del DNA del tejido embrionario. (Alcántara-Sánchez, 2008).



**Figura 25.-Comparación de los niveles del transcrito del transportador de hexosas ZmHT y los contenidos de glucosa en embriones control y con patógeno.** Para el contenido de glucosa n= 4 con 12 replicas, y para el % de Expresión n = 3. En ambos casos expresados en medias  $\pm$  desviación estándar. Glu=glucosa.



#### **IX.4 Efecto de la infección por *Fusarium verticillioides* en los niveles de los transcritos para el transportador de sacarosa y su relación con los contenidos de sacarosa.**

Para comparar el efecto del hongo en los transcritos del transportador de sacarosa con el contenido de sacarosa se compararon los datos en una sola gráfica (Figura 26). Encontramos al igual que ocurrió con el transcrito para el transportador de hexosas y el contenido de glucosa, tres fases de efecto de la invasión del hongo. La primera fase entre las 0 y 12 h en donde hay el adelanto en los niveles de transcrito de ZmSUT1 y una disminución en el uso de la sacarosa (Figura 26). Se ha reportado que el transportador de sacarosa aumenta durante la interacción con simbiontes (Flemetakis *et al.*, 2003). A pesar de que se incrementó el nivel de transcrito la cantidad de sacarosa es mayor en los embriones en presencia del patógeno, lo que supone una disminución en su uso, ya que las invertasas apoplásticas, citosólicas o vacuolares, así como la sacarosa sintetasa podrían haber sido afectadas por la presencia del hongo (Berger *et al.*, 2007). O bien que a pesar de que en la membrana hay transportadores de sacarosa, éstos son ineficientes en el transporte del azúcar, ya sea porque la bicapa lipídica está siendo afectada por el patógeno o porque otras proteínas transportadoras, como la ATPasa de protones se encuentre reducida en actividad. Se ha reportado que ambas posibilidades ocurren cuando los embriones son tratados con una micotoxina de *Fusarium*, la FB1, la reducción en la fluidez membranal y la inhibición aproximada del 35% de actividad de la enzima (Gutiérrez-Nájera *et al.*, 2005). Lo anterior podría explicar porque el embrión sigue sintetizando transcrito para el transportador, en un intento por tener más proteína en la membrana y cubrir sus necesidades de sacarosa.

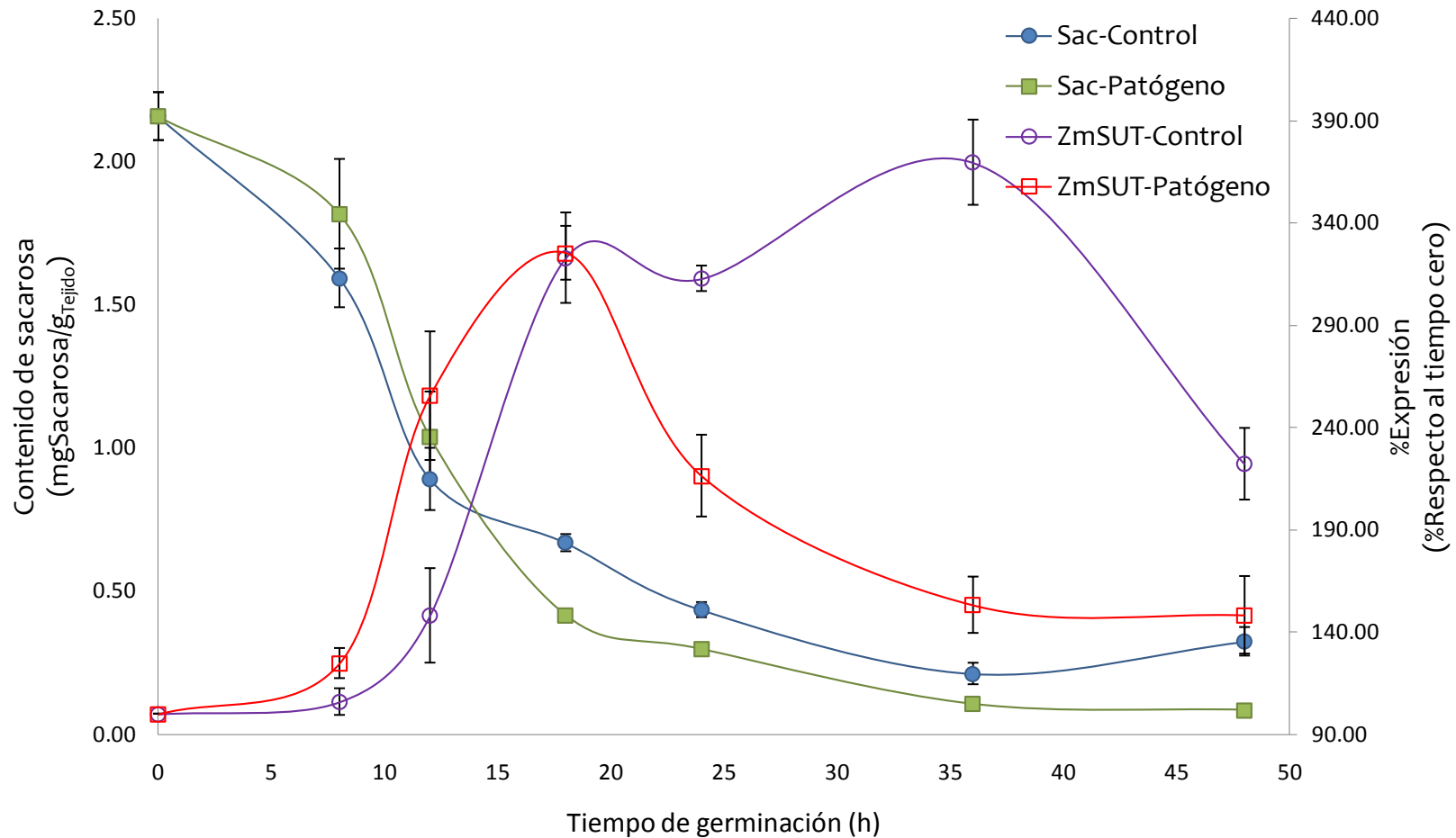
La segunda fase se encuentra entre las 12 y 18 h en donde los niveles de ZmSUT siguen incrementándose en presencia del hongo llegando a su máximo, además de que en este momento la concentración de sacarosa en el embrión infectado es menor que en el control. Es probable que ya se esté llevando activamente la





síntesis de proteína transportadora y su incorporación en la membrana por lo que la sacarosa se está usando. Sin embargo no podemos olvidar que también las invertasas se pueden estar activando.

Finalmente, la tercera fase que se encuentra entre las 18 y 48 h, cuando el transcrito ZmSUT decrece hasta llegar a niveles muy inferiores respecto al control (5.1 veces más abajo) y el contenido de sacarosa también está por debajo de la cantidad encontrada en el control (3.8 veces más abajo). Nuevamente tenemos que el hongo está siendo muy agresivo a estos tiempos.

