



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

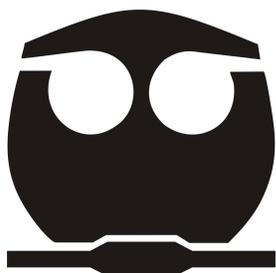
Efecto de las bases esfingoideas sobre
el desarrollo de *Fusarium verticillioides*
y la producción de fumonisinas.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA DE ALIMENTOS

P R E S E N T A :

MYRNA AGUILAR ESTEVEZ



MÉXICO, D.F.

2011



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**Efecto de las bases esfingoideas sobre el desarrollo de *Fusarium
verticillioides* y la producción de fumonisinas.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA DE ALIMENTOS

P R E S E N T A :

MYRNA AGUILAR ESTEVEZ

MÉXICO, D.F.

2011

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: Prof. Blas Lotina Hensen
VOCAL: Prof. Sobeida Sanchez Nieto
SECRETARIO: Prof. F. Javier Plasencia de la Parra
1° SUPLENTE: Prof. Gloria Diaz Ruiz
2° SUPLENTE: Prof. Perla Deyanira Maldonado Jiménez

El presente trabajo se realizó en el laboratorio 101 del Departamento de Bioquímica, Edificio E, de la Facultad de Química de la UNAM, bajo la dirección del Dr. F: Javier Plasencia de la Parra y la supervisión técnica de la M.C. Diana Sánchez Rangel.

DR. FRANCISCO JAVIER PLASENCIA DE LA PARRA
ASESOR

M.C. DIANA SÁNCHEZ RANGEL
SUPERVISORA TÉCNICA

MYRNA AGUILAR ESTEVEZ
SUSTENTANTE

AGRADECIMIENTOS

•

La presente tesis forma parte del proyecto CONACYT 50503, *Respuesta de defensa contra patógenos en semillas en germinación: Infección de maíz por Fusarium verticillioides*.

Myrna Aguilar Estevez recibió beca tesis del proyecto CONACYT 50503Z durante parte de la realización de este trabajo.

Se agradece el apoyo técnico en la implementación de técnicas de Biología Molecular a la M.C. MA. MANUELA NÁJERA MARTÍNEZ, Depto. de Bioquímica, Facultad de Química, UNAM.

Se agradece el apoyo técnico de la Q. LAUREL FABILA IBARRA, Depto. de Bioquímica, Facultad de Química, UNAM.

Se agradece a la L.E.M. Karla Méndez de VWR INTERNATIONAL el generoso donativo de la columna PUROSPHER® STAR RP18 empleada en este trabajo.

AGRADECIMIENTOS

Cuando quieres algo, todo el universo conspira para que realices tu deseo.

[Paulo Coelho](#)

- A los que están
 - A los que ya no están
 -muchas gracias.

Primero que nada quiero agradecer a Dios y a la vida por la oportunidad que me han dado.

A mis padres Manuel y Myrna, por enseñarme que el que persevera alcanza y que cuando te caes no pasa nada, lo importante es lo que aprendes cuando te levantas y sigues adelante.

Mami, muchas gracias por todos tus consejos y por apoyarme en todas mis locuras.

Papi te quiero, gracias por alentarme, por tu ejemplo de perseverancia y por todo.

GRACIAS por todos los hermosos recuerdos de mi infancia, gracias porque gracias a ustedes llegue hacer el ser humano que soy, pero sobre todo gracias por ser como son, los mejores padres

Enana, gracias por ser mi compañera y por probar todos mis experimentos, eres lo mejor y cuando me necesites estaré junto a ti, así como tú has estado para mi te quiero.

A mis abitos, Manuel[†] y Virginia, por enseñarme con amor y paciencia el mundo de las letras y los números por ser mi consuelo en tiempos difíciles y por sus buenos consejos. Muchas gracias. Abo al fin termine la tesis y seguro estarás muy orgulloso.

A mi abue Elia por todo su cariño y ejemplo de fortaleza, y en general a toda mi familia por creer en mí.

A todos mis maestros por sus enseñanzas, pero en especial al Profesor Miguel Ángel Cerpas por sembrar en mí el amor a la Química.

A mis amigos: Jenny, Bere, Mary, Haide, Vero, Carlos, Packo, y Jerry, por todos los gratos momentos, por sus consejos y compañía, porque sin ustedes las clases en la universidad no hubieran sido tan entretenidas y a todos aquellos que igual no menciono, pero que forman parte de mi vida, gracias

A Toño por su ayuda en todo, por su comprensión, tolerancia, paciencia y apoyo, por ser el viento que eleva mis alas. xoxoxo. Muchísimas gracias.

Al Dr. Javier por su esmero, paciencia, ayuda y por su gran calidez humana. Muchas gracias. Lo logramos!!

A todos mis compañeros del laboratorio 102 del Conjunto E de la Facultad de Química mil gracias.

A Diana por darme tu amistad y por tu ayuda en toda la investigación. Eres una gran persona y serás una gran Doctora, mil gracias.

Manu gracias por hacer amenas las tardes en el laboratorio y por toda tu ayuda. Eres el alma del laboratorio.

A la Señora José por soportar mi tiradero. Gracias

A la UNAM por ser mi segunda casa y por todo lo que aportó a mi vida en estos años.

Mil gracias a todos

Todo llega para quien sabe esperar.

[Henry Longfellow Wadsworth](#)

INDICE GENERAL.

	Pag.
I. Resumen	1
II. Introducción	2
A. <i>Fusarium verticillioides</i> .	2
1. Taxonomía.	2
2. Morfología y desarrollo de <i>Fusarium verticillioides</i> .	2
3. Producción de toxinas.	4
4. Factores que afectan el crecimiento de <i>Fusarium verticillioides</i> .	6
B. Fumonisinias	9
1. Estructura y propiedades	9
2. Efectos de la fumonisinina B1 en células eucariontes.	10
3. Biosíntesis de FB1, mecanismo y regulación.	12
a. Genes estructurales.	13
b. Genes reguladores de la biosíntesis de fumonisinina.	15
C. Esfingolípidos.	20
1. Biosíntesis de esfingolípidos.	20
D. Efecto de las bases esfingoideas en hongos.	21
E. Efecto de la FB1 en los niveles de bases esfingoideas.	22
III. Hipótesis	24
IV. Objetivos	24
V. Materiales y Métodos.	25
A. Preparación de las soluciones stock de bases esfingoideas.	25
B. Preparación del medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (PDA.)	25
C. Preparación del medio de cultivo GYAM	26
D. Preparación del inóculo.	26
E. Medición del crecimiento radial de las colonias.	27
F. Métodos espectrofotométricos.	28
G. Determinación del porcentaje de germinación	28
H. Cuantificación de FB1 a partir del medio de cultivo GYAM	29
I. Cuantificación de FB1 por HPLC	30
J. Extracción de RNA.	32
K. Reacción de RT-PCR.	34
L. Cuantificación de transcritos de los genes <i>FUM1</i> y <i>FUM8</i>	35
VI. Resultados	37
A. Efecto de fitoesfingosina en la producción de conidias	37
B. Efecto de las bases esfingoideas sobre el crecimiento radial	40
C. Efecto de las bases esfingoideas sobre la germinación.	45
D. Cuantificación de FB1 por TLC	49
E. Efecto de las bases esfingoideas en la producción de fumonisinina B1.	52
F. Efecto de las bases esfingoideas en la expresión de genes de la biosíntesis de fumonisinina.	58
VII. Discusión	64
VIII. Conclusiones	68
IX. Perspectivas	68
X. Bibliografía	69
XI. Apéndice	74

INDICE DE FIGURAS.

	Pag.
Fig. 1 Morfología de conidias de <i>Fusarium verticillioides</i> .	3
Fig. 2 Estructura química de algunas toxinas de <i>Fusarium</i>	6
Fig. 3 Estructura química de las Fumonisinias	10
Fig. 4 Estructura química de las bases esfinogideas .	11
Fig. 5 Estructura del locus <i>FUM</i>	13
Fig. 6 Ruta biosintética de la fumonisina B1	16
Fig. 7 Ruta de la biosíntesis de esfingolípidos en plantas	21
Fig. 8 Efecto de la FB1 en los niveles de bases esfingoideas en maíz.	23
Fig. 9 Esquema de la cámara de Neubauer	27
Fig. 10 Reacción del OPA con una amina primaria.	31
Fig. 11 Efecto de la fitoesfingosina en la producción de conidias de <i>F.verticillioides</i>	37
Fig. 12 Efecto de la fitoesfingosina en la producción de conidias de <i>F.verticillioides</i>	38
Fig. 13 Efecto de la fitoesfingosina en la producción de pigmento de <i>F.verticillioides</i>	39
Fig. 14 Efecto de la fitoesfingosina en el crecimiento radial de <i>F. verticillioides</i> .	40
Fig. 15 Efecto de la fitoesfingosina en el crecimiento radial de <i>F. verticillioides</i> .	40
Fig. 16 Efecto de la esfinganina en el crecimiento radial de <i>F. verticillioides</i> .	42
Fig. 17 Efecto de la esfinganina en el crecimiento radial de <i>F. verticillioides</i> .	42
Fig. 18 Efecto de la mezcla de Fitoesfingosina/ Esfinganina en el crecimiento radial de <i>F. verticillioides</i>	44
Fig. 19 Curso temporal de germinación de conidias de <i>F.verticillioides</i> en agua.	45
Fig. 20 Curso temporal de germinación de conidias de <i>F.verticillioides</i> en medio GYAM.	45
Fig. 21 Efecto de la fitoesfingosina y la esfinganina sobre la germinación de conidias de <i>F. verticillioides</i> en agua.	46
Fig. 22 Efecto de la fitoesfingosina y la esfinganina sobre la germinación de conidias de <i>F. verticillioides</i> en medio GYAM.	47
Fig. 23 Efecto de la esfinganina en la germinación de conidias de <i>F. verticilliodes</i> en medio GYAM.	48
Fig. 24 Análisis por cromatografía en capa fina de FB1 producida por <i>F.verticillioides</i>	50
Fig. 25 Cromatoplaqueta de la Curva patrón de FB1	51
Fig. 26 Curva patrón de FB1 a partir de los datos densimétricos de la cromatoplaqueta.	51
Fig. 27 Ejemplo de los cromatogramas obtenidos.	53
Fig. 28 Ejemplo de los cromatogramas obtenidos en el análisis por HPLC.	54
Fig. 29 Efecto de la fitoesfingosina en la producción de FB1 por <i>F. verticillioides</i>	55
Fig. 30 Efecto de la esfinganina en la producción de FB1 por <i>F. verticillioides</i>	56
Fig. 31 Efecto de la mezcla de fitoesfingosina/esfinganina en la producción de FB1 por <i>F. verticillioides</i>	57
Fig. 32 Efecto de la fitoesfingosina en la expresión de los genes <i>FUM1</i> y <i>FUM8</i> .	58
Fig. 33 Efecto de la fitoesfingosina en la expresión de los genes <i>FUM1</i> y <i>FUM8</i> .	59
Fig. 34 Efecto de la esfinganina en la expresión de los genes <i>FUM1</i> y <i>FUM8</i> .	60
Fig. 35 Efecto de la esfinganina en la expresión de los genes <i>FUM1</i> y <i>FUM8</i> .	60
Fig. 36 Efecto de la esfinganina en la expresión de los genes <i>FUM1</i> y <i>FUM8</i> .	61
Fig. 37 Efecto de la mezcla de fitoesfingosina/esfinganina en la expresión de los genes <i>FUM1</i> y <i>FUM8</i> .	62
Fig. 38 Efecto de la mezcla de fitoesfingosina/esfinganina en la expresión de los genes <i>FUM1</i> y <i>FUM8</i> .	63

INDICE DE TABLAS.

	Pag.
Tabla 1	Genes <i>FUM</i> y sus posibles funciones 14
Tabla 2	Genes regulatorios de la biosíntesis de fumonisinas. 15
Tabla 3	Preparación de medio de cultivo suplementado con las bases esfingoideas a partir de una solución 50 mM 25
Tabla 4	Composición del medio líquido GYAM 26
Tabla 5	Claves y volúmenes de las muestras usadas 29
Tabla 6	Concentraciones y volúmenes utilizados para la preparación de la curva patrón de FB1 31
Tabla 7	Concentraciones y volúmenes que se utilizaron para la mezcla de reacción . 34
Tabla 8	Reactivos y concentraciones utilizados en la preparación de la mezcla de reacción para PCR. 35
Tabla 9	Secuencia de los oligonucleótidos para la amplificación de <i>FUM1</i> , <i>FUM 8</i> y, <i>TUB</i> ; y tamaño de sus productos. 36
Tabla 10	Ecuaciones y pendientes de las rectas que representan el crecimiento radial de <i>F.verticillioides</i> en presencia de diferentes dosis de PSN. 41
Tabla 11	Ecuaciones y pendientes de las rectas que representan el crecimiento radial de <i>F.verticillioides</i> en presencia de diferentes dosis de ESN. 43
Tabla 12	Ecuaciones y pendientes de las rectas que representan el crecimiento radial de <i>F. verticillioides</i> en presencia de diferentes dosis de la mezcla PSN/ESN 44

ABREVIATURAS.

FB1 = Fumonisin B1.

FB2 = Fumonisin B2.

FB3 = Fumonisin B3

PDA = Agar Papa Dextrosa (Potato Dextrose Agar).

PDB = Potato Dextrose Broth.

GYAM = Glucosa Yeast extract Asparagine Malic acid.

HPLC = High Performance Liquid Chromatography

RNA = Acido ribonucleico

RT-PCR = Reacción en cadena de la polimerasa acoplada a transcripción reversa.

TLC = Thin-Layer Chromatography

SAM's = Sphinganine-analog mycotoxins.

mg = miligramo.

kg = kilogramo.

a_w = actividad de agua.

HRE = Humedad Relativa de Equilibrio.

PKS = Poliquétido sintasa.

KS = Cetocinasa.

AT = Acetil transferasa.

ACP = Acarreador de acilos.

KR = Cetoreductasa.

DH = Dehidroreductasa.

ER = Enoil Reductasa.

MT = Metil transferasa.

Asc1 = Gen de resistencia a "Alternaria stem canker".

ESN = Esfinganina.

PSN = Fitoesfingosina.

μM = Micromolar.

A₆₀₀ = Absorbancia a 600 nm

A₄₇₀ = Absorbancia a 470 nm

I. RESUMEN

Las fumonisinas son micotoxinas producidas por algunas especies del género *Fusarium*, como *Fusarium verticillioides* y *F. proliferatum*. Estos son hongos patógenos de maíz y las fumonisinas constituyen un factor de virulencia del hongo. Entre los distintos tipos de fumonisinas, la fumonisina B1 (FB1) es la más abundante ya que constituye alrededor de 70% de las fumonisinas totales producida por una cepa. Los genes que codifican las enzimas de la ruta biosintética de las fumonisinas están agrupados en el locus *FUM*.

Las fumonisinas son micotoxinas análogas a esfinganina (SAM's) por la semejanza estructural que tienen con las bases esfingoideas. Esto se relaciona también con su modo de acción pues interfieren en la biosíntesis de novo de los esfingolípidos al inhibir de manera competitiva a la esfinganina *N*-acil tranferasa la cual cataliza la acilación de la esfinganina para producir ceramida. Esta actividad sobre los tejidos de maíz provoca una elevación en los niveles de esfinganina y fitoesfingosina los que activan varias cascadas de señalización que conducen a la muerte celular.

Dado que en la interacción *Fusarium* – maíz, el hongo está expuesto a los componentes celulares del tejido vegetal necrosado, el objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de las bases esfingoideas en el desarrollo de *F. verticillioides* y la producción de fumonisina B1. Para esto se usó la cepa de *F. verticillioides* MY3 que se expuso a concentraciones crecientes de fitoesfingosina y esfinganina, así como a la mezcla de éstas. Tanto la esfinganina como la fitoesfingosina inhibieron la germinación de las esporas de *F. verticillioides*, así como el crecimiento radial de la colonia. Asimismo, ambas bases esfingogideas provocaron una reducción en los niveles de fumonisina secretada por el hongo. Es muy probable que este decremento en los niveles de fumonisina detectada en el medio de cultivo se deba a una reducción en la biosíntesis de la toxina, pues los transcritos de los genes *FUM1* y *FUM8* se encontraron en niveles menores que en los controles.

II. INTRODUCCIÓN

A. *Fusarium verticillioides*.

La mayoría de los hongos filamentosos son saprófitos, eso quiere decir que toman sus nutrientes de materia orgánica muerta o en descomposición, pero muchos de ellos se pueden comportar como patógenos de plantas. Tal es el caso de *Fusarium verticillioides* el cual es un hongo filamentosos que puede colonizar tejidos vegetales provocando distintas enfermedades, además de tener un ciclo saprofitico (Shim et al., 1999). Esta especie tiene la capacidad de producir metabolitos secundarios como toxinas las cuales han sido asociadas a efectos adversos en plantas, debido a esto se ha estudiado su papel como patógeno de algunas especies económicamente importantes principalmente el maíz y el trigo, sin embargo, también se ha aislado de otros cereales como son la cebada, el arroz, la avena y el sorgo (Desjardins et al., 2001). El consumo de alimentos contaminados con estas toxinas es causante de algunas enfermedades en animales de granja y se ha asociado también a enfermedades en humanos.

1. Taxonomía.

La clasificación de estos organismos se basa principalmente en su morfología y su ciclo sexual, características en que muestran diferencias importantes (Moss et al., 1984).

Muchos hongos que son patógenos en plantas se encuentran clasificados dentro de la subdivisión Deuteromycotina u hongos imperfectos ya que no se conoce su ciclo sexual , y es el caso para varias especies del género *Fusarium*.

En cambio, para otras especies, se conoce su ciclo sexual y son reconocidas dentro de los géneros *Gibberella* o *Nectria* (Nelson et al. 1992). Este es el caso de *F. verticillioides*, que también antes era conocido como *Fusarium moniliforme*, y su teleomorfo (ciclo sexual) es: *Gibberella fujikuroi*. Dada la complejidad del género *Fusarium*, las especies con características similares se han categorizado en distintas secciones y *F. verticillioides* pertenece a la sección Liseola. (Nelson et al., 1992).