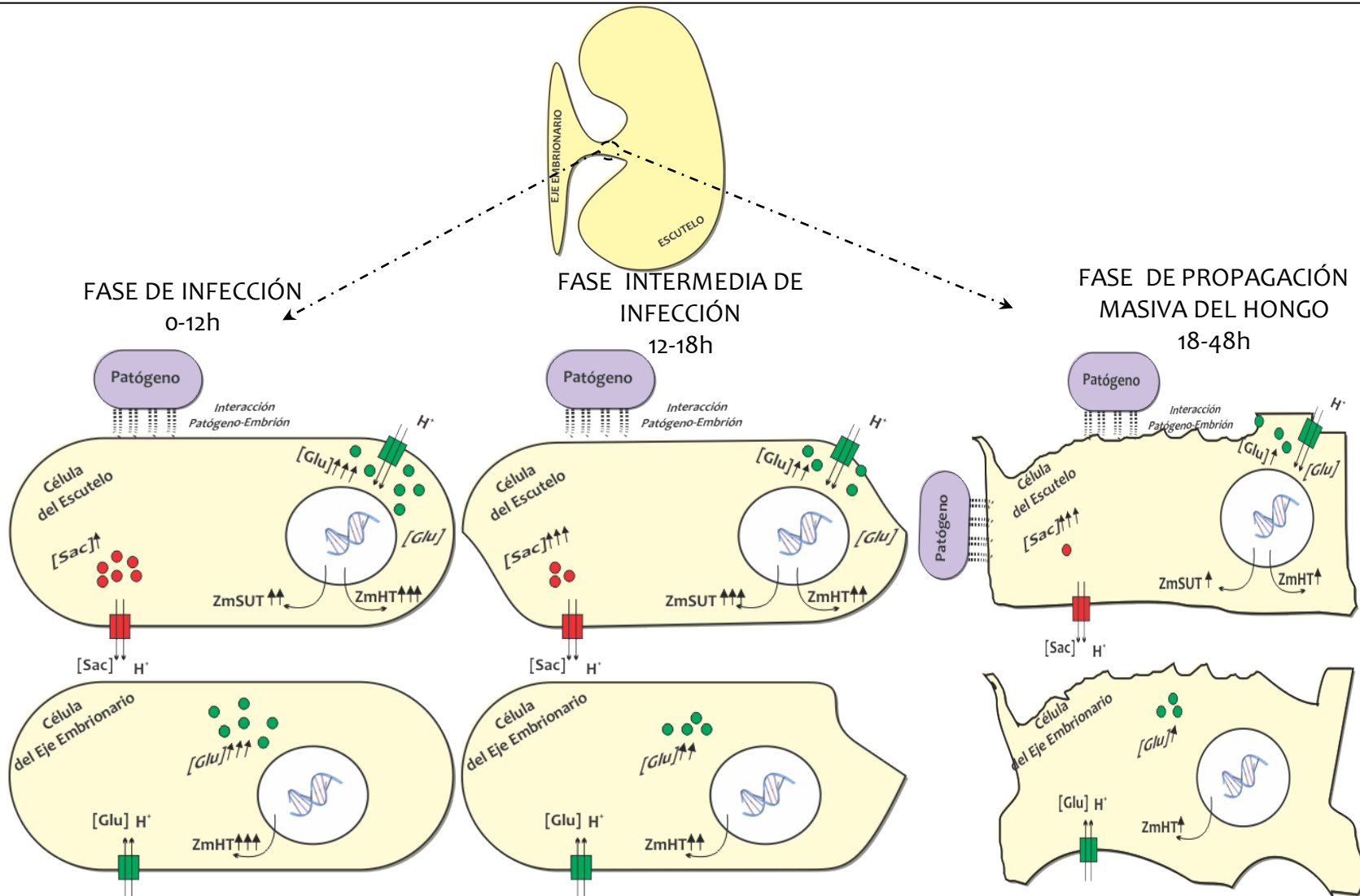


**Figura 26.- Comparación de los niveles del transcrito del transportador de sacarosa ZmSUT y los contenidos de sacarosa en embriones control y con patógeno.** Para el contenido de sacarosa n= 4 con 12 replicas, y para el % de Expresión n = 3. En ambos casos expresados en medias  $\pm$  desviación estándar Sac = sacarosa.

Los resultados los podemos resumir en la Tabla 7 y se describen en el modelo propuesto en la figura 27.

	Fase	ZmHT	ZmSUT	Glu	Sac
	0-12h	Se adelanta 12h. Máximo de expresión.	Se adelanta 6 h.	Uso mayor de glucosa.	Uso menor de sacarosa.
	12-18h	Disminuye la expresión.	Máximo de expresión. Comienzo de la degradación.	Concentración de glucosa similar al control	Uso mayor de sacarosa.
	18-48h	Prácticamente nula la expresión.	Prácticamente nula la expresión.	Uso menor de glucosa ( Mayor cantidad de glucosa)	Uso mayor de sacarosa

**Tabla 7.- Resumen de los resultados de los niveles de transcritos para el transportador de hexosas y el de sacarosa, así como su relación con los contenidos de glucosa y sacarosa.**



**Figura 27.- Modelo propuesto del consumo de carbohidratos y la expresión de los transportadores de carbohidratos ZmHT y ZmSUT. ↑ = Aumento de uso o aumento de expresión, Glu = glucosa y Sac = sacarosa.**



El modelo que proponemos (Figura 27) sugiere un uso coordinado entre la glucosa y la sacarosa, ya que en la Fase I o de Infección del Hongo se observó que la glucosa es la principal fuente de carbono, y la sacarosa se usa en menor cantidad en el embrión infectado. Mientras que lo opuesto ocurre en la Fase III o de Invasión Masiva del Hongo donde la sacarosa se encuentra disminuida probablemente por un aumento de las invertasas de pared celular del embrión o del hongo, ya que la cantidad de glucosa se incrementa, al inspeccionar los embriones infectados observamos que aumentó la biomasa del hongo, lo que indica que es el hongo el que probablemente esté aumentando el uso de la sacarosa. En cuanto a la expresión de los transportadores ZmHT y ZmSUT se encuentra también coordinada entre ellos, ya que en la Fase I aumenta la expresión de ZmHT y se adelanta, y en el máximo de expresión se observa un mayor uso de glucosa. También la expresión de ZmSUT se adelanta, sin embargo, el uso de la sacarosa se ve retrasado, probablemente el transcrito de ZmSUT necesita más tiempo para traducirse a proteína o bien la proteína tarda más tiempo en incorporarse a la membrana y ser activa. Mientras que en la Fase II o Intermedia de la invasión se iguala el uso de glucosa y se incrementa el de sacarosa, fase en la que todavía encontramos un nivel alto de transcrito de ZmSUT1 y en la Fase III o de Invasión del hongo se supera el uso de sacarosa, disminuyendo la concentración de sacarosa en el tejido.

En la Fase de Invasión masiva del hongo después de las 18 h de germinación y hasta las 48 h encontramos que la expresión de ambos transportadores disminuye siendo prácticamente nula, probablemente el hongo ha destruido la maquinaria de síntesis tanto de RNA como de proteínas, por lo que los transcritos de los transportadores desaparecen, el patógeno produce necrosis en el tejido embrional y/o las reservas de carbohidratos se están agotando.