2. Morfología y desarrollo de *Fusarium verticillioides*.

El género *Fusarium spp.* presenta características microscópicas muy variables como son las forma de las microconidias, de las macroconidias y la forma de la célula basal, así como la presencia o ausencia de clamidiosporas (se forman del engrosamiento del micelio).

La morfología de las macroconidias es la característica principal para definir a la mayoría de las especies en el género *Fusarium spp*, sin embargo, este criterio no es definitivo, pues se ha encontrado que algunas especies coinciden con esta característica por lo tanto se ha adoptado por tomar la morfología y modo de formación de las microconidias y la morfología de los microconidióforos como criterio para su identificación (Nelson et al., 1982).

Las microconidias son muy abundantes, en general son células individuales ovoides, que se pueden observar agrupadas en forma de cadena y presentar cabezas falsas (Fig. 1B y 1C). Las macroconidias poseen pared delgada y fina, además de que su forma puede ser un poco curva hasta casi recta presentando una superficie ventral y una dorsal casi paralelas (Fig. 1 A)

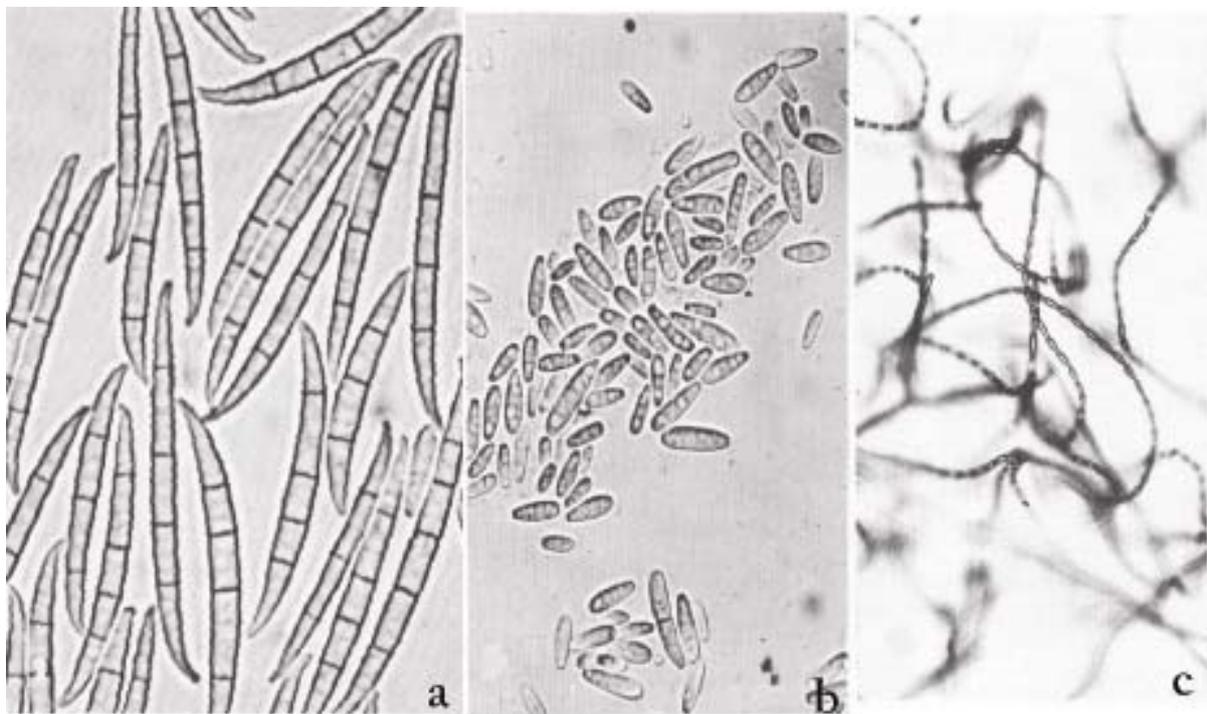


Figura 1. Características microscópicas de *Fusarium verticillioides*: **A.** Morfología de los macroconidios, **B.** micronidias, y **C.** microconidias agrupadas en forma de cadena (Nelson et al, 1982).

A nivel macroscópico, los cultivos de *F. verticillioides* crecidos en el medio agar papa dextrosa (PDA) presentan un micelio blanco y producen pigmentos de color rosa a púrpura, después 11 a 14 días de incubación. El esporodio (estroma pequeño en forma de almohadilla, cubierta por conidióforos) puede estar presente o ausente, y cuando está presente puede ser marrón-amarillo a naranja. Los esclerocios, que son una masa compacta

de hifas, también pueden desarrollarse y usualmente son de color azul oscuro, puede ser muy abundante y dar esta coloración por la parte superior o inferior de la superficie de la colonia. El reverso de la colonia varía de incoloro a púrpura (Nelson et al., 1982).

3. Producción de toxinas.

El género *Fusarium* produce diversas micotoxinas de interés, las cuales provocan diferentes micotoxicosis en animales y humanos. Entre las toxinas que produce el género *Fusarium* están la zearalenona y el zearalenol, los tricotecenos, el deoxinivalenol y las fumonisinas. Además producen otras toxinas de menor abundancia en la naturaleza (Fig.2).

Tricotecenos.

Constituyen una familia de compuestos naturales estructuralmente relacionados entre sí, producidas por muchas especies de *Fusarium* y géneros relacionados (*Trichothecium*, *Cephalosporium*, *Myrothecium*, *Trichoderma*, *Stachybotrys*, *Cylindrocarpon*) (Beremand y McCormick.,1992). Estos compuestos son tóxicos en células eucariontes y causan lesiones dérmicas, alteraciones de la respuesta inmunológica e inhibición de la síntesis de macromoléculas. Se dividen en dos grupos, uno está formado por los derivados alcohólicos del núcleo tricoteceno y sus ésteres simples, mientras que los ésteres macrocíclicos constituyen el otro grupo más complejo (Takitani et al., 1979).

Zearalenona.

Es un compuesto con una estructura estrechamente relacionada a metabolitos estrogénicos producida muchas veces junto con los tricotecenos, por especies que colonizan los granos: *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. crookwellense*, *F. heterosporum* y *F. equiseti*. Es débilmente fitotóxica, pero produce hiperestrogenismo y problemas reproductivos en porcinos y animales de experimentación. Algunos derivados son usados comercialmente para favorecer el crecimiento del ganado (Desjardins y Proctor., 2001).

Moniliformina

Es una micotoxina con estructura de ciclobuteno y es producida por *F. napiforme*, *F. thapsinum*, *F. nygamai*, *F. proliferatum*, *F. subglutinans*, *F. fujikuroi*, *F. anthophilum*, *F. beomiforme*, *F. acuminatum*, *F. avenaceum*, *F. semitectum*, *F. equiseti*, *F. oxysporum* y algunas cepas de *F. verticilloides* (Desjardins & Proctor 2001). Es cardiotóxica y una dosis de

1 mg/kg de peso corporal causa falla cardíaca en pollos. Es la causa de una enfermedad endémica en China (Edwards et al., 2002).

Fumonisin.

Son fitotoxinas y además micotoxinas que interfieren en el metabolismo de los esfingolípidos. Son producidas por *F. proliferatum*, *F. verticilloides*, *F. nygamai*, *F. fujikuroi* y algunas cepas de *F. napiforme*, *F. thapsinum*, *F. sacchari*, *F. dlamini*, *F. subglutinans*, *F. anthophilum* y de *F. oxysporum* (Desjardins y Proctor., 2001). Algunas cepas de *Aspergillus niger* también producen fumonisin, principalmente fumonisin B2 (Frisvad et al., 2007). La fumonisin B1 es la predominante pues constituye alrededor del 70% de las fumonisin producidas por las cepas de *F. verticillioides* mientras que las B2, B3 y B4 se encuentran en menor cantidad. Otras cuatro series de fumonisin (A, AK, C, P) están relacionadas estructuralmente a la serie B, y suelen encontrarse en baja cantidad en los cultivos de *F. verticillioides* (Desjardins & Proctor.,2001).

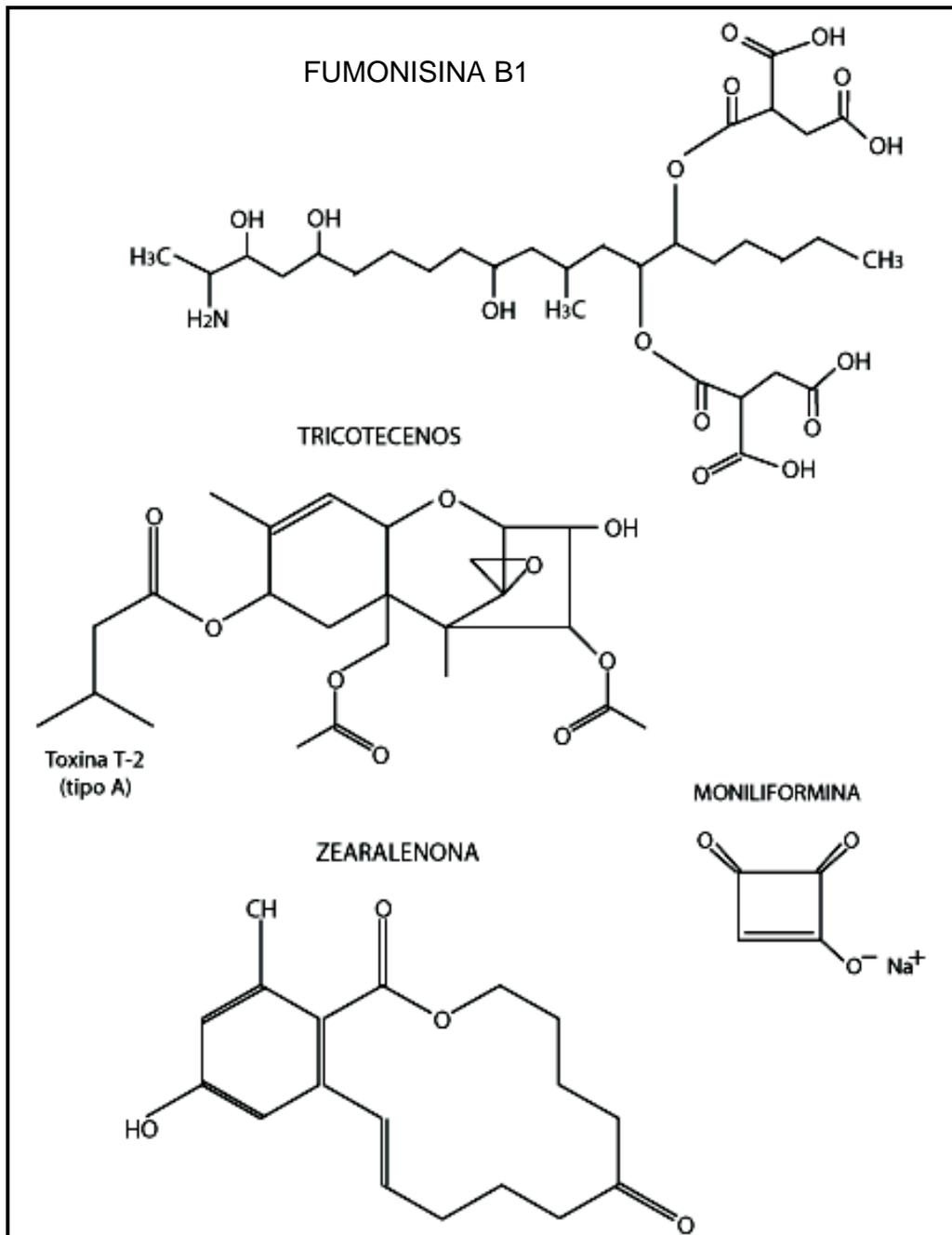


Figura 2. Estructuras químicas de las diferentes toxinas producidas por el género *Fusarium*.

4. Factores que afectan en el crecimiento y la producción de toxinas de *Fusarium verticillioides*.

La producción de toxinas es afectada por múltiples factores ambientales, incluyendo pH, disponibilidad de agua, y fuente de nutrientes. En esta sección se describirán los factores

ambientales que afectan el desarrollo de *F. verticillioides* y la producción de micotoxinas, en particular sobre la síntesis de fumonisinas (Velluti et al., 2000).

Factores Físicos.

Humedad y Actividad de agua (aw):

La cantidad de agua existente en el ambiente y en los sustratos es uno de los factores importantes para el desarrollo de los hongos y para la producción de micotoxinas. Sin embargo, no sólo influye la cantidad de agua en el ambiente, sino también la forma en que está disponible. El agua libre existe dentro y alrededor de los tejidos vegetales o de las células y puede ser eliminada sin interferir seriamente con los procesos vitales. La forma ligada está presente en los tejidos vegetales y animales, formando parte de las células que los componen y en unión con las proteínas y glúcidos. Para la germinación de las esporas de hongos, es necesario que el agua se encuentre en forma libre.

Existen dos parámetros relacionados con la cantidad de agua la humedad relativa de equilibrio y la actividad de agua (Fennema, 1993).

Humedad relativa de equilibrio (HRE): es la cantidad de humedad de la que disponen los microorganismos una vez alcanzado el equilibrio entre la humedad libre del producto y el vapor de agua existente en el medio ambiente que lo rodea. La HRE se expresa en porcentaje y varía de unos sustratos a otros conforme su riqueza en glúcidos o en materia grasa (Fennema.,1993). *Agua disponible o Actividad de agua (aw)*: es la relación existente entre el agua libre en los sustratos y la capacidad de los microorganismos para allí proliferar. Así pues, la mayor parte de los hongos se desarrollan a partir de valores de aw de 0.70. (Fennema,1993).

Las condiciones óptimas para la producción de fumonisina son de 0.97-0.98 aw a una temperatura entre 20 a 30 °C para *F. verticillioides* y entre 15 C a 25 C para *F. proliferatum* (Picot et al., 2010). La cantidad mínima de actividad de agua para esta especie es de 0.87aw (Granjo et al., 2007).

Temperatura:

La temperatura es otro de los principales factores físicos que influyen en la producción de fumonisinas(Picot et al 2010). De manera general la temperatura óptima para el desarrollo

de los hongos se encuentra entre 25 y 30° C y el límite máximo entre 40 y 45° C, mientras que la mayor parte de los hongos no crecen por debajo de 5°C.

En particular, *F. verticillioides* crece entre los 26 a 28°C, siendo este rango el óptimo para su desarrollo (Miller. 2001) y de 4° C como temperatura mínima para crecer (Reid et al., 1999). Mientras que se considera que las condiciones óptimas para el crecimiento y proliferación fúngica son: un aw superior a 0.75 y una temperatura superior a 20° C, además de un 14 % de humedad en el sustrato (Ayerst, 1969).

Integridad física de los granos:

Los tegumentos intactos del grano dificultan el acceso del hongo al almidón endospermico. Por lo que aquellos granos que están fragmentados son más susceptibles a la invasión y desarrollo fúngico, que los granos enteros (Miller, 2001). Por esto es común encontrar niveles más elevados de fumonisinas en los granos dañados por insectos.

Factores Químicos.

pH y factores nutricionales

Los hongos son capaces de crecer en un amplio intervalo de pH (2.5-7.5), y de un modo general les favorece más el medio ácido que el alcalino. La misma actividad metabólica del microorganismo es capaz de alterar el pH, utilizando como fuente de energía los ácidos orgánicos del sustrato o los excretados por otros microorganismos como bacterias acidificantes que pueden aparecer durante el periodo de deterioro del alimento (Quinta, 1982).

El pH óptimo para la producción de fumonisinas es de 3 a 3.5, donde el pH de 3.5 mejora el crecimiento del hongo, mientras que en pH alcalino (pH> 7) la producción de fumonisina es inhibida (Shankar et al., 2006).

Otro factor importante es la composición del sustrato, aunque *F. verticillioides* es capaz de crecer en una diversidad de compuestos, y requieren ciertos nutrientes minerales para su desarrollo como son el hierro y el zinc, y específicamente para la producción de fumonisinas es necesaria la presencia de carbono y nitrógeno, ya que se requieren para la síntesis y participan en la regulación de su producción (Picot et al., 2010).

Se ha encontrado una relación positiva entre la concentración de azúcares y la producción de fumonisinas, independientemente de los carbohidratos utilizados. En

contraste, cuando la concentración de aminoácidos disminuye, la producción de fumonisina aumenta aunque la masa del micelio disminuye. Esto sugiere que la producción de fumonisinas está influenciada positivamente por un incremento en la relación C:N, aunque el crecimiento del hongo se ve disminuido (Picot et al., 2010).

B. Fumonisinas.

Las fumonisinas son micotoxinas producidas por algunas especies del género *Fusarium* como *F. verticillioides* y *F. proliferatum*, que son patógenos naturales en maíz (Yescas Huerta, 2001). Se ha reportado la existencia de 60 diferentes fumonisinas y compuestos relacionados, siendo la fumonisina B1 (FB1) la más importante debido a su toxicidad y a la abundancia con que es producida por algunas cepas. Estas 28 diferentes fumonisinas se han separado en 4 grupos: el grupo de las fumonisinas de la serie A, el de la serie B, la serie C y la serie P (Rheeder et al; 2002). Las fumonisinas de la serie B, (FB1, FB2, FB3, y FB4) difieren en el número y posición de los grupos –OH (Fig.3) y constituyen alrededor de un 70% de las fumonisinas producidas por *F.verticillioides* (Granjo et al.,2007; Flaherty y Woloshuk, 2004).

1. Estructura y propiedades.

La estructura química base de las fumonisinas es un esqueleto poliquetídico de 20 átomos de carbono con la presencia de un grupo amino en el carbono C₂ y con dos ácidos tricarbóxicos esterificados en C₁₄ y C₁₅ (Flaherty y Woloshuk.,2004). Las fumonisinas de la serie B son compuestos polares solubles en metanol, agua y acetonitrilo, además son termoestables, por lo que resisten temperaturas de esterilización en autoclave y tratamientos de cloración, pero si son sometidos a temperaturas mayores de 170°C, en pH ácidos o alcalinos, por tiempos mayores de 60 min, estas toxinas se hidrolizan. Esta hidrólisis puede ser parcial en el que uno de los dos grupos tricarbóxicos se libera para generar PHFB1, en pH ácidos, o ambos grupos son liberados para obtener HFB1 en pH alcalinos (Jackson et al., 1996).

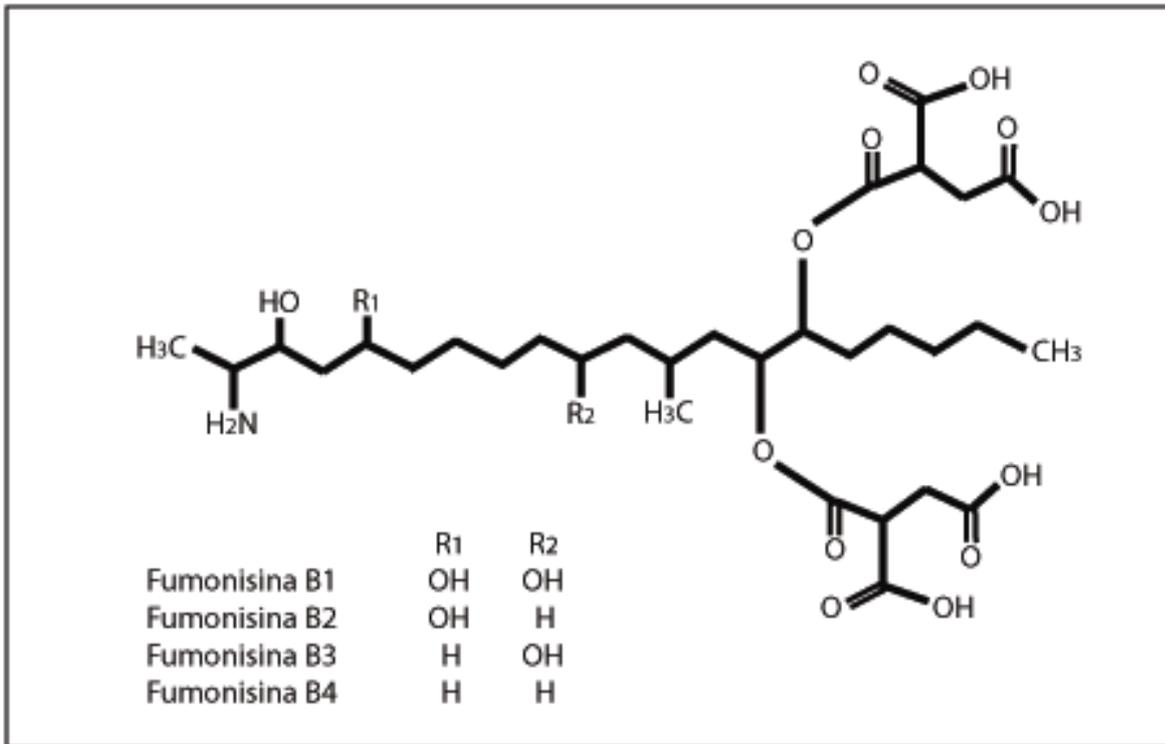


Figura 3. Estructuras químicas de las fumonisinas de la serie B producidas por *Fusarium verticillioides*.

2. Efectos de la Fumonisina B1 en células eucaróntes.

La fumonisina B1 está clasificada como toxina tipo SAMs (sphinganine-analog mycotoxins), ya que es estructuralmente similar a las bases esfingoideas que son intermediarios del metabolismo de los esfingolípidos. El mecanismo de acción de las SAMs incide en el metabolismo de los esfingolípidos inhibiendo competitivamente a la enzima esfinganina *N*-acil transferasa provocando una acumulación de bases esfingoideas, principalmente esfinganina, esfingosina y fitoesfingosina (Fig.4), y una reducción de esfingolípidos complejos (Wang *et al.*, 1991). Los esfingolípidos, además de ser componentes estructurales de las membranas también participan como moléculas señalizadoras regulando importantes funciones como el crecimiento, la diferenciación y la muerte celular programada en células de mamífero, levadura y plantas (Lynch y Dunn., 2004; Dickson, 2008; Hannun y Obeid, 2008). Este desbalance en los niveles de bases esfingoideas tiene diversos efectos en la célula del hospedero, pues activan varias cascadas de señalización e induce la expresión de genes y también procesos de muerte celular programada (Castro., 2008).

Se ha demostrado que el consumo de maíz contaminado con fumonisinas es causal de diversas patologías en animales, como degeneración leucoencefálica en equinos, edema pulmonar en porcinos y actividad promotora de cáncer hepático en ratas (Jackson et al.,1996). Además, se han hecho asociaciones epidemiológicas que relacionan el consumo de maíz contaminado con cáncer esofágico y defectos en la formación del tubo neural en humanos como se presenta a continuación.

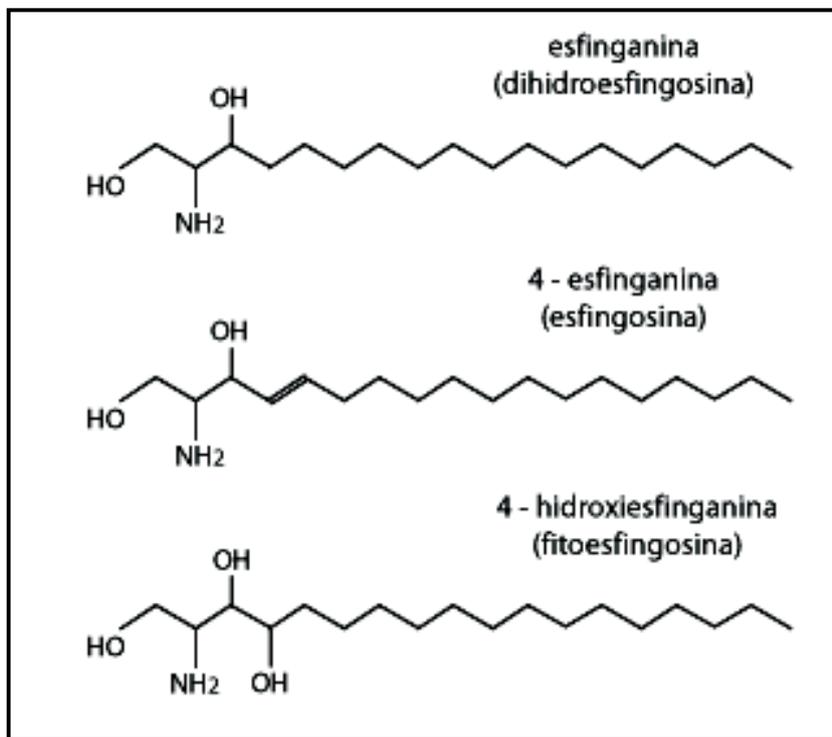


Figura 4. Estructura química de las principales bases esfingoides estudiadas en este trabajo: esfinganina, esfingosina y fitoesfingosina.

Fumonisinias como promotor de cáncer esofágico.

La actividad carcinogénica de la fumonisina aún no ha sido demostrada en humanos pero se ha propuesto como un potencial agente etiológico del desarrollo de cáncer esofágico en humanos, como conclusiones de estudios epidemiológicos que demuestran una relación entre el consumo de maíz contaminado y el cáncer esofágico (Denijs et al.,1997). En China, se han reportado tasas de mortalidad de hasta 436 por 100,000 varones y 22.5 por 100,000 mujeres en la provincia de Honan, y en Sudáfrica la incidencia en varones de raza negra de 35 a 65 años de edad es de 246 por cada 100,000, con respecto a una tasa de sólo 3 por cada 100,000 en África Occidental (Cameron., 1995). En Estados Unidos el carcinoma de

esófago tiene una baja incidencia de sólo 1% de los carcinomas que se presentan son de esófago (Cameron.,1995).

Fumonisin como promotor de defectos de la formación del tubo neural.

En 1990, el Departamento de Salud del estado de Texas, reportó un incremento del doble en el número de nacimientos de niños con defectos del tubo neural, en un grupo de mujeres México-Americanas que concibieron en Río Grande Valley. El primer grupo se presentó en abril de 1990, cuando tres recién nacidos de 36 horas con anencefalia se encontraron en un hospital de Brownsville, después otros tres bebés fueron entregados en las siguientes seis semanas. Esto produjo que se realizara una búsqueda que reveló primero que las mujeres que concibieron entre 1986-1989 en Río Grande Valley presentaban un menor nivel en los hematocritos. Entre algunos de los factores que se buscaron fue la exposición a fumonisin, pues había reportes de una alta incidencia de estas micotoxinas en los productos alimenticios a base de maíz del sur de Texas, de 1995 a 1997 (Hendricks, 1999).

3. Biosíntesis de FB1, mecanismo y regulación.

La biosíntesis de la fumonisin FB1 se ha estudiado utilizando distintas estrategias experimentales. Experimentos por marcaje radioactivo de sus precursores (ácidos carboxílicos, alanina y acetato) mostraron que los átomos de C₃ al C₂₀ del poliquétido provienen de la unión de 9 moléculas de acetato, mientras los C₁, C₂ y el NH₂ derivan del aminoácido alanina (Du et al., 2008). Los grupos metilo unidos a los carbonos C₁₂ y C₁₆ son donados por S-adenosil metionina. Los grupos hidroxilo de los carbonos C₅, C₁₀, C₁₄ y C₁₅ provienen del oxígeno molecular, mientras que el grupo hidroxilo del C₃ deriva del grupo carbonilo del ión acetato, por último el origen de los dos ésteres tricarbóxicos aun no está claro, pero se piensa que provienen de algún intermediario del ciclo de Krebs (Zaleta-Rivera, 2007).

La identificación del locus FUM (región donde se encuentra un grupo de genes específicos para alguna función), en el cromosoma 1 de *F. verticillioides* (Fig. 5) y el análisis de los genes que lo forman ha contribuido a definir el orden de las reacciones biosintéticas, así como la resistencia a las fumonisin en *F. verticillioides*.

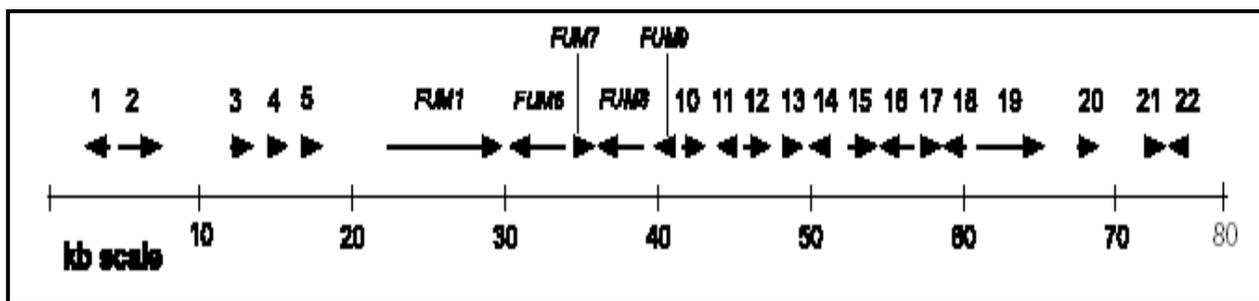


Figura 5: Cluster de los genes *FUM* en el cromosoma 1 de *Fusarium verticillioides*, los números sobre las flechas corresponden a los diferentes genes *FUM* que componen el cluster, la dirección de las flechas indica su ubicación y orientación (Proctor et al 2003).

a. Genes estructurales de la ruta biosintética de la fumonisina B1.

El análisis de las secuencias de los genes contenidos en el locus *FUM* ha permitido postular una posible función en la producción de fumonisina, y para algunos de ellos la función se ha establecido mediante su expresión y la determinación de la actividad enzimática del producto. Esto permitió proponer una hipótesis sobre la ruta biosintética de la fumonisina (Fig. 6).

El gen *Fum 1* (inicialmente conocido como *Fum 5*) corresponde a una posible poliquétido sintasa (PKS), la cual es una enzima multifuncional que consta de siete dominios: cetosintasa (KS), acetiltransferasa (AT), acarreador de acilos (ACP), cetoreductasa (KR), deshidratasa (DH), enoilreductasa (ER) y metiltransferasa (MT) (Zaleta-Rivera, 2007). En la biosíntesis de fumonisinas esta enzima condensa 9 acetatos para formar un poliquétido lineal de 18 átomos de carbono (C_3 - C_{20}) del esqueleto de la fumonisina. Además, mediante su actividad de metiltransferasa, se encarga de la metilación en C_{12} y C_{16} .

Así, el producto hipotético de *FUM1* es una cadena de 18 átomos de carbono con un ácido carboxílico terminal y dos grupos metilo (Fig.6). Los productos de *Fum10* y *Fum16*, tienen actividad de acil-coA sintasa y además *FUM10* posee un dominio de adenilación, por ello estos genes podrían ser los responsables de la adenilación de la CoA con el poliquétido y de su activación para posteriormente producirse la condensación con alanina. Este paso es catalizado por *FUM 8*, el cual presenta similitud con la serina palmitoil transferasa.

FUM13 presenta similitud a la familia de deshidrogenasas/reductasas de cadenas cortas que tienen actividad de carbonilreductasas y es la responsable de la reducción del carbonilo del C_3 a hidroxilo (Fig.6) (Proctor et al, 2003).

La hidroxilación de C₁₄ y C₁₅ puede ser catalizadas por uno o más citocromos P450 monoxigenasa codificados por *Fum 6*, *Fum 12*, *Fum 15* y por *Fum 9* el cual tiene actividad de dioxigenasa. Los dos grupos de enzimas utilizan oxígeno molecular. La esterificación del C₆ del ácido tricarbóxico a C₁₄ y C₁₅ es catalizada por *Fum10* o *Fum16*.

El producto de *Fum11* presenta una posible actividad de transportador de tricarbóxilatos, por lo que se sugiere es responsable de transportar los ácidos tricarbóxicos de la mitocondria, que formarán el ácido tricarbóxico esterificado (Proctor et al, 2003). Los genes *Fum17* y *Fum18*, se les conoce como factores de longevidad debido a sus similitudes con proteínas homólogas identificadas en *Saccharomyces cerevisiae* y al gen de resistencia a *Alternaria alternata*, *Asc1*, encontrado en tomate. Estos genes confieren resistencia a la toxina AAL de *A. alternata* que es también una SAM.

El gen *Fum19*, tiene una gran similitud con los transportadores ABC, estos transportadores ABC forman parte de un tipo de transporte activo que se encarga de regular la entrada y salida de moléculas a uno u otro lado de la membrana. El gen *Fum19* es esencialmente un sistema exportador ya que se encarga de excretar la toxina recién sintetizada, lo cual funciona como un mecanismo de autoprotección. El resumen de la función de estos genes y su tamaño se presenta en la Tabla 1.

Tabla 1. Genes que integran el Locus *FUM* y su posible función

Nombre	Posible función	Region codificante (pb)
Fum 1	Poliquetido sintasa	8163
Fum 6	Citocromo P450	3593
Fum 7	Dehidrogenasa/Reductasa	1275
Fum 8	Serina palmitoiltransferasa	2532
Fum 9	Dioxigenasa	903
Fum 10	Dominio de Adenilación (Acil CoA sintasa)	1786
Fum 11	Transportador Tricarboxilato	1164
Fum 12	Citocromo P450 Monoxigenasa	1735
Fum 13	cadena corta dehidrogenasa /reductasa	1110
Fum 14	Dos dominios de las péptido sintetisas	1950
Fum 15	Citocromo P450 Monoxigenasa	1856
Fum 16	Acil CoA sintasa	2223
Fum 17	Factor de longevidad	1236
Fum 18	Factor de longevidad	1524
Fum 19	Transportador ABC	4806

b. Genes reguladores de la biosíntesis de fumonisina

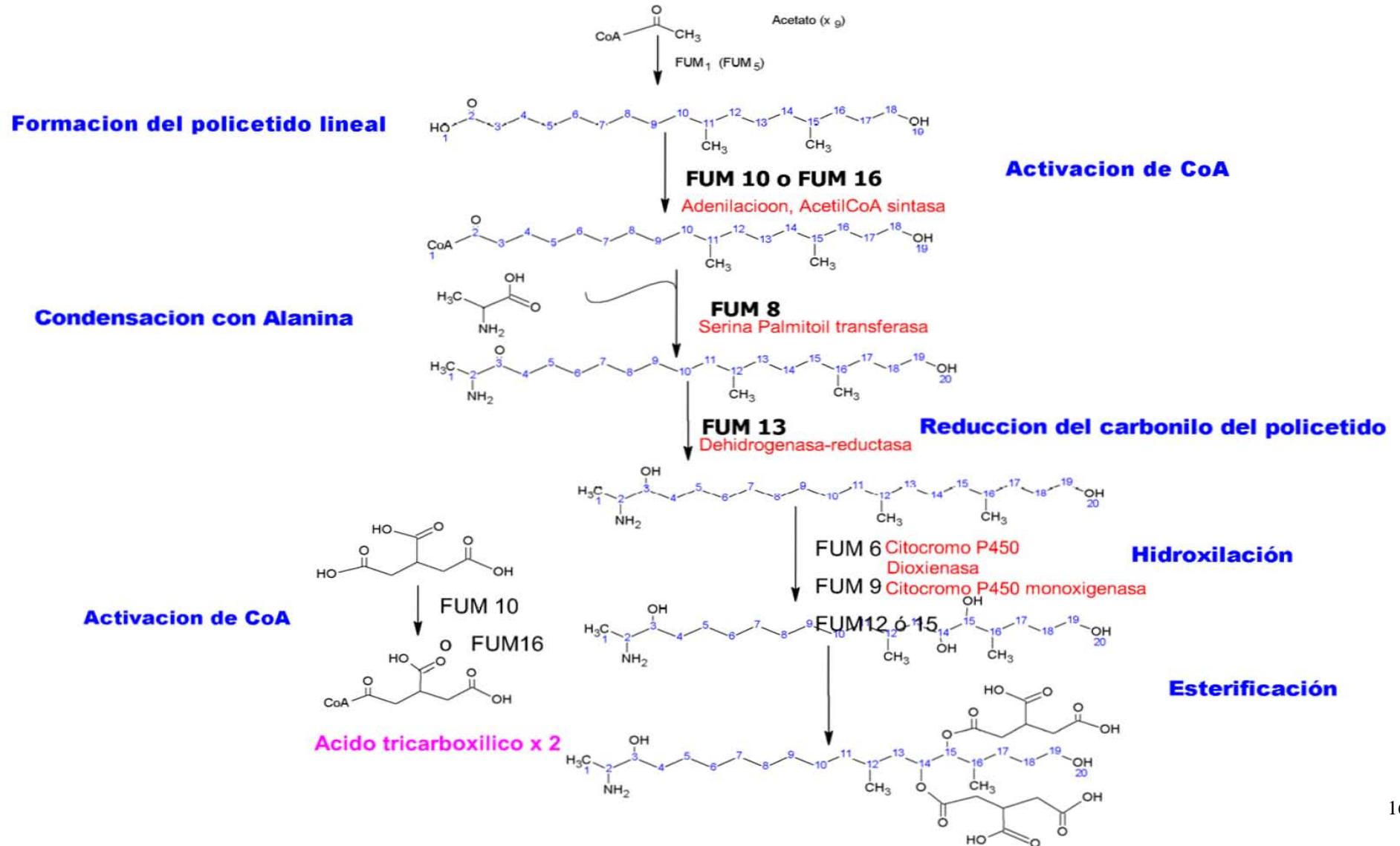
La biosíntesis de la fumonisina está regulada por varios genes que no se encuentran en el locus *FUM*. Ninguno de los 15 genes que conforman el locus *FUM* tiene una actividad regulatoria en la biosíntesis de fumonisinas. Los genes encargados de esto se encuentran distribuidos en el resto de los cromosomas.