## X. CONCLUSIONES

- *Fusarium verticillioides* aumenta el porcentaje de germinación de los embriones que infecta, al igual que la tasa de respiración, pues ésta aumenta en más del 300 % respecto al control a las 48 h de germinación.
- Se alteraron los niveles de carbohidratos por la presencia de *Fusarium verticillioides*, ya que en un inicio se utiliza mayormente las reservas de glucosa, en contraste con el aumento del uso de sacarosa al final de las 48 h.
- La detección *in situ* de glucosa demostró que en los embriones tratados con el patógeno, la movilización del carbohidrato inicia antes y se incrementa conforme avanza el tiempo de germinación, principalmente en la zona de la radícula.
- Los niveles de expresión de los transcritos se ven modificados tanto para el transportador putativo de hexosas, ZmHT, como para el transportador de sacarosa ZmSUT:
  - En el transportador putativo ZmHT su expresión aparece 6 h antes, con el pico máximo de expresión adelantado 12 h respecto al control.
  - Por su parte, en el transportador de sacarosa ZmSUT su expresión se adelanta 6 h y presenta el pico máximo 18 h antes respecto al control.



## XI. PERSPECTIVAS

1. –Para evaluar si el incremento de glucosa entre las 18 y 24 h proviene de del patógeno o del embrión determinar los niveles de actividad o RNA para:

- a) Las invertasas de los embriones.
- b) Las invertasas del patógeno.
- c) Los transportadores de hexosas del hongo

2.- Medir los contenidos de ABA en los embriones germinados con *Fusarium verticillioides* para explicar el aumento en el porcentaje de embriones germinados, pues se ha documentado que los niveles de ABA aumentan en las plantas adultas cuando patógenos fúngicos entran en contacto con ellas, ya que ABA induce las respuestas de defensa de la planta.

3.- Medir la actividad de transporte de hexosas y sacarosa de los embriones infectados con el patógeno.

4.- Evaluar el efecto de un patógeno que revierte los efectos de *Fusarium verticillioides* mediante la determinación de:

- a) El crecimiento radicular del embrión (tamaño y distancia).
- b) Obtención de las micrografías de barrido para evidenciar la interacción entre el embrión y los dos patógenos
- c) La restauración de la permeabilidad membranal a tiempos largos de la infección.
- d) La acidificación que se ha documentado que aumenta cuando *Fusarium* y *Trichoderma* se encuentran en el mismo tejido.
- e) La actividad de la bomba de protones ATPasa tanto para evaluar la capacidad de bombeo de protones de la célula.
- f) Los niveles de los transportadores de carbohidratos ZmSUT y ZmHT.



## XII. ANEXOS

### XII.1 Anexo I: *Reactivos y medios de cultivo y ensayo*

Reactivo	Modo de preparación	Comentarios
<b>Acetato de magnesio 1 M pH=4.5</b>	Para preparar 100 mL Acetato de magnesio 1 M, pesar 14.231 g de acetato de magnesio anhidro (MM=142.31 g/mol) y disolverlos en 100mL de agua desionizada. Ajustar el pH con NaOH.	
<b>Agar 1.0 %</b>	Para preparar 300.0 mL de agar al 1%, disolver 3.0 g en 100 mL de agua desionizada, caliente en microondas a intensidad media para disolver los grumos, agregue 200.0 mL de agua desionizada y esterilice por 45 min a 121°C a una presión de 1.1 Kg/cm <sup>2</sup> (15 lb/in <sup>2</sup> )	
<b>Agua-DEPC 0.1 %</b>	Para preparar 1 L de H <sub>2</sub> O-DEPC a 999.0 mL de agua estéril desionizada se le agrega 1.0 mL de DEPC (Dietileno pirocarbonato). Se coloca en agitación constante por una noche en un recipiente tapado, y al día siguiente se esteriliza el H <sub>2</sub> O-DEPC por 45 min a 121°C a una presión de 1.1 Kg/cm <sup>2</sup> (15 lb/in <sup>2</sup> )	Usar guantes
<b>Agua estéril desionizada</b>	Esterilizar agua desionizada en autoclave por 45 min a 121°C a una presión de 1.1Kg/cm <sup>2</sup> (15lb/in <sup>2</sup> )	





<b>Bromuro de Etídio 0.5 mg/mL</b>	En un tubo eppendorf de 1.5 mL agregar 50.0 $\mu$ L de Bromuro de Etídio 10 mg/mL y 950.0 $\mu$ L de agua estéril desionizada.	Sustancia altamente mutagénica. Usar guantes y desechar aquello que estuvo en contacto con el bromuro de etídio en los contenedores designados para ello.
<b>DTT 1 M</b>	100.0 mL de DTT (MM=154.25 g/mol) (ditiotreitól) 1 M, se preparan pesando 15.42 g de DTT y agregando 100.0mL de agua desionizada.	El DTT (ditiotreitól) es un agente reductor.
<b>EDTA 0.5 M pH=8.0</b>	Para preparar 500.0 mL de EDTA 0.5 M (Ácido etilendiamina tetra acético), se pesa 93.05 g de EDTA disódico (MM=372.2 g/mol) y se disuelven en 400.0 mL de agua estéril desionizada, la solución permanece turbia a continuación se ajusta el pH a 8.0 con NAOH concentrado, entonces se clarifica y se afora al volumen con 100.0 mL de agua estéril desionizada.	A pH 8.0 el EDTA permanece como una solución incolora.
<b>Etanol 80% para extraer carbohidratos</b>	Para preparar 100 mL de Etanol 80%, agregar 80 mL de etanol absoluto a un	



	frasco con tapa previamente esterilizado, y completar el volumen con 25 mL agua desionizada.	
<b>Etanol 75 % para extraer RNA</b>	Para preparar 100mL de etanol 75%, agregar 75 mL de etanol absoluto a un frasco con tapa previamente esterilizado, y completar el volumen con 25 mL de H <sub>2</sub> O-DEPC.	Usar guantes
<b>Gel de Agarosa 1 % con TBE</b>	Para un gel de 35.0 mL, pesar 0.350 g de agarosa y depositarlo en un matraz erlenmeyer estéril. Agregar 28.0 mL de H <sub>2</sub> O-DEPC, calentarlo en microondas a intensidad media por 45 s. Una vez tibio, se le adiciona 7.0 mL de TBE 5X y 35 µl bromuro de Etidio 0.5 mg/mL (1µL bromuro de Etidio 0.5 mg/mL por cada mL de gel).	Se deja gelificar en la campana
<b>Hipoclorito de Sodio 2.0 %</b>	Agregar 2.0 mL de hipoclorito de sodio comercial y 80 mL de agua estéril desionizada, a un matraz erlenmeyer o botella de 100 mL.	
<b>Invertasa 80 mg/mL</b>	Para preparar 1.0 mL de invertasa 80 mg/mL, pesar 80 mg de invertasa en un tubo eppendorf de 1.5 mL, agregar 1.0 mL acetato de magnesio 100 mM a pH de 4.5 y posteriormente filtrar.	Es necesario filtrar para eliminar lo no disuelto de la preparación de invertasa.



		Después de filtrar se obtiene menos de la mitad del volumen inicial. Por lo que se recomienda filtrar 500 $\mu$ L de acetato de magnesio primero para humedecer el filtro y posteriormente hacer pasar la solución de invertasa
<b>NBT 30 mM</b>	Preparación de 5.0 mL: Pesar 0.122 g de Nitroazul de tetrazolio (NBT) (MM=817.64 g/mol) y llevar a 5.0 mL con agua desionizada.	
<b>PDA 0.5 X (Papa Dextrosa Agar 0.5 X)</b>	Para preparar 250 mL de PDA al 0.5 X se disuelven en 50 mL de agua estéril desionizada 3.0 g de Papa Dextrosa Broth (PDB) 1X (24.0 <sup>g</sup> / <sub>L</sub> ), a continuación, se añaden 3.0 g de Agar para tener al final una concentración de agar al 1.2 %. Finalmente, se calienta en microondas a intensidad media para disolver los grumos, se afora a 250 mL con agua estéril desionizada y se esteriliza el medio preparado por 30 min a 121°C a una presión de 1.1 Kg/cm <sup>2</sup> (15 lb/in <sup>2</sup> )	Cada caja petri tiene una capacidad de 25 mL aproximadamente
<b>PGI (1.2 U/<math>\mu</math>L)</b>	La glucosa 6P isomerasa (PGI) usada en el ensayo de determinación de carbohidratos se prepara agregando a un	



	tubo eppendorf de 1.5 mL 27.6 $\mu$ L de PGI (861.68 U/mL) y añadiendo 172.4 $\mu$ L de agua estéril desionizada, para tener al final una concentración de 1.2U/ $\mu$ L de PGI.	
<b>SDS 10 %</b>	Para preparar 100.0 mL de esta solución se agrega a un recipiente o fracaso de vidrio 10.0 g de SDS (dodecil sulfato de sodio, detergente aniónico que solubiliza membranas, proteínas y tejidos) y se afora con 100.0 mL de agua estéril desionizada.	Usar guantes y cubrebocas ya que el SDS se dispersa fácilmente y produce picor.
<b>Solución Fijadora de tejido</b>	Para preparar 70 mL de Solución Fijadora, pesar 1.5 g de polivinilpirrolidona-40, 1.5 g de paraformaldehído y agregar 75 $\mu$ L de DTT 1M. Llevar a 70 mL con agua estéril desionizada.	
<b>Stock de glucosa 2 mg/mL</b>	Pesar 2.0 mg de glucosa en un tubo eppendorf de 1.5 mL y disolverlos con 1.0 mL de agua estéril desionizada.	Estándar de glucosa, almacenar a -20°C
<b>TBE 5X</b>	Para preparar 1.0 L de TBE (Tris-Borato-EDTA) 5X, se disuelven en 900.0 mL de agua estéril desionizada 54.0 g de TRIS Base (MM=121.14 g/mol) y 27.5 g de ácido bórico (MM=61.83 g/mol), posteriormente se le adiciona 20.0 mL de EDTA 0.5 M (pH=8.0) y se ajusta el volumen a 1 L. Se esteriliza por 45 min a 121°C a una presión de 1.1 Kg/cm <sup>2</sup> (15 lb/in <sup>2</sup> ) y se filtra utilizando una membrana de 0.22 $\mu$ m.	Utilizar botellas de vidrio estériles en todos los casos.



### **XIII.2 Anexo II: Preparación de material y recomendaciones**

#### **Material para realizar la extracción de RNA**

**Consideraciones generales:** Para extraer RNA siempre se debe utilizar guantes y cubrebocas, trabajar en la campana de extracción, además de que los reactivos que se utilicen siempre deberán estar fríos (mantenerlos en refrigeración o en hielo a 4°C). Se podrá detener el procedimiento de extracción cuando a las muestras se les haya agregado Trizol o etanol, sin embargo se recomienda terminar la extracción el RNA en una sólo sesión, y trabajar a lo máximo 6 muestras a la vez.

**Morteros.-** Para cada muestra o tratamiento se utiliza un mortero libre de RNAasas, para eliminar las RNAasas debe ser previamente tratado de la siguiente manera: Lavar el recipiente con agua y jabón, posteriormente agregar de 15.0 a 20.0 mL de hipoclorito de sodio comercial y lavar con él las paredes del mortero ayunándose del pistilo, a continuación el mismo hipoclorito de sodio se deja reposar por 15 min. Al finalizar el tiempo enjuagar con abundante agua el recipiente, secarlo muy bien, y adicionarle 3.0 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (realizar en campana de extracción), con el cual se lavarán nuevamente las paredes del mortero con el pistilo. Dejar reposar por 30 min el H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, desecharlo, enjuagar con H<sub>2</sub>O-DEPC, el mortero y el pistilo, para así poderlos secar y envolver en papel aluminio. Finalmente se esterilizan en una estufa a 180°C por una noche, al día siguiente se retiran de la estufa y una vez tibios se almacenan a -70°C.

**Puntas de micropipeta.-**Las que se utilizan cuando se trabaja con RNA se someten al siguiente tratamiento: Se llena de puntas un frasco de vidrio con tapa, se le agrega H<sub>2</sub>O- DEPC hasta el tope y se pone en agitación constante y moderada durante una noche, posteriormente se esterilizan por 45 min a 121°C a una presión de 1.1 Kg/cm<sup>2</sup> (15 lb/in<sup>2</sup>). Se les retira el agua y se secan en una estufa a 70°C por 1 día.



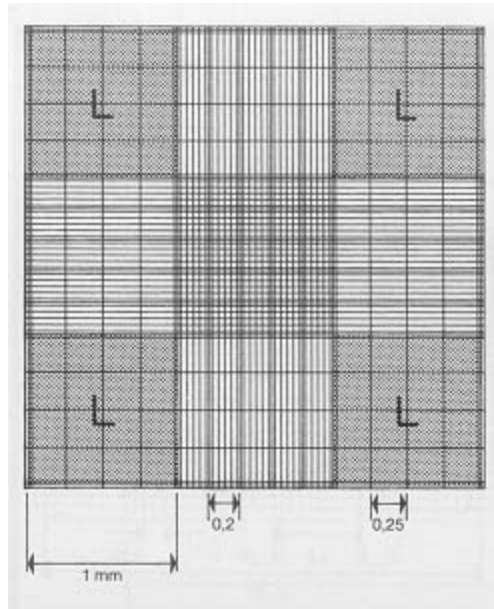
**Cámara de electroforesis.-** La cámara y los peines de ésta, que se utilicen para correr las muestras de RNA, se deberán lavar previamente con agua y una solución de SDS 10 %. La cámara se deja 30 min en agitación constante y moderada con SDS 10 %. Al finalizar el tiempo se enjuaga con H<sub>2</sub>O-DEPC. Cabe mencionar que siempre se trabajará con guantes y una vez limpia la cámara nunca se debe tocar con las manos desnudas.