Actualmente los genes que se conocen como reguladores de la biosíntesis de fumonisina son los genes *PAC1*, *FCK1*, *Fcc1*, *ZFR1*, y *GBp1*, (Tabla 2), y varios de ellos son componentes en la transducción de señales que participan en la percepción de factores externos (Shankar et al., 2006).

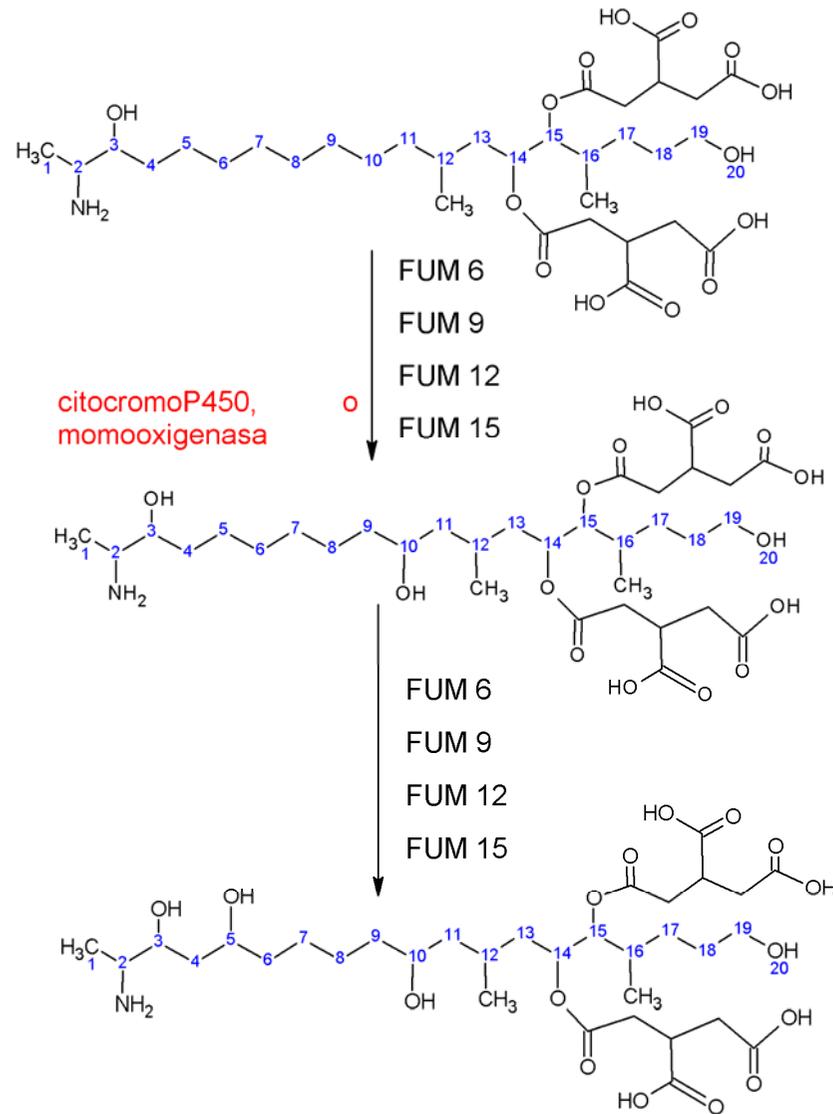
Tabla 2. Genes reguladores de la biosíntesis de fumonisinas.

Gen	Regulador	Función	Referencia
PAC1	Negativo (factor transcripcional)	Regula crecimiento, desarrollo y producción de FB1 en pH alcalino	Flaherty et al , 2003
FCK1	Positivo (complejo regulador)	Regula la producción de pigmento y la cantidad de FB1	Bluhm y Woloshuk, 2005
FCC1	Positivo (complejo regulador)	Actividad transcripcional. Regula conidiación y producción de FB1	Shim et al., 2001
ZFR1	Positivo (factor transcripcional)	Dependiente de FCC1. Regulador de FB1	Flaherty y Woloshuk, 2004
GBP1	Negativo (proteína G)	Regulador específico de FB1	Shankar et al., 2006

Figura 6. Ruta de biosíntesis propuesta de la Fumonisina B1.



HIDROXILACIÓN



Función del gen *PAC1* en la biosíntesis de fumonisina.

El gen *PAC1*, (gen regulador de pH), es un gen que pertenece a una familia de reguladores de la expresión de genes que responden al pH, regula la síntesis de fumonisina en respuesta a cambios de pH del medio externo. El producto de este gen es similar a un tipo de ciclina C, que está involucrada en la activación transcripcional y en la represión de genes asociados con respuestas a estrés y el desarrollo. Es un regulador negativo de la biosíntesis de FB1, su función es regular el crecimiento y producción de FB1 en pH alcalino (Flaherty et al. 2003).

La interrupción de este gen deteriora fuertemente el crecimiento radial a pH alcalino, mientras la conidiación se ve reducida un 97 % a pH 7. Se produce un aumento en la producción de FB1 a un pH ácido (4.7) y además ocurre la producción de FB1 a pHs básicos. Esto sugiere una función de regulación negativa (Flaherty et al., 2003).

Gen *FCK1*.

FCK1 codifica un tipo de cinasa C dependiente de ciclina que interactúa con el gen *FCC1*, para regular el desarrollo y el metabolismo secundario en *F. verticillioides*, por lo que se le considera como un regulador global de la expresión de genes. Se ha observado que la interrupción de *Fck1* produce un fenotipo similar al de la mutante *FCC1*, provocando defectos morfológicos y de crecimiento como: la reducción del crecimiento radial, el aumento de la pigmentación y la disminución en los niveles de producción de fumonisina (Bluhm et al., 2006). Estos resultados indican que *FCK1* y *FCC1* forman un complejo regulatorio que controla muchos aspectos de la expresión de genes el crecimiento y desarrollo de *F. verticillioides* (Bluhm et al., 2006).

Gen *FCC1*.

El gen *FCC1*, (ciclina tipo 1 de *Fusarium*), codifica un polipéptido similar a una ciclina tipo C, de *S. cerevisiae*. Participa en la transducción de señales, en la regulación del metabolismo secundario, y el desarrollo del hongo. Los genes *Fck1* y *FCC1* interaccionan físicamente y forman el complejo regulador de expresión de genes en hongos filamentosos (Shim y Woloshuk, 2001). La interrupción en el gen *FCC1* afecta la expresión de genes involucrados en el metabolismo secundario, en la biosíntesis de aminoácidos y la producción de proteasas extracelulares (Pirttila et al., 2004).

Gen *ZFR 1*.

El gen *ZFR1* codifica una proteína de 705 aminoácidos con un motivo de unión al DNA similar a *Z(II)2Cys6* (dedo de zinc), que es igual al motivo que presenta una familia de proteínas que son reguladoras de los metabolismos primario y secundario en los hongos filamentosos. Estudios de mutagénesis y complementación de genes indican que *ZFR1* se requiere para la transcripción de casi todos los genes del locus *FUM* y para la producción de FB1 (Brown et al., 2007). En mutantes *ZFR1* se ve gravemente alterada, mientras que el crecimiento y la conidiación no se ve afectada (Flaherty. 2004).

Gen *GBp1*.

Las proteínas de unión a GTP (proteínas G) son un grupo de proteínas altamente conservadas en eucariontes. Actúan como un interruptor en muchos procesos celulares como el transporte de proteínas y vesículas, la organización del citoesqueleto y la transducción de señales (Bourn et al., 1990). *GBp1* es un gen que codifica una proteína G monomérica 368 aa, similar a *Obg.*, la cual es una subclase de proteína G que está involucrada con las respuestas a estrés y desarrollo. El fenotipo de una mutante nula de *GBP1*, es un incremento del 50% en la producción de fumonisina, comparada con la cepa silvestre que se asocia a un incremento en la expresión de los genes *FUM1* y *FUM8* (Shankar et al., 2006).

Genes *AREA*.

Además de los genes que integran el locus *FUM* y los genes reguladores de la biosíntesis de fumonisina, los genes que se encargan de la regulación del metabolismo del nitrógeno (*AREA*) también influyen en control de la síntesis de la toxina. *AREA* es requerido para la producción de FB1 ya que actúa como un mecanismo regulatorio integral y está referido a la represión de metabolitos de nitrógeno, en otras palabras inhibe la transcripción de los genes reguladores *AFLR* uniéndose a los elementos GATA de estos promotores.

AREA es reprimido por la presencia de sales de amonio, glicina o glutamato, sin embargo, en presencia de nitrato este mecanismo se activa ya que regula la producción de nitrato reductasa, la cual es esencial para metabolizar los nitratos, sin embargo, cuando se presenta nitrógeno libre *AREA* no es requerido (Kim-Hun et al., 2008).

C. Esfingolípidos

Los esfingolípidos se sintetizan a partir de bases esfingoideas que son aminoalcoholes de 18 carbonos (Fig. 4). Estas bases de cadena larga se condensan a un ácido graso mediante un enlace amida formando la ceramida. Son una clase de lípidos que se encuentran en las membranas plasmática y endomembranas de células vegetales, animales y de hongos, donde tienen una función estructural, y contribuyen a conferir sus propiedades (Greaves, Fernández et al., 2005). Estos lípidos participan en la comunicación intercelular y en la interacción célula y sustrato, además son fundamentales en la señalización y regulación de la homeostasis en células animales y levaduras. Los cuatro tipos principales de lípidos complejos son: fosfoacilgliceroles (fosfoglicéridos), esfingomielinas, cerebrósidos y gangliósidos, a estos tres últimos también se les conoce como esfingolípidos.

1. Biosíntesis de esfingolípidos.

La ruta biosintética de esfingolípidos complejos se inicia en el retículo endoplásmico, con la síntesis de esfinganina (ESN). El primer paso en la formación de la cadena de carbonos (C18) es la condensación de la L-serina con palmitoil-CoA, reacción catalizada por la serina palmitoil transferasa, produciendo 3-cetoesfinganina. La formación de la esfinganina requiere de la actividad de la 3-cetoesfinganina reductasa, dependiente de NADPH, una vez formada la esfinganina sirve de sustrato para la síntesis de ceramida por condensación con un ácido graso (Hannun et al., 2001).

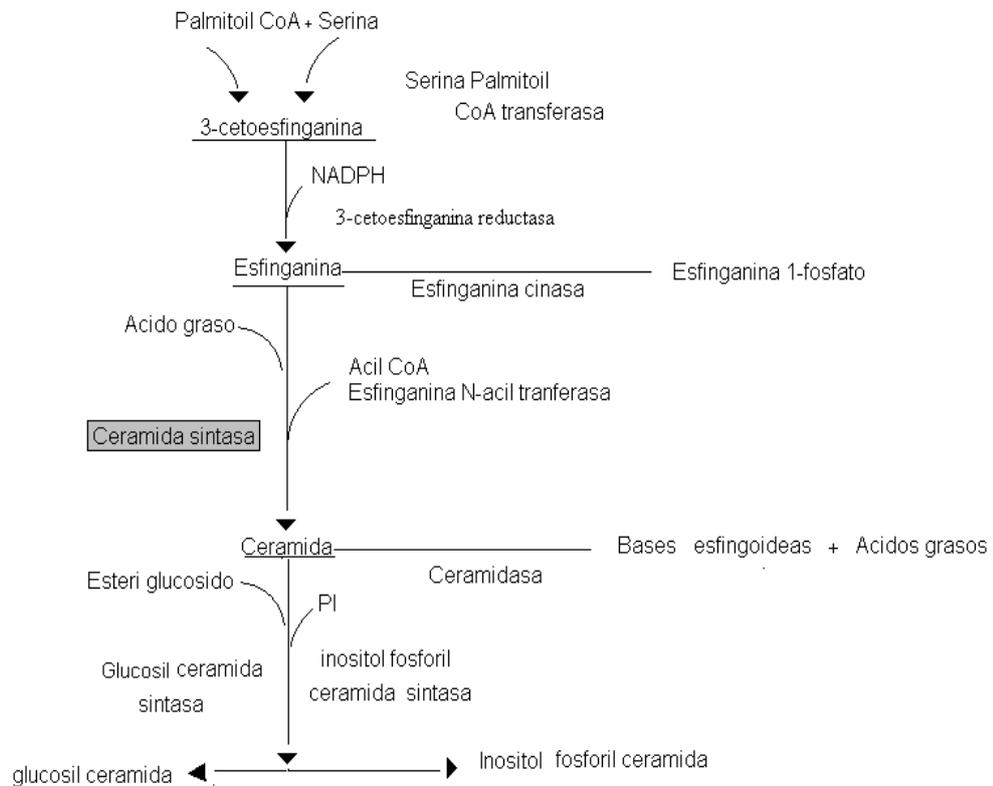


Figura 7. Ruta de la biosíntesis de esfingolípidos en plantas.

D. Efectos de las bases esfingoideas en hongos.

Además de su función como precursores de esfingolípidos complejos, las bases esfingoideas tienen funciones importantes como moléculas señalizadoras en distintos procesos del desarrollo, la diferenciación y la respuesta a condiciones ambientales.

En *S. cerevisiae*, las bases esfingoideas se requieren en la respuesta al estrés por calor (Hannun et al 2001). Cuando células de levadura son tratadas con ESN producen grandes cantidades de trehalosa (termoprotector) por la activación del gen TPS2, que codifica para una subunidad de trehalosa sintasa. Estos datos apoyan que los esfingolípidos actúan como señales indicadoras de estrés por calor, ya que sus niveles se modifican después de que las células son sometidas a un cambio de temperatura (37-39°C, condiciones de estrés). Además, los niveles de ESN y PSN se elevan en las células cuando la temperatura se incrementa de 24 a 39 °C, pero no en respuesta a otros tipos de estrés osmótico o cambios de pH (Dickson et al., 1997).

En *Aspergillus nidulans* la PSN y ESN inducen la muerte celular irreversible, tipo apoptosis (Marmeneo et al., 2008; Cheng et al., 2003). En *Neurospora crassa* los efectos producidos por la PSN son una alta reducción en la viabilidad de las esporas y deterioro en su germinación, condensación y fragmentación del DNA, además de la producción de especies reactivas de oxígeno en células tratadas con PSN, lo cual sugiere que la presencia de PSN provoca una muerte celular del tipo apoptosis (Castro et al., 2008).

E. Efecto de la fumonisina B1 en los niveles de bases esfingoideas en células vegetales.

La similitud estructural de las fumonisinas y las bases esfingoideas llevó a pensar que estas toxinas interfieren en el metabolismo de esfingolípidos, se demostró que en células animales (cultivos de hepatocitos de ratas) la FB1 es un potente inhibidor de la enzima que cataliza la acilación de esfinganina en la biosíntesis de novo de los esfingolípidos y la reutilización de esfingosina derivada del recambio de esfingolípidos complejos (Wang et al., 1991).

El mecanismo de acción molecular de la FB1 incide directamente en la biosíntesis de novo de los esfingolípidos, la FB1 inhibe a la enzima esfinganina *N*-aciltransferasa debido a la semejanza de su estructura química con la esfinganina, esto trae como consecuencia la inhibición de la biosíntesis de esfingolípidos complejos a partir de la ceramida y la acumulación de las bases esfingoideas libres (Wang et al., 1991). Este efecto parece ser el modo de acción principal de la toxina y el responsable de los diferentes efectos tóxicos que se han presentado en células animales.