### **XIII.3 Anexo III: Fórmulas y cálculos**

#### **Preparación y calibración del inóculo de *Fusarium verticillioides***

##### ***Fundamento***

La cámara de Neubauer es una cámara de conteo adaptada al microscopio de campo claro o al de contraste de fases. Se trata de un portaobjetos (Figura 28) con una depresión en el centro, en el fondo de la cual se ha marcado con la ayuda de un diamante una cuadrícula como la que se ve en la imagen. Es un cuadrado de 3 x 3 mm, con una separación entre dos líneas consecutivas de 0.25 mm. Así pues el área sombreada y marcada L corresponde a 1 mm<sup>2</sup>. La depresión central del cubreobjetos está hundida 0.1 mm respecto a la superficie, de forma que cuando se cubre con un cubreobjetos éste dista de la superficie marcada 0.1 mm, y el volumen comprendido entre la superficie L y el cubreobjetos es de 0.1 mm<sup>3</sup>, es decir 0.1 µL. (Universitat de Barcelona, 2010)



**Figura 28.- Vista de la Cámara de Neubauer 10X**

**Cálculos**

Se realizó la cuenta de conidios, el número promedio de conidios que fueron contabilizados en los cuatro cuadrantes (áreas L de la Cámara de Neubauer), fueron posteriormente aplicados en la siguiente relación matemática:

$$\frac{\text{Conidios}}{\text{mL}} = \frac{(\text{Promedio de Conidios})FD}{\text{Volumen del cuadrante}}$$

Donde el volumen del cuadrante es:

$$(\text{Lado L}) \times (\text{Lado L}) (\text{Depresión central}) = (1\text{mm})(1\text{mm})(0.1\text{mm}) = 0.1\text{mm}^3$$

En el que

$$\left( \frac{1000 \text{ mL}}{1000000 \text{ mm}^3} \right) (0.1 \text{ mm}^3) = 1.0 \times 10^{-4} \text{ mL}$$

Por tanto

$$(\text{Promedio de conidios})(FD) \left( 10^4 \text{ mL}^{-1} \right) = X \frac{\text{conidios}}{\text{mL}}$$

↑
↑

Factor de Dilución empleado      Factor de corrección de la Cámara de Neubauer (volumen del cuadrante)



Entonces, supongamos que:

Promedio de Conidios = 52 conidios

$$FD = \frac{1000}{10} \text{ (en general siempre se sugiere esta dilución)}$$

Por tanto

$$(52 \text{ conidios}) \left( \frac{1000}{10} \right) (10^4) = 5.2 \times 10^7 \text{ conidios/mL}$$

Pasamos la concentración en términos de  $\mu\text{L}$  y queda que:

$$\left( \frac{5.2 \times 10^7 \text{ conidios}}{\text{mL}} \right) \left( \frac{1 \text{ mL}}{1000 \mu\text{L}} \right) = 52\,000 \text{ conidios}/\mu\text{L}$$

Sabemos que cada embrión de maíz necesita 10  $\mu\text{L}$  de inóculo que contengan 60000 conidios, por lo que:

$$10 \mu\text{L} \rightarrow 60000 \text{ conidios, es decir } \frac{60\,000 \text{ conidios}}{10 \mu\text{L}} = 6000 \text{ conidios}/\mu\text{L}$$

Si suponemos que inocularemos 30 embriones de maíz, entonces necesitamos 300  $\mu\text{L}$  de inóculo, ya que:

$$\left( \frac{10 \mu\text{L de inóculo}}{1 \text{ embrión de maíz}} \right) (30 \text{ embriones de maíz}) = 300 \mu\text{L}$$

Ahora sólo resta aplicar la siguiente relación:

$$C_1 V_1 = C_2 V_2$$

Donde:

$C_1$  = Concentración inicial de conidios (*después de resuspender el pellet*)

$C_2$  = Concentración final de conidios (*concentración del inóculo*)

$V_1$  = ?

$V_2$  = Volumen a preparar de inóculo





Por tanto:  $V_1 = \frac{C_2 V_2}{C_1}$

$$C_1 = 52\,000 \text{ conidios}/\mu\text{L}$$

$C_2 = 6500 \text{ conidios}/\mu\text{L}$  (usamos esta concentración en vez de  $6000 \text{ conidios}/\mu\text{L}$  para asegurarnos que al menos haya  $60\,000$  conidios por cada  $10 \mu\text{L}$  de inóculo)

$$V_1 = ?$$

$V_2 = 1000 \mu\text{L}$  (se prepara esta cantidad en vez de  $300 \mu\text{L}$  ya que no se recomienda preparar exactamente el volumen justo necesario, además de que el inóculo sobrante es viable para utilizarse hasta por una semana después de su preparación)

Por tanto:

$$V_1 = \frac{(6500 \text{ conidios}/\mu\text{L})(1000 \mu\text{L})}{(52\,000 \text{ conidios}/\mu\text{L})} = 125 \mu\text{L de suspensión concentrada de conidios}$$

Por lo que para **1000  $\mu\text{L}$**  de inóculo se necesitan: **875  $\mu\text{L}$**  (agua estéril desionizada)+ **125  $\mu\text{L}$**  (suspensión concentrada de conidios)

### Cálculos para la determinación de RNA extraído:

Suponiendo que la lectura de absorbancia fue de 1.658, tenemos que:

$$\left( \frac{40 \mu\text{g}/\text{mLRNA}}{1 \text{ unidad de Abs}_{260\text{nm}}} \right) 1.658 \text{ unidades de Abs} = 66.32 \mu\text{g}/\text{mL de RNA}$$

$$\left( 66.32 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \right) (\text{Factor de Dilución}) = \left( 66.32 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} \right) \left( \frac{50.0 \mu\text{L}}{5.0 \mu\text{L}} \right) = 663.2 \mu\text{g}/\text{mL}$$

$$\left( \frac{1 \text{ mL de RNA}}{663.2 \mu\text{g}} \right) (1.0 \mu\text{g}) = 1.507 \times 10^{-3} \text{ mL} = 1.5 \mu\text{L de RNA Extraído.}$$

Por lo tanto para el primer ajuste de esta muestra, se hace con  $1.5 \mu\text{L}$  de RNA extraído.



### Determinación de carbohidratos solubles: *Deducción de la ecuación*

$$\text{mg de glucosa} = \frac{\begin{array}{l} \text{Diferencia de} \\ \text{absorbancias} \end{array} \downarrow \begin{array}{l} \text{Volumen de ensayo} \\ \downarrow \end{array} \begin{array}{l} \text{molecular de glucosa} \\ \downarrow \end{array} \begin{array}{l} \text{Volumen de la suspensión} \\ \downarrow \end{array}}{\begin{array}{l} \left( \frac{6.22 \times 10^3 \text{ mL}}{\text{mmol cm}} \right) \uparrow \begin{array}{l} \text{Coeficiente de extinción} \\ \text{molar del NADH por 1} \\ \text{cm de paso de luz.} \end{array} \begin{array}{l} \text{Volumen de la} \\ \text{muestra empleada} \\ \uparrow \end{array} \begin{array}{l} \text{mL de la muestra} \end{array} \begin{array}{l} \text{g de tejido molido} \end{array}} (\Delta \text{Abs})(0.212 \text{ mL}) \left( \frac{180.2 \text{ mg}}{\text{mmol}} \right) (\text{mL de suspensión})$$

Por tanto, si efectuamos las operaciones pertinentes de los valores constantes tenemos:

$$\text{Glucosa X} = \frac{(\text{Abs}_m - \text{Abs}_b)(0.00614)(\text{Fd})(\text{Vol}_{\text{susp}})}{(\text{Vol}_{\text{muestra}})(*g_{\text{tejido}})} = \text{mg}/g_{\text{tejido}}$$

Donde:

$\text{Abs}_m$  = absorbancia de la muestra

$\text{Abs}_b$  = absorbancia del blanco

Fd = Factor de dilución ( Adimensional, usar sólo si se diluyó la muestra)

$\text{Vol}_{\text{susp}}$  = Volumen de la suspensión

$\text{Vol}_{\text{muestra}}$  = Volumen empleado de la muestra problema.