En plantas también se ha encontrado este efecto pues la FB1 es capaz de provocar acumulación de bases esfingoideas en diversas especies vegetales como *Arabidopsis*, jitomate y *Lemna*, además de inducir fotoblanqueo y pérdida de solutos en varios tejidos (Abbas et al., 1994). Este efecto es particularmente importante en maíz pues es el principal hospedero de *F. verticillioides*. En ejes embrionarios de maíz en germinación expuestos a FB1 10 μ M, ocurre un incremento en la concentración de fitoesfingosina a las 12 horas, teniendo su máxima acumulación a las 36 horas y manteniéndose en concentraciones elevadas hasta las 60 horas, en contraste, la esfinganina comenzó a acumularse de igual manera a las 12 horas, obteniendo el máximo de acumulación a las 24 horas y disminuyendo a tiempos posteriores, aunque siempre manteniéndose por arriba del control (Fig.8, Rivas-San Vicente, 2001).

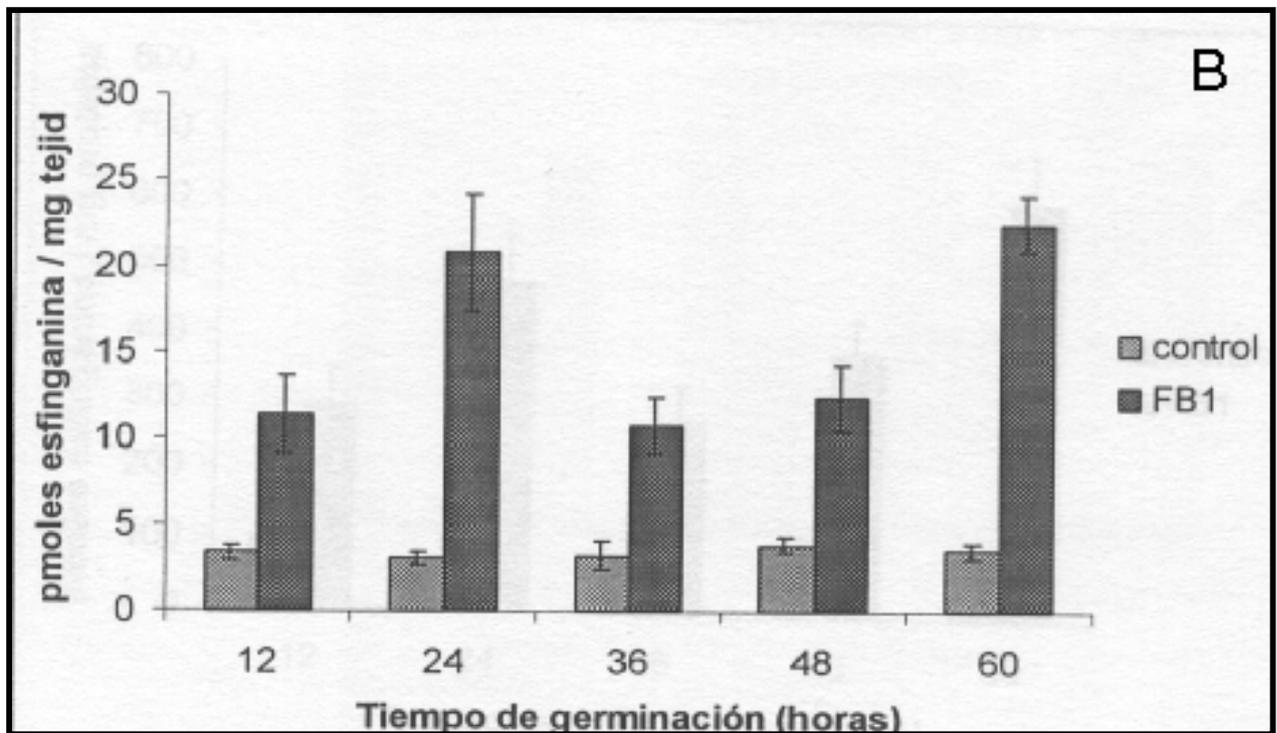
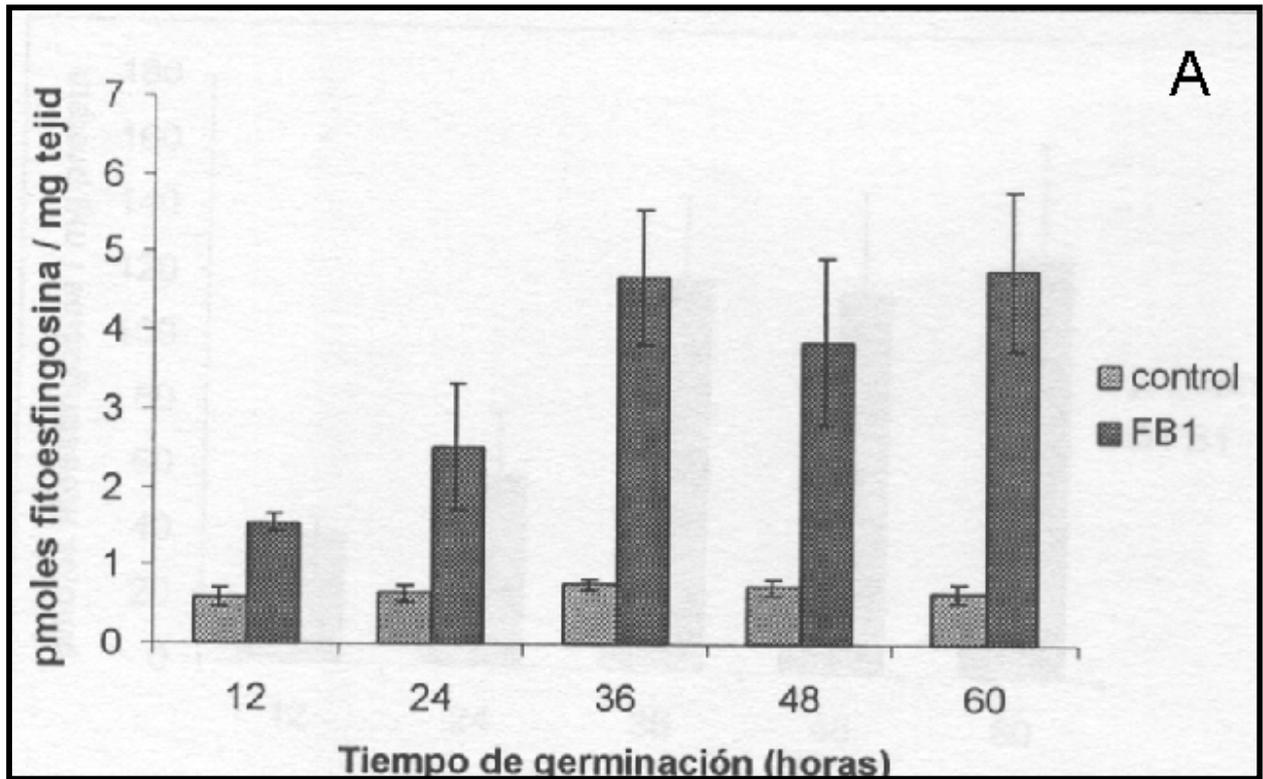


Figura 8. Efecto de FB1 (10 μ M) en los niveles de fitoesfingosina. (A) y esfinganina (B) (pmoles/mg de tejido) en ejes embrionarios de maíz durante la germinación. (Rivas San Vicente, 2001)

III. HIPÓTESIS.

En la interacción *Fusarium verticillioides*-maíz, la fumonisina B1 provoca acumulación de bases esfingoideas y muerte de las células vegetales por lo que el hongo estará expuesto a estos compuestos que afectarán su desarrollo y la biosíntesis de fumonisina B1.

IV. OBJETIVOS.

- OBJETIVO GENERAL.

Conocer y determinar el efecto de las bases esfingoideas en el desarrollo de *Fusarium verticillioides* y la producción de fumonisina B1.

- OBJETIVOS PARTICULARES

- Estudiar el efecto de las bases esfingoideas en el crecimiento y desarrollo de *Fusarium verticillioides*.
- Estudiar el efecto de las bases esfingoideas en la síntesis de fumonisina B1 en *Fusarium verticillioides*.
- Estudiar el efecto de las bases esfingoideas en la expresión de genes involucrados en la síntesis de fumonisina B1 en *Fusarium verticillioides*.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Preparación de las soluciones stock de bases esfingoideas.

Las bases esfingoideas (esfinganina y fitoesfingosina, Sigma) se disolvieron en etanol absoluto para preparar una solución 50 mM de cada una. La solución se almacenó a -20°C y antes de usarla se sonicó por cinco minutos para facilitar la disolución. De la solución anterior se tomaron los volúmenes indicados en la tabla 3 para diluir en 10 mL de medio de cultivo y obtener las concentraciones de 5, 10 y 40 μM .

Tabla 3: Preparación de medio de cultivo (10 mL) suplementado con las bases esfingoideas a partir de una solución 50 mM.

Base esfingoidea [μM]	Volumen de sol. stock (50 mM) [μL]	% etanol (vol/vol)
5	1.0	0.01
10	2.0	0.02
40	8.0	0.08*

En todos los experimentos se utilizó como control de solvente el que correspondió a la concentración más alta de etanol (0.08% v/v).

B. Preparación del medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (PDA)

Para la preparación de 10 mL de medio de cultivo se pesaron:

- 0.125 g de PDB (Potato dextrose broth, Sigma).
- 0.12 g de Agar (Invitrogen).

Se mezclaron con 10 ml de agua desionizada, y se esterilizaron en autoclave. (20 min, 1.2Kg/cm² y 120 °C). El medio se dejó enfriar a \cong 45 °C y se vació en una caja Petri estéril que contenía la base esfingoidea correspondiente, se agitó para homogeneizar con movimientos circulares y se dejó solidificar en la campana. Una vez que se solidificó el medio de cultivo, se sembró de inmediato con la suspensión de esporas como se describe más adelante.

C. Preparación del medio de cultivo GYAM (Bojja et al., 2004).

Este medio se utilizó para estudiar la producción de fumonisina. Se hizo una solución stock 10X de todas las sales. (Ver tabla 4). Para preparar 100 ml de medio GYAM se pesaron 2.16 g de glucosa y 0.05 g de extracto de levadura y se disolvieron en 20 ml de agua desionizada, una vez disueltas, se agregaron 10 ml de la solución stock de sales y 70 ml de agua. Esta mezcla se esterilizó en autoclave (20 min, 1.2 Kg/cm² y 120 °C). Una vez estéril, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se agregaron 20 ml de la solución de asparagina 40 mM la cual se prepara por separado y se esteriliza por filtración (membrana Millipore, 0.22 µm). La composición del medio GYAM se presenta en la tabla 4.

Tabla 4. Composición del medio líquido GYAM

Compuesto	Concentración final en el medio
Glucosa	0.12 M
Acido málico	50 mM
L- Asparagina	8 mM
*Cloruro de sodio	1.7 mM
*Fosfato dibásico de potasio	4.4 mM
*Sulfato de magnesio	2.0 mM
*Cloruro de calcio	8.8 mM
*Extracto de levadura	0.05%

*Sales que primero fueron disueltas en un stock 10x.

D. Preparación del inóculo.

Se utilizaron cultivos de 10 días de la cepa MY3 de *F. verticillioides* (Sánchez-Rangel et al., 2005). A cada cultivo (3 cajas petri) se le adicionaron 10 ml de agua estéril y se agitó por una hora a temperatura ambiente. La suspensión de esporas se recolectó en tubos ependorf estériles de 2 ml, los cuales se centrifugaron a 13400 rpm por 20 min, se eliminó el sobrenadante retirándolo con cuidado con una micropipeta y el botón se resuspendió en 500 µl de agua estéril desionizada. Se juntaron todas las suspensiones de conidias en un tubo estéril de 2 ml, para homogenizar la suspensión.

De la suspensión anterior se tomó una alícuota con una micropipeta y se colocó en la cámara de Neubauer (Fig. 9), la cual se montó en el microscopio óptico y se observó usando el objetivo 40X. Se contaron las conidias en los cuatro cuadrantes de las esquinas y se calculó la concentración de conidias en la suspensión utilizando la siguiente fórmula:

Donde:

C_1, C_2, C_3 y C_4 , son los cuadrantes.

\bar{x} , es el valor promedio de conidias.

F.D, es el factor de dilución.

$$\left(\frac{C_1 + C_2 + C_3 + C_4}{4} \right) = \bar{X}$$

$$(\bar{X})(1 \times 10^4 \text{ con/ml})(F.D) = \text{No. conidias / ml}$$

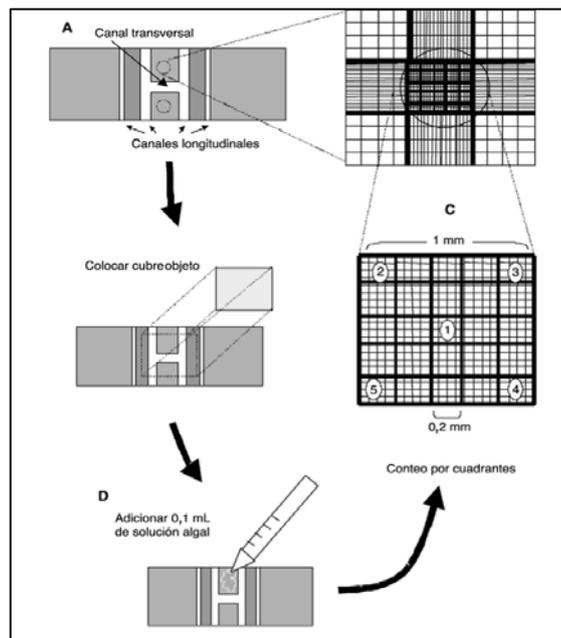


Figura 9: Esquema de la cámara de Neubauer utilizada para la cuantificación de conidias de *F. verticillioides*.

Con este dato, se calculó el volumen que se debe de agregar como inóculo para los distintos experimentos.

E. Medición del crecimiento radial de las colonias.

Para estos experimentos, las cajas con medio PDA suplementadas con las bases esfingioideas o con el solvente etanol se inocularon en el centro de ésta con 5×10^4

conidias y se incubaron a temperatura ambiente bajo luz fluorescente con un fotoperiodo de 12 h. A partir de las 72 horas de incubación, que es cuando se observa un desarrollo significativo de la colonia, se determinó el diámetro de ésta y se registró. Esta medición se repitió por 6 días más.

F. Métodos espectrofotométricos.

Para evaluar el desarrollo del hongo creciendo en presencia de las bases esfinogideas, se determinaron el número de conidias por turbidez (A_{600}) y la cantidad de pigmento producido (A_{470}). Después de 8 días de incubación, a cada una de las cajas del ensayo de crecimiento radial se le adicionaron 8 ml de agua desionizada. Después se incubaron con agitación por una hora. Al finalizar la incubación se tomaron 2 ml, los cuales se transfirieron a tubos eppendorf que se centrifugaron por 5 min a 13,400 rpm.

El sobrenadante se transfirió a una celda de plástico y se midió su absorbancia a 470 nm. Esta longitud de onda se había determinado mediante un barrido de longitud de onda ($\lambda_{350-790}$, ver Apéndice). El botón se resuspendió en 1 ml de agua desionizada y se determinó la absorbancia a 600 nm. Estas determinaciones se hicieron en un espectrofotómetro marca Shimadzu, modelo UV160U.

G. Determinación del porcentaje de germinación.

Para este experimento se utilizaron tubos eppendorf de 2 ml estériles, a los cuales se les agregó 0.9 ml de medio GYAM. La primera serie de 5 tubos se inoculó con 1×10^6 conidias en aproximadamente 100 μ l, mientras la segunda serie se inoculó con 5×10^6 conidias en aproximadamente 100 μ l. Cada serie de tubos se marcó con las siguientes claves (Tabla 5), y se añadió el volumen indicado de etanol o PSN.

Tabla 5: Claves y volúmenes de las muestras utilizadas.

Clave	Muestra	Volumen a agregar
C	Control	_____
E	Etanol	8 μ l etanol 10%
40 PSN	40 μ M PSN	8 μ l PSN 5 mM
10 PSN	10 μ M PSN	2 μ l PSN 5 mM
5 PSN	5 μ M PSN	1 μ l PSN 5 mM

Los tubos se agitaron e incubaron a temperatura ambiente toda la noche con ciclos de 12 horas de luz fluorescente. Se tomaron alícuotas de la suspensión de esporas de cada tubo y se hizo una preparación en fresco tiñéndolas con azul de lactofenol (Fluka) y se observaron al microscopio para analizar la germinación de las conidias. Se tomaron fotografías de 40 campos representativos que tuvieran al menos 5 conidias y se analizaron posteriormente con el programa Adobe PhotoDeluxe V. 4.0, se contaron el número de conidias totales y el número de conidias germinadas para determinar el porcentaje de germinación.

H. Cuantificación de FB1 a partir del medio de cultivo GYAM.

Para la cuantificación de FB1 se utilizó una técnica de cromatografía en capa fina. La cromatografía en capa fina se basa en la preparación de una capa uniforme, de un adsorbente mantenido sobre una placa de vidrio u otro soporte. La fase móvil es un líquido menos polar que la fase estacionaria, de forma que los componentes que se desplacen por la fase estacionaria con mayor velocidad serán los menos polares.

Esta técnica fue aplicada para el análisis preliminar de fumonisinas ya que su límite de detección oscila entre los 500 μ g/g de muestra. Esta técnica semicuantitativa nos permitió estimar la cantidad de fumonisina producida. Después de distintos tiempos de incubación, se colectó el medio de cultivo y se tomaron 20 μ l que se aplican en una cromatoplaqueta de sílica gel (Sigma-Aldrich) de 7 cm de alto y 5 cm de ancho, las muestras se aplican en una línea a 0.5 cm del borde inferior de la placa, se dejó secar unos minutos y después esta se corrió utilizando como fase móvil una mezcla de acetato de etilo: ácido

acético: agua, 6:3:1(v/v/v). La placa se dejó en la cámara de elución hasta que el frente de corrida alcanza 1 cm antes del borde superior. Una vez afuera se dejó secar en la campana y se reveló por aspersion con una solución de *p*-anisaldehído en alcohol ácido (ver apéndice).