### Ensayo de respiración (oximetría)

Una vez efectuado el ensayo utilizando el Oxímetro 5300 A Oxigenmonitor, se obtendrá un registro gráfico como el que a continuación se ilustra en la Figura 29:

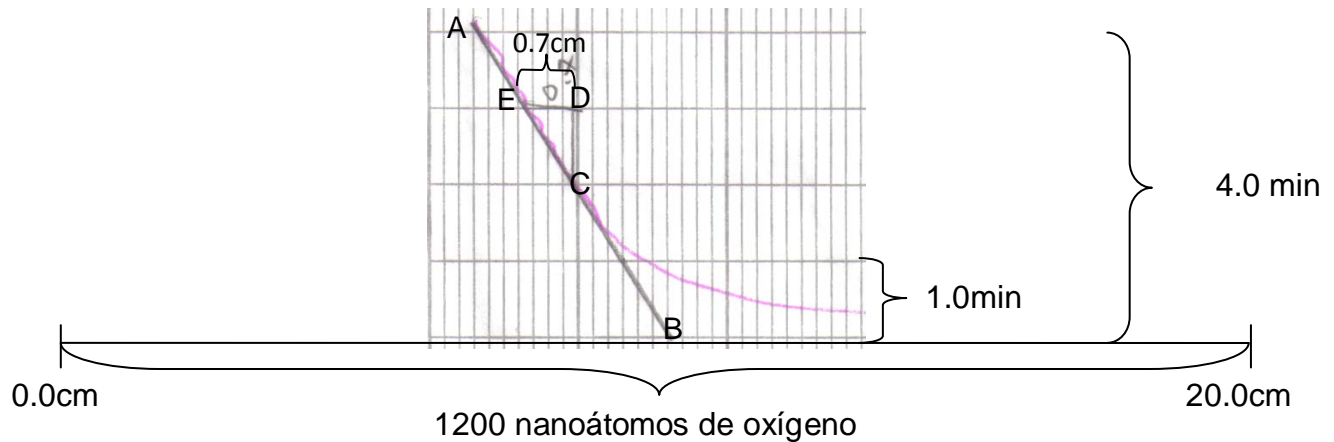


Figura 29.- Registro gráfico de respiración de un embrión de maíz.

Para obtener el consumo de  $O_2$ , se aplica la siguiente ecuación:

$$\text{Consumo de } O_2 = \frac{(1200 \text{ nanoátomos de } O_2)(60 \text{ min})(\epsilon)}{(20 \text{ cm})(1 \text{ h})(1 \text{ min})(\text{Número de embriones})}$$

Donde:

1200 nanoátomos/20cm = Corresponden al número de nanoátomos de  $O_2$  en 20 cm de la escala del papel graficador.

$\epsilon$  = La distancia en centímetros que se obtiene en la pendiente del trazo problema y que corresponde al número de nanoátomos de  $O_2$  consumidos por el embrión en 1 min, en donde para obtener dicho dato primero se traza una línea pendiente que atraviese la mayor parte de los puntos que se graficaron (A-B), posteriormente se traza, hacia arriba, una línea recta de 1.0 cm (representa 1.0 min en el papel graficador) desde cualquier punto de la pendiente trazada (C-D), y la distancia entre el final de la línea recta de 1 cm que se trazo, hasta el punto que en el toca la pendiente (D-E) corresponden a los nanoátomos de  $O_2$  consumidos por el embrión en 1 min. En este caso  $\epsilon = 0.7 \text{ cm}$



### XIII. REFERENCIAS

- Alcántara-Sánchez, F. 2008 Efecto de la micotoxina fumonisina B1 sobre la integridad del ADN genómico de ejes embrionarios de maíz (*Zea mays L.*) durante la germinación. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias. UNAM.
- Bacon, C. W; Porter J.K; Norred, W.P y Leslie J. F. 1996. Production of fusaric acid by *Fusarium* species. *Applied and Environmental Microbiology*.62:4039-4043.
- Barron,D.1997. RNAgents total RNA isolation system. *Promega Notes Magazine*.61: 33pp.
- Baud, S y Graham, I. A. 2006. A spatiotemporal analysis of enzymatic activities associated with carbon metabolism in wild-type and mutant embryos of *Arabidopsis* using *in situ* histochemistry. *The Plant Journal*. 46:155–169.
- Bennett,J.W y Klich M. 2003.Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*.16:497-516.
- Berger, S; Sinha, A.K y Roitsch, T. 2007. Plant physiology meets phytopathology: plant primary metabolism and plant–pathogen interactions. *Journal of Experimental Botany*. 58:4019–4026.
- Bewley, D. 1997. Seed germination and dormancy. *The Plant Cell*. 9:1055-1066.
- Bewley, D y Black, M.1994. *Physiology of development and germination*. 2<sup>nd</sup> Edition Plenum Press. N.Y.USA.1-2 pp.
- Bewley, D ; Black, M y Halmer, P.2006. *The encyclopedia of the seeds: science, technology and uses*. Cromwell Press. 21pp.



- Bonifaz, A.J.2010. Micología médica básica. 3ª Edición. Mc Graw Hill. México, México. 7-29,49-50 pp.
- Bove, J;Jullien, M y Grappin G.2001. Functional genomics in the study of seed germination. *Genome Biology*. 3:1002.1–1002.5.
- Bradford, K.J.2004. Germination: imbibition, activation and reserve mobilization. In *Seed Production and Quality*:85-94pp.
- Bush, J.B.2001. *Fusarium verticillioides* infection, fumonisin contamination and resistance evaluation in North Carolina maize. Tesis de Maestría en Ciencias. North Carolina State University.
- Büttner, M.2007.The monosaccharide transporter(-like) gene family in Arabidopsis. *FEBS Letters*.581: 2318–2324.
- Cantu, Dario; Vicente, A.R; Labavitch, J. M; Bennett, A. B y Powell, A. L.T.2008.Strangers in the matrix: plant cell walls and pathogen susceptibility. *Trends in Plant Science*. 13:610-617.
- Carpaneto, A; Geiger, D; Bamberg, E; Sauer, N; Fromm, J y Hedrich, R. 2005. Phloem-localized, proton-coupled sucrose carrier ZmSUT1 mediates sucrose efflux under the control of the sucrose gradient and the proton motive force. *Journal of Biological Chemistry*. 280: 21437-21443.
- Carter,L.L.A; Leslie, J.F y Webster R.K. 2008. Population structure of *Fusarium fujikuroi* from California rice and water grass. *Phytopathology*.98:992-998.
- Catalogue of life .2010. Árbol taxonómico del género *Fusarium*.  
<http://www.catalogueoflife.org/annual-checklist/2010/browse/tree/id/2264485>