Después de secarla a temperatura ambiente por unos minutos, se calentó a 120°C por unos minutos, hasta la aparición de manchas color púrpura. Se calculó el R_f de cada una de las manchas púrpura de las muestras y del estándar. Para su cuantificación se realizó una curva patrón de fumonisina con el mismo procedimiento, la curva se digitalizó y analizó su imagen con el programa Adobe PhotoDeluxe home edition 4.0. Las muestras se analizaron con el mismo programa y se interpolaron los valores con los de la curva patrón.

I. Cuantificación de FB1 por HPLC.

La cromatografía de líquidos de alta eficiencia es una técnica de separación que se basa en la diferencia de distribución que existe entre dos componentes de una mezcla en las fases estacionaria y móvil. Así, cada soluto tendrá un tiempo de retención distinto y podrán analizarse por separado.

La fase móvil es un disolvente puro o una mezcla de disolventes de grado HPLC, esto implica un 99% o más de pureza para evitar contaminantes que puedan interferir en la elución de la muestra o bien que contengan algunas pequeñas partículas que puedan tapar la columna; por lo que es necesario filtrarlos antes de utilizarlos (Harris, 2001).

Ya que las fumonisinas son compuestos solubles en agua no fluorescentes, debido a que no absorben la luz ultravioleta ni la visible, es necesario formar un derivado fluorescente para su detección por HPLC. Para esta reacción se utilizó *o*-ftaldialdehído (OPA) como agente derivatizante. Este es el método oficial por la AOAC (Association of Official Analytical Chemists International AOAC Official Method 2001.4) para la determinación de fumonisinas por HPLC. Las fumonisinas de la serie B contienen un grupo amino libre que reacciona con este agente derivatizante.

Un problema que se tiene con este método es que la intensidad de la fluorescencia del derivado OPA-FB1 disminuye rápidamente después de llevarse a cabo la reacción. Sin embargo, la estabilidad aumenta cuando la reacción se hace en presencia de 2-mercaptoetanol. La reacción se presenta en la figura 10.

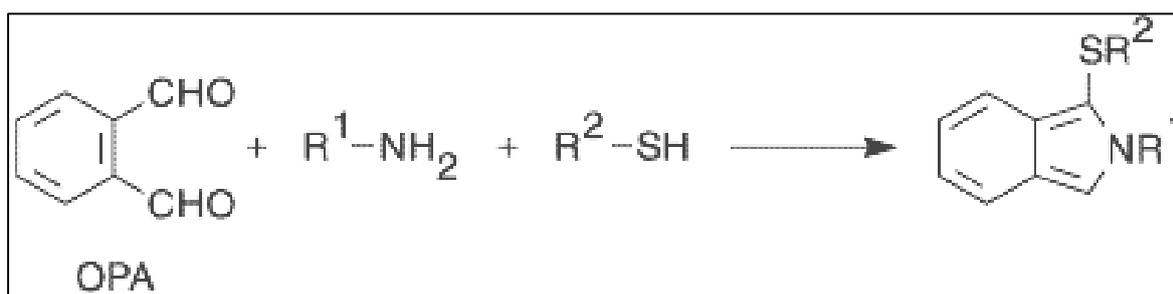


Figura 10: Reacción del OPA con una amina primaria en presencia de 2-mercaptoetanol para la formación del derivado fluorescente.

Estos derivados fluorescentes se analizaron por HPLC; se separaron por fase reversa en una columna Pursospher® RP-18 de 15 cm por 4.6 mm y un tamaño de partícula de 5 μm y se usó un detector de fluorescencia marca Shimadzu, (modelo RF.10AXL) con una longitud de onda de excitación de 335 nm y una longitud de emisión de 440 nm y los datos fueron capturados por un integrador (modelo C-R5A). Para la separación isocrática se usó una bomba marca Shimadzu (modelo LC-10AD). El volumen de la muestra analizada corresponde a 20 μl por cada inyección. La respuesta que se registró fue el área del pico de interés, el cual se interpoló en una curva patrón, que se construyó en los intervalos de 62.5 fmol a 250 fmol.

Tabla 6: Concentraciones y volúmenes utilizados para la preparación de la curva patrón de FB1.

Muestra	OPA	ACN:Agua (1:1)	fmol de FB1 en 20 μl	Dilución
Blanco	50 μl	400 μl	0	1:100
2.5 μl FB1 (50 μM)	50 μl	390 μl	62.5	1:100
5 μl FB1 (50 μM)	50 μl	390 μl	125	1:100
7.5 μl FB1 (50 μM)	50 μl	390 μl	187.5	1:100
10 μl FB1 (50 μM)	50 μl	390 μl	250	1:100

Para la reacción de derivatización se mezcló la muestra con 50 μl de reactivo de OPA (Apéndice) y se incubó a temperatura ambiente por 3 minutos. Se añadieron 150 μl de una solución de acetonitrilo-agua (1:1; v/v) se agitó en el vortex y se incubó en hielo hasta la inyección. Para la curva estándar se hicieron diluciones 1:100 y para las muestras problema se probaron diferentes diluciones antes de la inyección.

J. Extracción de RNA de micelio.

Recolección del micelio

El micelio de los cultivos de 7 días en medio GYAM se recolectó y se filtró utilizando un colador de poro mediano, después se lavó con agua-DEPC estéril y se retiró el exceso de agua utilizando papel absorbente estéril. El micelio se transfirió a tubos Falcon de 15 ml previamente pesados y se congeló inmediatamente con N₂ líquido y se almacenó a -72°C hasta la extracción de RNA.

Extracción de RNA

En un mortero estéril se congeló el tejido con N₂ líquido y se pulverizó con el pistilo. Al polvo congelado se le añadió 1 ml del reactivo TrizolTM (Invitrogen) y se homogeneizó perfectamente, la suspensión se transfirió a un tubo eppendorf estéril de 2 ml y se dejó incubando a temperatura ambiente por 2 minutos. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se centrifugaron los tubos a 13400rpm durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante se transfirió a un tubo eppendorf limpio y estéril y se le agregaron 200 µL de fenol:cloroformo 1:1 (v/v) y se agitó por 15 segundos en el vortex.

Los tubos se centrifugaron por 10 minutos a 13400 rpm y 4°C, y se separó la fase acuosa, la cual se transfirió a un tubo eppendorf estéril de 1.5 ml y se le agregaron 500 µL de isopropanol, se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos.

Terminada la incubación se centrifugaron los tubos a 13400 rpm a 4°C durante 10 minutos, se decantó el sobrenadante y se lavó con 1 ml de etanol al 70% y se centrifugó nuevamente por 5 minutos bajo las mismas condiciones anteriores. Por último se retiró el sobrenadante decantándolo y se dejó secar el botón durante 4 minutos a temperatura ambiente, al término de los 4 min se resuspendió en 20 µl de H₂O-DEPC. Las muestras se guardaron en tubos eppendorf estériles debidamente etiquetados a -72°C, hasta su uso.

Cálculo de la concentración de RNA total.

Se realizó una dilución 1:50 de las muestras en H₂O-DEPC se midieron las absorbancias a 260 y 280 nm. Se estimó la concentración de los ácidos nucleicos totales utilizando la siguiente formula:

$$\text{RNA tot. } [\mu\text{g/ml}] = (40\mu\text{g/ml}) (\text{Factor de dilución}) (A_{260})$$

Una vez obtenida la concentración, se calculó el volumen necesario para tener 1 μg de RNA y con esto se preparó el molde para la retrotranscripción (RT).

$$\text{Molde} = x \mu\text{l RNA} + y \mu\text{l H}_2\text{O-DEPC} = \text{vol final } 4 \mu\text{l}$$

Ejemplo:

Acidos nucleicos tot. $[\mu\text{g/ml}] = (40\mu\text{g/ml}) (50) (0.524) = 1048\mu\text{g/ml} = 1.048\mu\text{g}/\mu\text{l}$
para tener 1 μg de RNA:

$$((1\mu\text{l} \times 1\mu\text{g}) / 1.048\mu\text{g}) = 0.954\mu\text{l}$$

Para la reacción de la RT:

$$4\mu\text{l} - 0.954\mu\text{l} = 3.056\mu\text{l de H}_2\text{O-DEPC}$$

$$\text{Molde} = 0.954\mu\text{l RNA} + 3.056\mu\text{l H}_2\text{O-DEPC}$$

Análisis electroforético del RNA.

Para asegurarnos de la integridad del RNA de nuestras muestras y descartar una fuente de error, se realizó un análisis electroforético de los RNA moldes antes preparados utilizando un gel de agarosa al 2% disuelta en 20 ml de TAE-DEPC (acetato, Tris 40mM, EDTA 2mM), agregando bromuro de etidio (0.5 μg/μl) para revelarlo y como amortiguador de corrida TAE-DEPC (1X). Se aplicaron 4 μl de la solución de cada uno de los RNA moldes de las muestras mezclado con 4 μl de buffer de carga. El gel se visualizó en un transiluminador de luz U.V. marca UVP y se documentaron mediante una fotografía Polaroid y por análisis en el equipo de adquisición y análisis de imagen KodaK Image Station modelo 400R Pro, utilizando el programa Carestream 5.0.

K. Reacción de RT-PCR.

Se le denomina transcriptasa reversa (RT) a la DNA polimerasa dependiente de RNA, esta enzima utiliza al RNA como molde en lugar del DNA. Al procedimiento que usa esta enzima se le conoce como transcripción reversa, porque utilizando un molde de RNA es posible sintetizar una cadena de DNA.

Para este ensayo se utilizó el kit ImProm II™ Reverse Transcriptasa (Promega), y se realizó una mezcla de reacción según la tabla siguiente:

Tabla 7. Concentraciones y volúmenes que se utilizaron para la mezcla de reacción.

Reactivo	Concentración final	Volumen para 1 reacción
Agua desionizada estéril		6.6µl
Buffer de reacción 5x ImProm II™	1x	4µl
MgCl ₂ 25 mM	3mM	2.4µl
dNTP Mix	0.5mM	1µl
Transcriptasa reversa ImProm II™		1µl

En un tubo eppendorf de 2 mL se preparó la mezcla de reacción según la tabla anterior y el número de reacciones a realizar, ésta se conservó en un baño de hielo. Después, en un tubo eppendorf de 0.5 ml, se agregó 4 µl de RNA molde, y 1 µl de oligo-dT y se incubó a 70 C por 5 minutos, la reacción se detuvo en hielo por 5 min y se agregaron 15 µl de la mezcla de reacción, a cada uno de los tubos, éstos se incubaron a 25 C (temperatura ambiente) por 5 minutos, para que se llevara a cabo el alineamiento del cebador. Se incubaron a 42 C por una hora para la síntesis de cDNA, al terminar la extensión se inactivó la enzima incubándolos a 70 C por 5 minutos. Los tubos se almacenaron a -20 C.

PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)

Esta técnica permite amplificar pequeñas cantidades de ADN, de manera rápida y confiable. El método se basa, en la realización de tres reacciones sucesivas: desnaturalización, alineamiento y elongación del DNA, las cuales se llevan a cabo a distintas temperaturas. Estas reacciones se repiten cíclicamente entre veinte y cuarenta

veces. Para esta técnica se utilizó la enzima GoTaq® DNA Polimerasa (Promega), la cual contiene MgCl₂ y Buffer de reacción (Green 5X; Promega), y un termociclador marca Applied Biosystems, modelo GeneAMP 9700.

Tabla 8: Reactivos y concentraciones utilizadas en la preparación de la mezcla de reacción para el PCR.

Reactivo	Concentración final	Volumen para 1 reacción
Buffer 5x	1x	4µl
dNTP10mM	0.2 mM	0.4µl
*Oligo Fr	0.3µM	0.3µl
*Oligo Rv	0.3µM	0.3µl
cDNA	1µl	1µl
Taq polimerasa	0.02u	0.25µl
H ₂ O	cbp 20µl	13.75µl

*Solucion stock 20µM de oligonucleótido Forward (Fr.) y Reverse (Rv).

A cada tubo de reacción se le agregaron 19 µl de la mezcla de reacción y 1µl de cDNA y se colocaron en el termociclador. Las condiciones que se utilizaron fueron: un primer ciclo de desnaturalización a 94 C por 5 min, después un ciclo de alineamiento a 56 C y una temperatura de síntesis de 72 C y esto se repitió en un rango de 28 a 36 ciclos.

Los productos de amplificación de los genes se separaron en un gel de agarosa al 2% disuelta en TAE (Acetato, tris 40mM, EDTA 2mM), que contiene bromuro de etidio (0.5 µg/µl) para revelarlo y como amortiguador de corrida TAE (1X). En cada uno de los pozos del gel se colocaron 10 µl del producto de amplificación y se visualizaron en un transiluminador de luz UV marca UVP y se documentaron mediante una fotografía Polaroid y por análisis en el equipo de adquisición y análisis de imagen Kodak image station modelo 400R Pro utilizando el programa Carestream 5.0.

L. Cuantificación de los niveles de los transcritos de los genes *FUM1* y *FUM8*.

Para conocer el tamaño de cada transcrito, buscamos la secuencia completa del gen en la base de datos de NCBI y una vez obtenida diseñamos la secuencia de cada uno de los oligonucleótidos para amplificar fragmentos de los genes de interés (Tabla 9). Teniendo estos datos los comparamos con el tamaño de nuestras bandas para corroborar su identidad.

Tabla 9: Estructura de los oligonucleótidos usados para la amplificación de los genes de *Fum1*, *Fum8*, β -tubulina y el tamaño de sus productos.

Gen	Oligonucleotido	producto (pb)	No. ciclos	Referencia
<i>FUM1</i>	FUM1F: 5'-CTTGAACGCGGAGCTAGATTAT-3' FUM1R: 5'-ATCCGTGTATGCATATGTCGAG-3'	354 pb.	34	Hue et al. 2008.
<i>FUM8</i>	FUM8F: 5'-TGAGAAGGATGTTTCATGACGCC-3' FUM8R: 5'-TTGGACCCAGCTCTGCCA-3'	287 pb	25	Hue et al. 2008.
β -tubulina	TUBF 5'-TGCTCATTTC AAGATCCGCG-3' TUBR 5'-GTAGTTGAGGTCACCGTAGGAGG-3'	233pb	28	Hue et al. 2008.

F; oligonucleótido Forward, R; oligonucleótido Reverse.

La imagen se analizó por densitometría con el programa Quantity One. Para determinar el número de ciclos adecuado para cada transcrito se realizó un barrido de ciclos, esto con el fin de establecer las condiciones ideales que nos permitieran realizar un análisis cuantitativo (Apéndice).

V. RESULTADOS.

A. Efecto de la fitoesfingosina en la producción de conidias en *Fusarium verticillioides*

Para conocer el efecto de la fitoesfingosina sobre la producción de conidias en *F. verticillioides* se realizó el conteo de estas en cultivos crecidos por 8 días en medio PDA a temperatura ambiente y suplementados con diferentes dosis de esta base esfingoidea. Se realizó una suspensión de conidias y posteriormente una dilución, la cual se aplicó a la cámara de Neubauer.

La figura 11 muestra el número promedio de conidias con los distintos tratamientos. Sin embargo, es difícil obtener una conclusión sobre el efecto de esta base esfingoidea pues el control con etanol causó una reducción de aproximadamente el 30% en el número de conidias, mismo efecto que mostró la concentración mas alta de fitoesfingosina (40 μ M). Además, los datos con las distintas concentraciones de fitoesfingosina mostraron una gran dispersión.

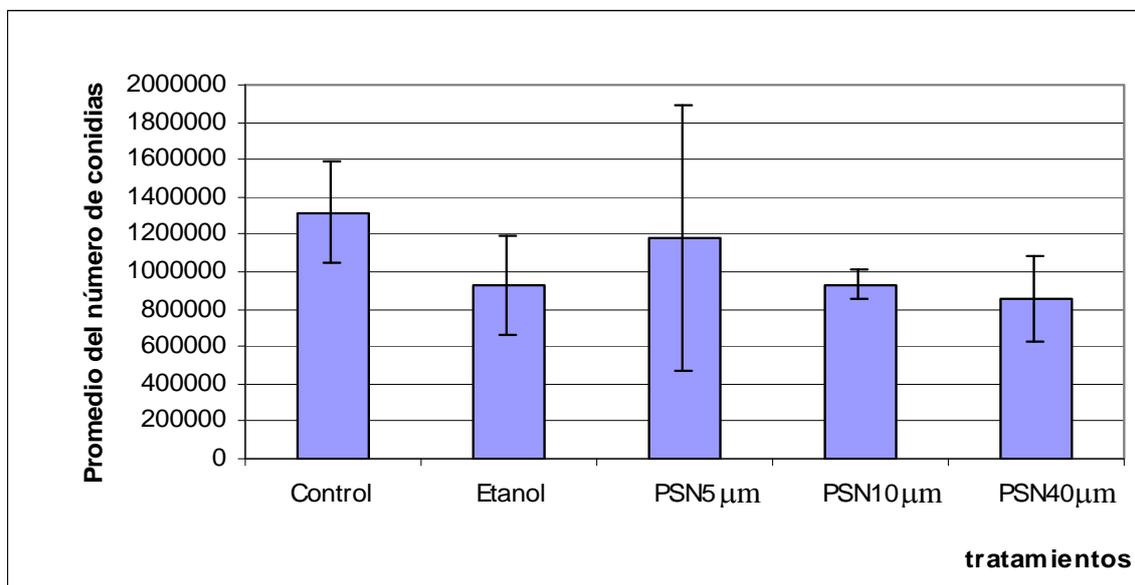


Figura 11: Efecto de dosis crecientes de Fitoesfingosina (PSN) en la producción de conidias en un cultivo de *F. verticillioides* (cepa MY3) a los 8 días de crecimiento. Se probaron tres concentraciones de PSN (5, 10 y 40 μ M) , un control sin solvente y un control de etanol (0.08%) que corresponde a la dosis más alta. (n=3)

Análisis espectrofotométrico.

Para evaluar el efecto de la fitoesfingosina sobre el desarrollo del hongo, se evaluaron dos parámetros de crecimiento por técnicas espectrofotométricas. Estos fueron la medición de la turbidez de la suspensión de las conidias (A_{600}) y la producción de pigmento (A_{470}).

Determinación de la turbidez de la suspensión de conidias.

Observamos en la figura 12 que el valor más alto de A_{600} corresponde a la muestra con el tratamiento de PSN 5 μM , esto nos indica que se trata de la muestra con mayor turbidez, que se relaciona con un mayor número de conidias en suspensión. Mientras que la muestra correspondiente al tratamiento de PSN 40 μM , muestra un valor más bajo de A_{600} , aproximadamente una reducción del 200% con respecto al control de etanol y que indica una menor concentración de conidias en la suspensión.

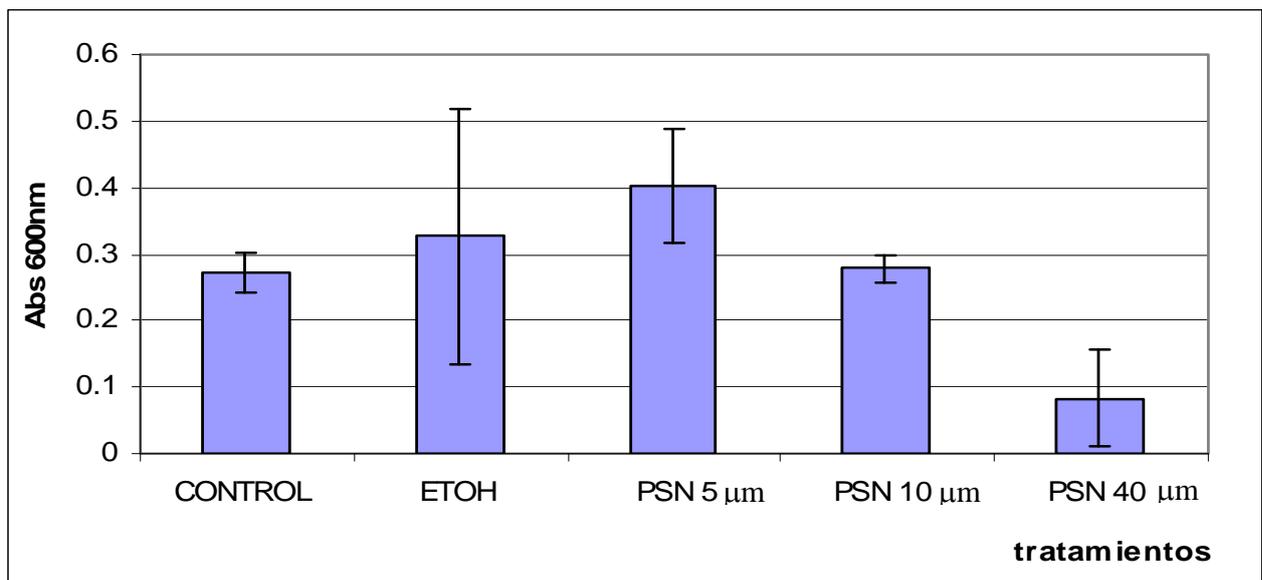


Figura 12. Efecto de dosis crecientes de Fitoesfingosina (PSN) en la producción de conidias determinadas por A_{600} en un cultivo de *F. verticillioides* (cepa MY3) a los 8 días de crecimiento. Se probaron tres concentraciones de PSN (5, 10 y 40 μM) y como control etanol (0.08%).

Como se mencionó en la sección de materiales y metodos, la A_{600} refleja el número de conidias en suspensión los resultados muestran que este parámetro se ve afectado por

la presencia de PSN, ya que los valores de A_{600} que presentan las muestras disminuyen conforme la concentración de PSN aumenta.

Determinación de la producción de pigmento.

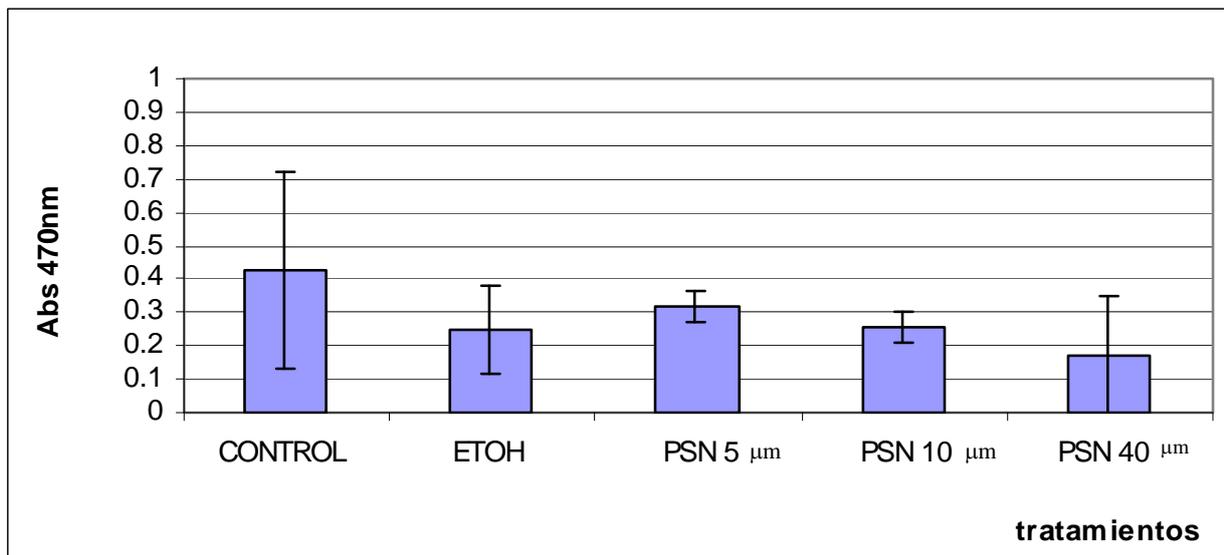


Figura 13: Efecto de dosis crecientes de Fitoesfingosina (PSN) en la producción de pigmento rojo determinado por A_{470} en un cultivo de *F. verticillioides* (cepa MY3) a los 8 días de crecimiento. Se probaron tres concentraciones de PSN (5, 10 y 40 μM) y como control etanol (0.08%).

La figura 13 muestra que el solvente etanol causó una reducción en la producción de pigmento por lo que no fue posible determinar claramente el efecto de la fitoesfingosina sobre este parámetro. Sin embargo, observamos que la muestra tratada con la concentración mayor de PSN (40 μM), presenta una media que corresponde al valor más bajo de absorbancia, lo que sugiere un efecto de la PSN sobre la producción de pigmento rojo a dosis altas.

B. Efecto de las bases esfingoideas sobre el crecimiento radial de *Fusarium verticillioides*

Efecto de la Fitoesfingosina (PSN)

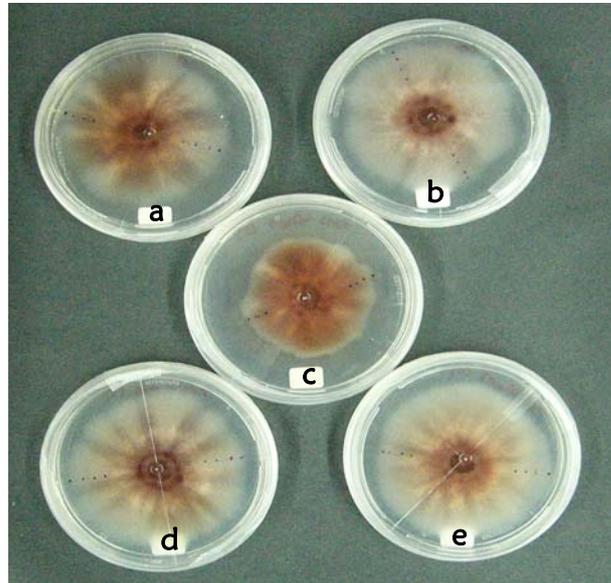


Figura 14: Efecto de dosis crecientes de fitoesfingosina (PSN) en el crecimiento radial de *F. verticillioides* (cepa MY3). Se observa el reverso de las colonias después de 8 días de crecimiento. a) Etanol, b) Control, c) PSN 40 μ M, d) PSN 5 μ M, e) PSN 10 μ M.

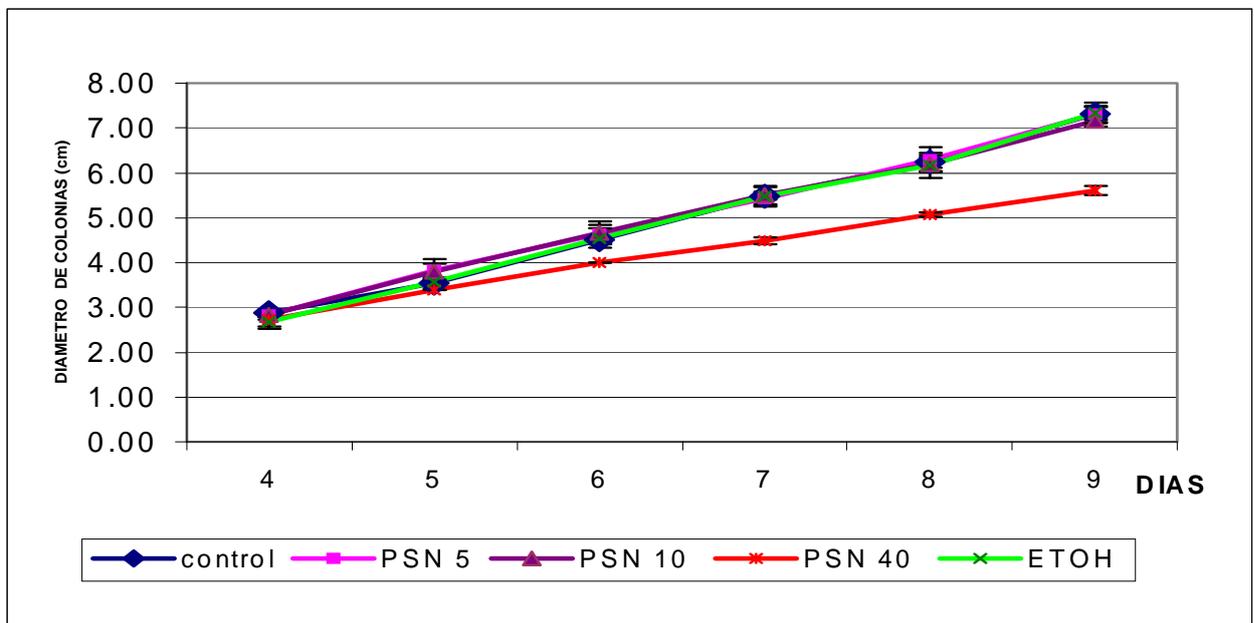


Figura 15: Efecto de dosis crecientes de Fitoesfingosina (PSN) en el crecimiento radial de *F. verticillioides* (cepa MY3) en PDA. Se probaron tres concentraciones de PSN (5, 10 y 40 μ M) y como control etanol (0.08%). Las mediciones se realizaron en muestras independientes (n=3).

Tabla 10: Ecuaciones y pendientes de las rectas que representan el crecimiento radial de *F. verticillioides* en presencia de diferentes dosis de PSN.

Tratamiento	Ec. recta	Pendiente de la recta
control	$y = 0.892x + 1.86$	0.8924
5 μ M	$y = 0.872x + 2.00$	0.8724
10 μ M	$y = 0.848x + 2.05$	0.849
40 μ M	$y = 0.566x + 2.23$	0.566
ETOH	$y = 0.916x + 1.75$	0.916

También se determinó el efecto de las bases esfingoideas sobre el crecimiento radial de la colonia de *F. verticillioides*. Los valores del diámetro en los diferentes tratamientos no presentan una diferencia en los primeros días, pero a partir del día 7, se observa que la dosis de PSN 40 μ M afecta de manera significativa el crecimiento de la colonia, que es aproximadamente un 25% más pequeña en comparación al resto de los tratamientos (Fig. 14 y 15). En este caso, no se observó efecto del solvente puesto que la tasa de crecimiento radial fue la misma que para el control.

Al calcular el valor de las pendientes de las rectas obtenidas en la Figura 15, observamos que los dos tratamientos controles y las dos dosis más bajas de PSN presentan un comportamiento muy similar (Tabla 10). Las rectas que corresponden a estos cuatro tratamientos tienen valores muy similares y varían de 0.84 a 0.91, mientras que la recta correspondiente al tratamiento con PSN 40 μ M es significativamente diferente (0.566). Lo anterior nos indica que el tratamiento con PSN a concentraciones altas presenta un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *F. verticillioides*.

Efecto de Esfinganina (ESN).

Cuando se probó el efecto de la ESN se observó un comportamiento muy similar a lo obtenido con la PSN. Se pueden apreciar diferencias en el crecimiento radial a partir del cuarto día, en donde las dosis más altas de 10 y 40 μ M causaron una reducción en la velocidad de crecimiento con respecto a su control (Fig. 16 y 17). A los nueve días la reducción del tamaño de las colonias es aproximadamente de un 6% menos con respecto al control para ESN 10 μ M y de un 17% para ESN 40 μ M (Fig.16).

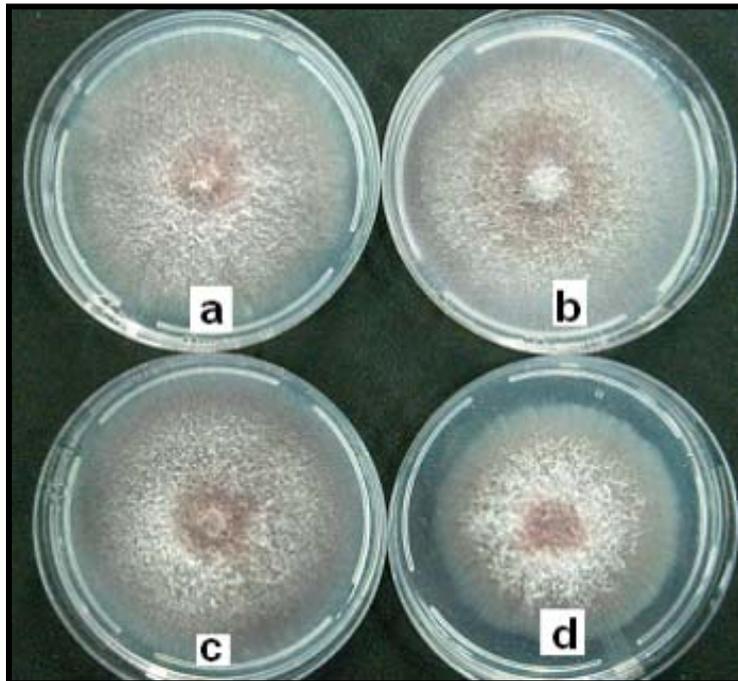


Figura 16: Efecto de dosis crecientes de esfinganina (ESN) en el crecimiento radial de *F. verticillioides*. Se observa el frente de las colonias después de 9 días creciendo en PDA 5x .a) Control, b) ESN 10 μ M,c)ESN 5 μ M, d)ESN10 μ M.

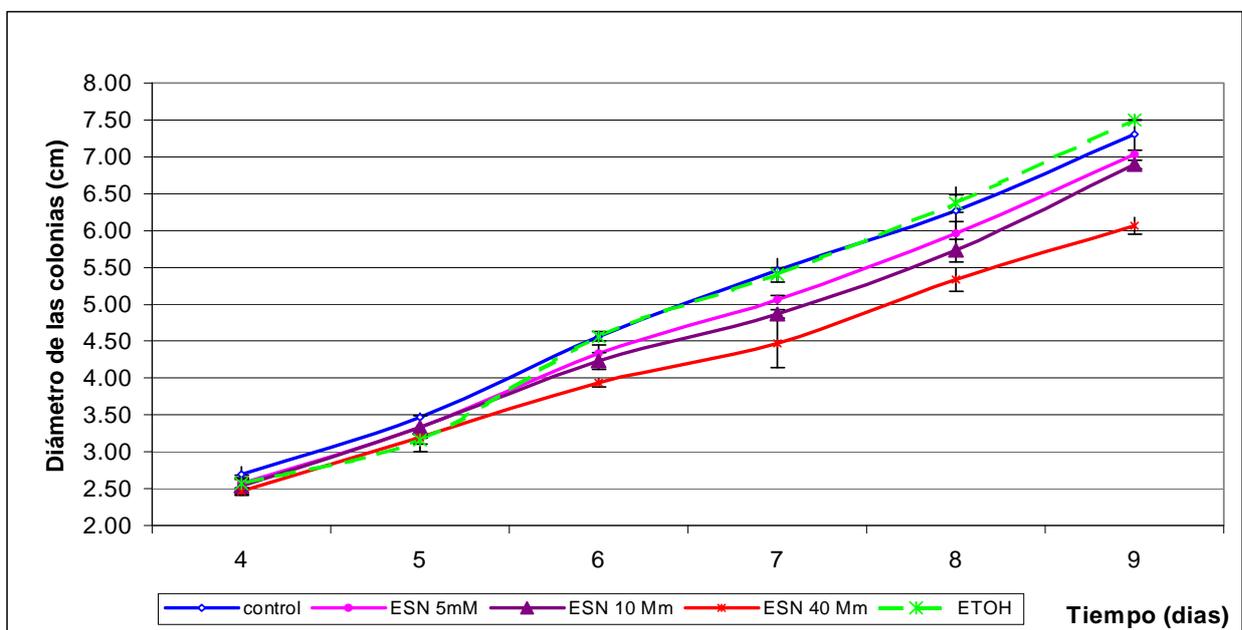


Figura 17: Efecto de dosis crecientes de Esfinganina (ESN) en el crecimiento radial de *F. verticillioides* (cepa MY3) en PDA. Se probaron tres concentraciones de ESN (5, 10 y 40 μ M) y como control etanol (0.08%). Las mediciones fueron realizadas por triplicados independientes.

Tabla 11: Ecuaciones y pendientes de las rectas que representan el crecimiento radial de *F.verticillioides* en presencia de diferentes dosis de ESN.