- Centro Internacional de Mejoramiento del Maíz y el Trigo (CIMMYT).2010. Lista de Plagas y enfermedades del maíz.  
[http://maizedoctor.cimmyt.org/index.php?option=com\\_content&view=article&id=264&Itemid=51&lang=es](http://maizedoctor.cimmyt.org/index.php?option=com_content&view=article&id=264&Itemid=51&lang=es)
- Dae Lim, J; Cho, J; Park, Y; Hahn, T-R; Choi, S-B y Seong, J. Sucrose transport from source to sink seeds in rice.2006. *Physiologia Plantarum*. 126:527-584.
- Delrot, S; Atanassova, R;Gomés, E y Coutos- Thévenot, P.2001.Plasma membrane transporters: a machinery for uptake of organic solutes and stress resistance. *Plant Science*.161:391–404
- Desjardins, A. E.2003. *Gibberella* from A (*Venaceae*) to Z(*Eae*). *Annual Review of Phytopathology*.41:177–198.
- Desjardins, A. E y Hohn, T. M.1997. Mycotoxins in plant pathogenesis. *Molecular Plant-Microbe Interactions*.10:147-152.
- Desjardins,A.E y Plattner, R.D.2000. Fumonisin B<sub>1</sub>-nonproducing strains of *Fusarium verticillioides* cause maize (*Zea mays*) ear infection and ear rot. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48:5773-5780.
- Doctor Fungus. 2010. *Fusarium spp*. <http://www.doctorfungus.org/thefungi/fusarium.htm>
- Duncan, K. E y Howard, R. J. 2010. Biology of maize kernel infection by *Fusarium verticillioides*. *The American Phytopathological Society*. 23: 6-16.
- Flaherty, J.E y Woloshuk, C.P. 2004. Regulation of fumonisin biosynthesis in *Fusarium verticillioides* by a zinc binuclear cluster-type gene, *ZFR1*. *Applied and Environmental Microbiology*. 70: 2653–2659.



- Flemetakis, E; Dimou, M; Cotzur, D; Efrose, R; Aivalakis, G; Colebatch, G; Udvardi, M; Katinakis, P.2003. A sucrose transporter, LjSUT4, is up-regulated during *Lotus japonicus* nodule development. *Journal of Experimental Botany*. 54: 1789-1791.
- Food and Agriculture Organization (FAO),1992. El maíz en la nutrición humana. <http://www.fao.org/docrep/t0395e/T0395E02.htm>
- Fotopoulos, V; Gilbert, M.J; Pittman, J.K; Marvier, A.C; Buchanan, A.J; Sauer, N; Hall, J.L y Williams, L.E. 2003. The monosaccharide transporter gene, AtSTP4, and the cell-wall invertase, At $\beta$ fruct1, are induced in arabidopsis during infection with the fungal biotroph *Erysiphe cichoracearum*. *Plant Physiology*.132: 821–829.
- García-Rodríguez, S; Pozo, M.J; Azcón-Aguilar, C y Ferrol, N. 2005. Expression of a tomato sugar transporter is increased in leaves of mycorrhizal of *Phytophthora parasitica*-infected plants. *Mycorrhiza*. 15: 489-496
- GeoChembio.2010. *Zea Mays*, kernel anatomy. <http://www.geochembio.com/biology/organisms/maize/>
- Glenn, A.E; Richardson, E.A y Bacon, C.W. 2004. Genetic and morphological characterization of *Fusarium verticillioides* conidiation mutant. *Mycologia*. 96:968-980.
- Gómez-Calderas, A. 2008. Regulación de la expresión de los transportadores de carbohidratos en la germinación de maíz. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM.
- Granjo, C. A; Alves dos Reis, T; Gambale W y Correa B. 2007.Morphogenesis and growth kinetics of *Fusarium verticillioides*.*Mycopathologia*.164:119–126.



- Gupta, A. K y Kaur, N. 2005. Signal transduction pathways under abiotic stresses in plants. *Current Science*. 88:1771-1780.
- Gutiérrez- Najera, N; Muñoz-Clares, R; Palacios-Bahena, S; Ramírez, J; Sánchez-Nieto, S; Plasencia, J y Gavilanes-Ruíz, M. 2005. Fumonisin B<sub>1</sub>, a sphingoid toxin, is a potent inhibitor of the plasma membrana H<sup>+</sup>-ATPase. *Planta*.221:589-596.
- Harrison M. 1996. A sugar transporter from *Medicago trunculata*: altered expression pattern in roots during vesicular-arbuscular (VA) mycorrhizal associations. *Plant Journal*.9: 491-503.
- Hayes, M. A; Feechan, A y Dry, IB. 2010. Involvement of abscisic acid in the coordinated regulation of a stress-inducible hexose transporter (VvHT5) and a cell wall invertase in grapevine in response to biotrophic fungal infection. *Plant Physiology*. 153: 211-221.
- Isaac, S. 1992. Fungal-plant interactions. Chapman & Hall. Londres, RU. 229pp.
- Jackson, M.A; Stewart, J.N; Peterson, R.E y Slininger P.J.1990. Fusarin C purification and measurement in submerged cultures of *Fusarium moniliforme* by high-performance liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.38:1511-1514.
- Kumar,M; Yadav,V; Tuteja, N y Johri, A.K.2009. Antioxidant enzyme activities in maize plants colonized with *Piriformospora indica*. *Microbiology* 155: 780-790.
- Lamberts, H; Chapin, F.S y Pons, T.L.2008. *Plant Physiological Ecology*. 2<sup>nd</sup> Edición. Springer. N.Y. USA. 154pp.
- Lemoine, R.2000. Sucrose transporters in plants: update on function and structure. *Biochimica et Biophysica Acta* .1465: 246-262.





- Leslie, J; Summerell, B y Bullock, S. 2006. The *Fusarium* laboratory manual. Editorial Blackwell Publishing, Iowa, EUA. pp 274-278.
- Liu, Y; Liu, H; Pan, Q; Yang, H; Zhan, J y Huang, W. 2009. The plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase is related to the development of salicylic acid-induced thermotolerance in pea leaves. *Planta*. 229:1087-1098.
- Logrieco, A; Moretti, A; Castella G; KostECKI, M; Golinski, P; Ritieni, A y Chelkowski J. 1998. Beauvericin production by *Fusarium* species. acid by *Fusarium* species. *Applied and Environmental Microbiology*. 64:3084-43088.
- Lu, J.M y Bush, D. R. 1998. His-65 in the proton-sucrose symporter is an essential amino acid whose modification with site-directed mutagenesis increases transport activity. *Proceedings of the National Academy Science of the United States of America*. 95:9025-9030.
- Luna-Löaiza V. 2010. Efecto de *Fusarium verticillioides* sobre el metabolismo de carbono en embriones germinados de maíz. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM.
- Mackean, D. G. 2010. Maize plant. <http://www.biology-resources.com/drawing-plant-flower-15-maize-plant.html>
- Martínez-Marcelo V. 2008. Expresión de la actividad de las invertasas ácidas en la germinación de tejido embrionario de maíz en carbohidratos metabolizables y su relación con el contenido de carbohidratos. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM.
- Mazzoni, E y Battilani P. 2009. Pyrethroids and the food chain – mycotoxin management. *Bayer Crop Science Journal*. 62: 227-242.