Tratamiento	Ec. Recta	Pendiente de la recta
control	$y = 0.923x+1.73$	0.923
ESN 5 μ M	$y = 0.885x+1.62$	0.885
ESN 10 μ M	$y = 0.848x+1.63$	0.848
ESN 40 μ M	$y = 0.712x+1.75$	0.712
ETOH	$y = 1.003x+1.41$	1.003

En la figura 17 se observa que cada una de las líneas que corresponden a las dosis bajas de ESN, el control y el etanol siguen la misma tendencia. Para verificar esto calculamos las ecuaciones de cada una de las rectas y comparamos sus pendientes, con estos datos observamos que las pendientes de las rectas que corresponden a estos cuatro tratamientos tienen valores muy similares y varían de 0.84 a 1.00, mientras que la recta correspondiente al tratamiento con PSN 40 μ M es significativamente diferente (0.712). Esto nos indica que esta concentración de ESN tiene un efecto significativo sobre el crecimiento radial de *F. verticillioides*.

Efecto de la mezcla de *Esfinganina/fitoesfingosina* (ESN/PSN)

En la figura 18 podemos apreciar que hay una discreta disminución de aproximadamente el 9% en los valores del diámetro en la muestra que corresponde a la concentración mayor de la mezcla de las bases, lo cual concuerda con los ensayos anteriores, sin embargo, también podemos observar que la mezcla no tiene un efecto sinérgico, pues la severidad en la disminución del diámetro es menor que la disminución que se observa con cada una de las bases por separado, para PSN la disminución es del 25%, para ESN es del 17% y para la mezcla solo es del 9% aproximadamente.

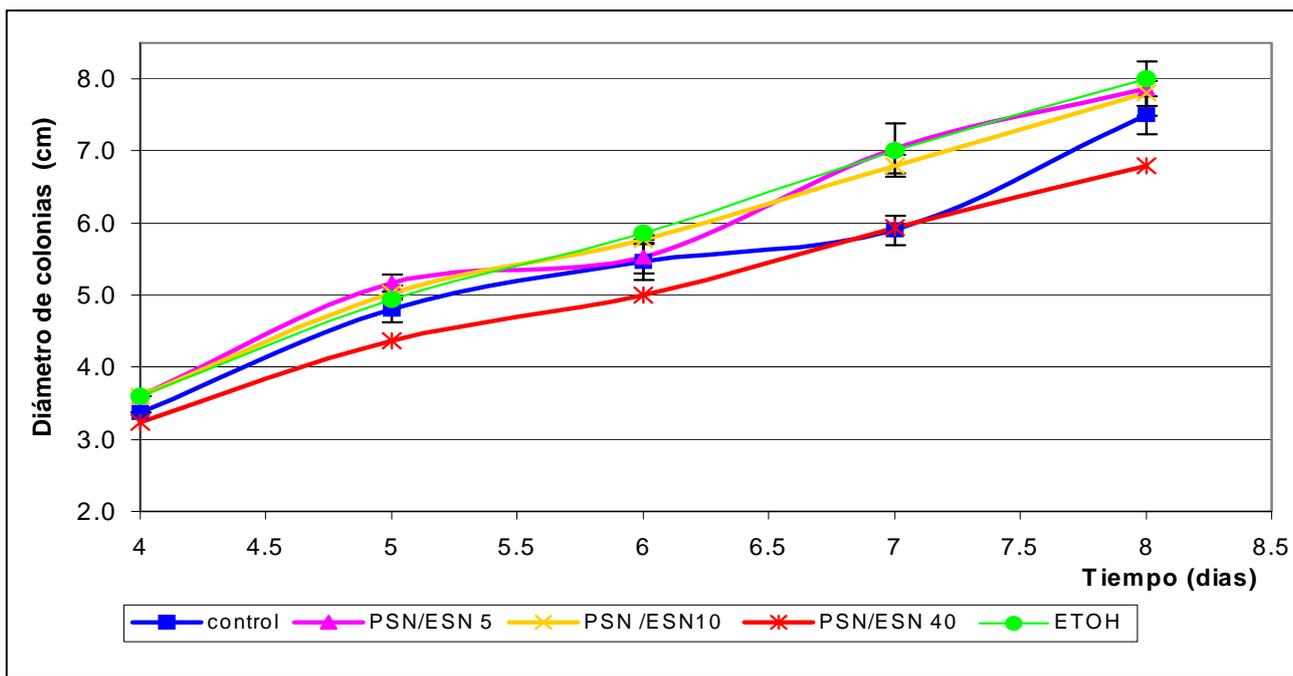


Figura 18: Efecto de dosis crecientes de la mezcla Fitoesfinosina/ Esfinganina (ESN) en el crecimiento radial de *F. verticillioides* (cepa MY3) en PDA. Se probaron tres concentraciones de la mezcla PSN/ESN (5, 10 y 40 μM) y como control etanol (0.08%)

Tabla 12: Ecuaciones y pendientes de las rectas que representan el crecimiento radial de *F. verticillioides* en presencia de diferentes dosis de la mezcla PSN/ESN.

Tratamiento	Ec.Recta	Pendiente de la recta
control	$y = 0.937x - 0.21$	0.937
PSN/ESN 5	$y = 1.04x - 0.40$	1.04
PSN/ESN 10	$y = 1.017x - 0.3$	1.017
PSN/ESN 40	$y = 0.87x - 0.15$	0.87
ETOH	$y = 1.087x - 0.64$	1.087

En la figura 18 se observa que cada una de las líneas que corresponden a las dosis bajas de la mezcla de bases (5 y 10 μM) y el etanol, muestran una tendencia muy similar, esto lo podemos corroborar al observar los valores de sus pendientes (tabla 12). También observamos en este caso que las líneas que corresponden a la concentración más alta de la mezcla y al control muestran una tendencia diferente al resto de las otras concentraciones ya que presentan valores menores de diámetro de la colonia. Sin embargo, el valor de la pendiente que corresponde a la mayor concentración de la mezcla es menor que el valor de la pendiente correspondiente al control, por lo que esta información nos sugiere que la concentración mayor de la mezcla de bases (40 μM)

produce un efecto en el crecimiento de la colonia que se refleja como una disminución en el diámetro, aunque este efecto no es de la misma intensidad que el efecto que tienen las bases por separado.

C. Efecto de las bases esfingoideas sobre la germinación de conidias de *Fusarium verticillioides*.

Para evaluar el efecto de las bases esfingoideas en la germinación de las conidias, se realizó un curso temporal de la germinación en agua y en medio GYAM con la finalidad de seleccionar el mejor tiempo para observar diferencias entre los tratamientos. El medio GYAM es un medio óptimo para la germinación de las conidias y producción de fumonisina FB1. Las observaciones se hicieron con un microscopio óptico usando el objetivo 40X y la adquisición de las imágenes se realizó con la cámara moticom.

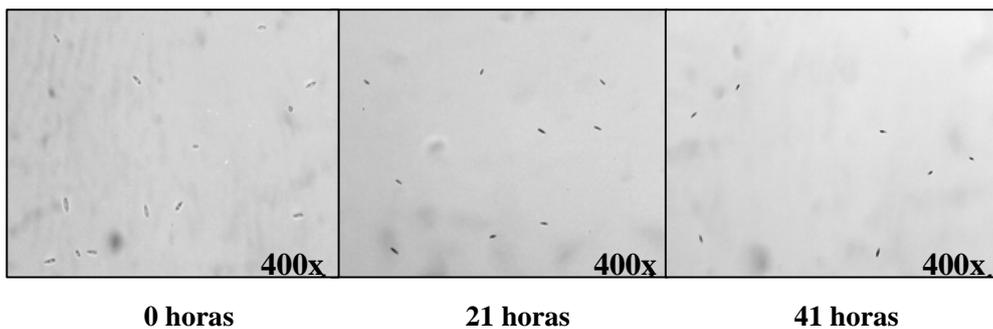


Figura 19: Curso temporal de germinación de conidias de *F. verticillioides* en agua.

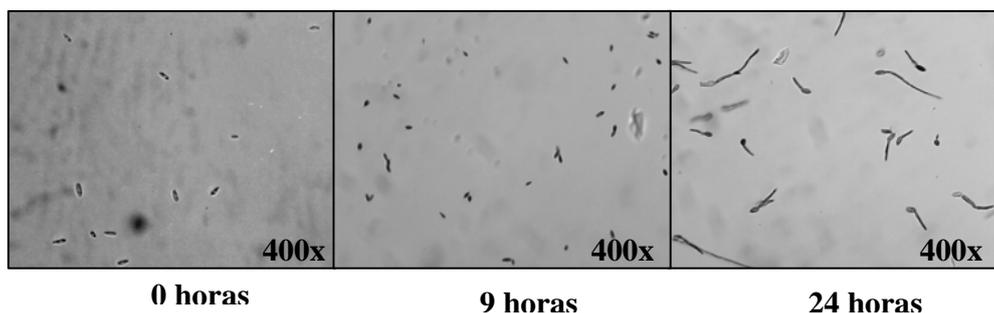


Figura 20: Curso temporal de germinación de conidias de *F. verticillioides* en medio GYAM.

Observamos que el tiempo de germinación en agua es mayor que el tiempo requerido en medio GYAM, pues aún después de 41 h de incubación había muy pocas

esporas germinadas en agua (Fig.19). En contraste, en el medio GYAM se observó una alta tasa de germinación desde las 24 h (Fig.20). Por lo que se decidió evaluar los efectos de la ESN y PSN a las 24 y 42 h de germinación.

Ensayo 1 y 2: 42 horas de germinación en agua en presencia de fitoesfingosina

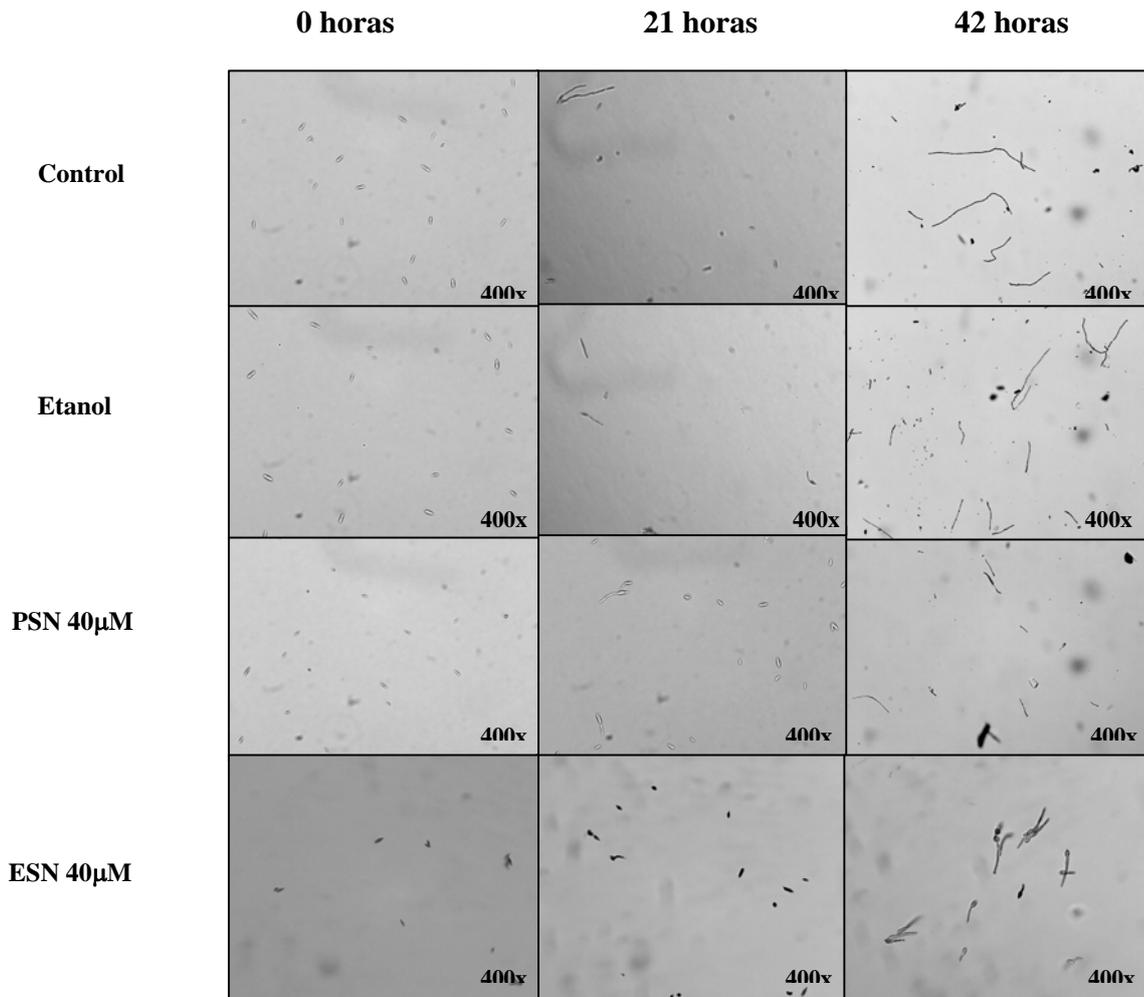


Figura 21: Efecto de la fitoesfingosina (40 µM) y de la esfinganina (40 µM) a las 21 y 42 horas de germinación de conidias de *F. verticillioides* en agua.

Observamos en la figura 21 los cambios morfológicos que ocurren en los controles y el tratamiento. A las 21 horas aparecen los primeros cambios en la forma de las conidias ya que estas comienzan a elongarse y de manera aleatoria observamos la aparición del tubo germinativo. A las 42 horas los cambios morfológicos en las conidias son evidentes, ya que se observa la presencia de conidias totalmente germinadas y el inicio de la formación de hifas y micelio en los dos controles (etanol y control), mientras que en las

muestras tratadas con las bases se observan pocas conidias germinadas, además podemos ver que la longitud del tubo germinativo es menor comparada a las de los controles para ambos casos. Sin embargo, el efecto que se observa en las muestras tratadas con ESN es mayor con respecto a la PSN tanto en la reducción de la longitud de los tubos como en la disminución en el número de conidias germinadas.

Ensayo 3: Germinación en medio GYAM en presencia de fitoesfingosina 40 μ M

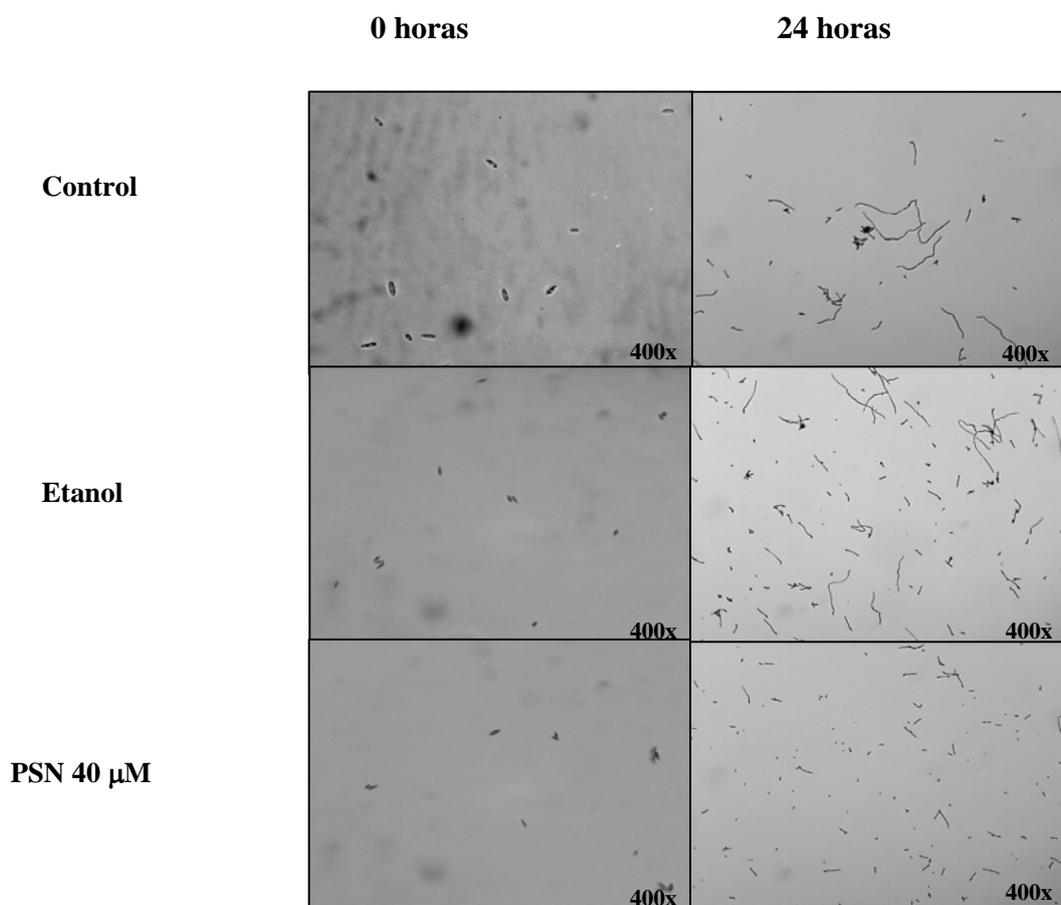


Figura 22: Efecto de la Fitoesfingosina 40 μ M en la germinación de conidias de *F. verticillioides* (MY3) a las 24 horas de incubación en medio GYAM.

En la figura 22 se presentan fotografías representativas donde se puede observar la diferencia que existe en el número de conidias germinadas y la longitud del tubo germinativo entre los controles y el tratamiento con PSN. Podemos observar que ocurren dos efectos en presencia de la fitoesfingosina, el primero que se observa es la reducción

del número de conidias germinadas en presencia de PSN, y el otro efecto significativo es la reducción en el tamaño del tubo germinativo.

Ensayo 4: Germinación en medio GYAM en presencia de esfinganina 40 μ M.