- Munkvol, G. P y Desjardins A. E. 1997. Fumonisin in maize. can we reduce their occurrence?. *Plant Disease*. 81 (6):556-565.
- Nelson, P. E; Desjardins, A. E y Plattner, R.D.1993. Fumonisin, mycotoxin produced by *Fusarium* species: biology, chemistry, and significance. *Annual Review of Phytopathology*. 31:233-252.
- Nelson, P.E; Dignani,C y Anaissie E.J. 1994. Taxonomy, biology, and clinical aspects of *Fusarium* species. *Clinical Microbiology Reviews*. 7:479-504.
- Primurlyn. 2010. Stains files, nitro azul de tetrazolio.  
<http://stainsfile.info/StainsFile/dyes/nbt.htm>
- Pritchard, S.L; Charlton, W. L; Baker, A y Graham, I.A. 2002. Germination and storage reserve mobilization are regulated independently in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*. 31: 639-647.
- Pucheta- Díaz, M; Flores, A;Rodriguez, S y De la Torre, M. 2006. Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos. *Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal*. 31:856-860.
- Rabie, C.J; Marasas, W. F.O; Thiel P.G; Lubben, A y Vlegaar.1982. Moniliformin production and toxicity of different *Fusarium* species from Southern Africa. *Applied and Environmental Microbiology*.43:517-521.
- Ramakrishna,V y Rao, P.R. 2005. Axial control of protein reserve mobilization during germination of indian bean (*Dolichos lablab L.*) seeds. *Acta Biologica Szegediensis*. 49:23-27.



- Ramírez- Sóstenes, J.L. 2008. Alteraciones en el metabolismo de carbono durante priming natural de semillas de *Opuntia tomentosa*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM.
- Ramírez-Verdejo S. 2010. Detección *in situ* de la expresión diferencial de los transportadores de azúcares en los tejidos embrionarios de maíz y su posible regulación por carbohidratos. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM
- Rodriguez, I. P y Barrera, H. A.2004. La reacción en cadena de la polimerasa a dos décadas de su invención. Ciencia UANL. 7: 323-335.
- Roitsch, T.1999.Sourec-sink regulation by sugar and stress. Plant Biology.2:198-206.
- Ruíz-Medrano, R; Xoconostle-Cázares, B y Lucas, W.J.1996. Phloem long distance transport of CmNACP mRNA: implications for supracellular regulation in plants. Developments. 26: 4405-4419.
- Rutherford, R.S; Van Antwerpen, T;Conlong, D.E; Keeping, M,G; McFarlane, S. A y Vogel, J. L. 2002. Promoting plant health: potential for the use of plant-associated micro organisms in the biological control of pathogens and pests in sugarcane. Proceedings Congress of the South African Sugar Technologists Association 76:289-300.
- Sánchez- Nieto, Sobeida.1999. Estudio de los factores que influyen en la actividad de la ATPasa de H<sup>+</sup> de la membrana plasmática de embriones de maíz, durante la germinación temprana. Tesis de Doctorado. Facultad de Química. UNAM.
- Sánchez-Rangel, D. 2003. Aislamiento y detección de *Fusarium verticillioides* y de fumonisinas en maíz (*Zea mays*). Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM.



- Sánchez-Rangel, D; San Juan-Badillo, A y Plasencia, J. 2005. Fumonisin production by *Fusarium verticillioides* strains isolated from maize in Mexico and development of a polymerase chain reaction to detect potential toxigenic strains in grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53:8565–8571.
- Scott, P.M; Abbas, H.K; Mirocha, C.J; Lawrence G.A y Weber D. 1987. Formation of moniliformin by *Fusarium sporotrichioides* and *Fusarium culmorum*. *Applied and Environmental Microbiology*. 53:196-197.
- Shiratake, K. 2007. Genetics of sucrose transporter in plants. *Gene, genomes and genomic*. Global Science Books. 73-78.
- Sigma. 2010. Glucose (HK) assay kit. Technical bulletin. [http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=es&N4=G3293|SIGMA&N5=SEARCH\\_CONCAT\\_PNO|BRAND\\_KEY&F=SPEC](http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=es&N4=G3293|SIGMA&N5=SEARCH_CONCAT_PNO|BRAND_KEY&F=SPEC)
- Slewisinski, T. L; Meeley, R y Braun D. M. 2009. Sucrose transporter1 functions in phloem loading in maize leaves. *Journal of Experimental Botany*. 60: 881–892.
- Srivastava, L.M. 2002. *Plant growth and development: hormones and environment*. Academic Press. San Diego, EUA. 447-464 pp.
- Strable, J y Scanlon M. 2009. *Maize (Zea mays): a model organism for basic and applied research in plant biology*. Cold Spring Harbor Protocols. 1-10.
- Sturm, A. 1999. Invertases. primary structures, functions, and roles in plant development and sucrose partitioning. *Plant Physiology*. 121:1–7.
- Talbot, Nicholas J. 2010. Living the sweet life: how does a plant pathogenic fungus acquire sugar from plants?. *Plos Biology*. 8:1-3.



Universitat de Barcelona. 2010. Técnicas de contaje celular.  
<http://www.ub.es/biocel/wbc/tecnicas/contajecelular.htm>

Vaughn, M. W; Harrington, G.N y Bush, D.R.2002. Sucrose-mediated transcriptional regulation of sucrose symporter activity in the phloem. Proceedings of the National Academy of Science. 99: 10876–10880.

Vincent, P. L. D. 2002. *Zea mays* (maize, corn). Encyclopedia of Life Sciences.1-7.

Wade, L.G.2004. Química orgánica. 5ª Edición. Madrid, España.1061pp.

Wahl, R; Wippels, K; Goos, S; Kämper y Sauer, N. 2010.A novel high-affinity sucrose transporter is required for virulence of the plant pathogen *Ustilago maydis*. Plos Biology. 8:1-11.

Wan Norhasima, W.M; Abdulamir, A. S; Abu Bakar , F; Son, R y Norhafniza, A. 2009. The health and toxic adverse effects of *Fusarium* fungal mycotoxin, fumonisins, on human population. American Journal of Infectious Diseases. 5: 283-291.

Warner Instruments.2010. Sensor de Oxígeno.  
[http://www.warneronline.com/product\\_info.cfm?id=375](http://www.warneronline.com/product_info.cfm?id=375)

Williams, L.E; Lomoine, R y Sauer, N.2000. Sugar transporter in higer plants-a diversity of roles and complex regulation. Trends in Plant Science.5:283290.

Wilson, L. M; Whitt, S.R; Ibañez, A.M; Rocheford, T. R;Goodman, M,M y Buckler, E.S. 2004. Dissection of maize kernel composition and starch production by candidate gene association. The Plant Cell.16: 2719–2733.



Yescas, K.R. 2001. Fumonisin, toxins contaminantes de maíz, producidas por *Fusarium* spp. Propiedades, incidencia y análisis. Trabajo Monográfico de Actualización de la Licenciatura. Facultad de Química. UNAM.

Zavala-Zendejas S. 2001. Caracterización del simportador sacarosa/H<sup>+</sup> en la germinación del maíz. Patrón de la proteína y de la actividad. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM.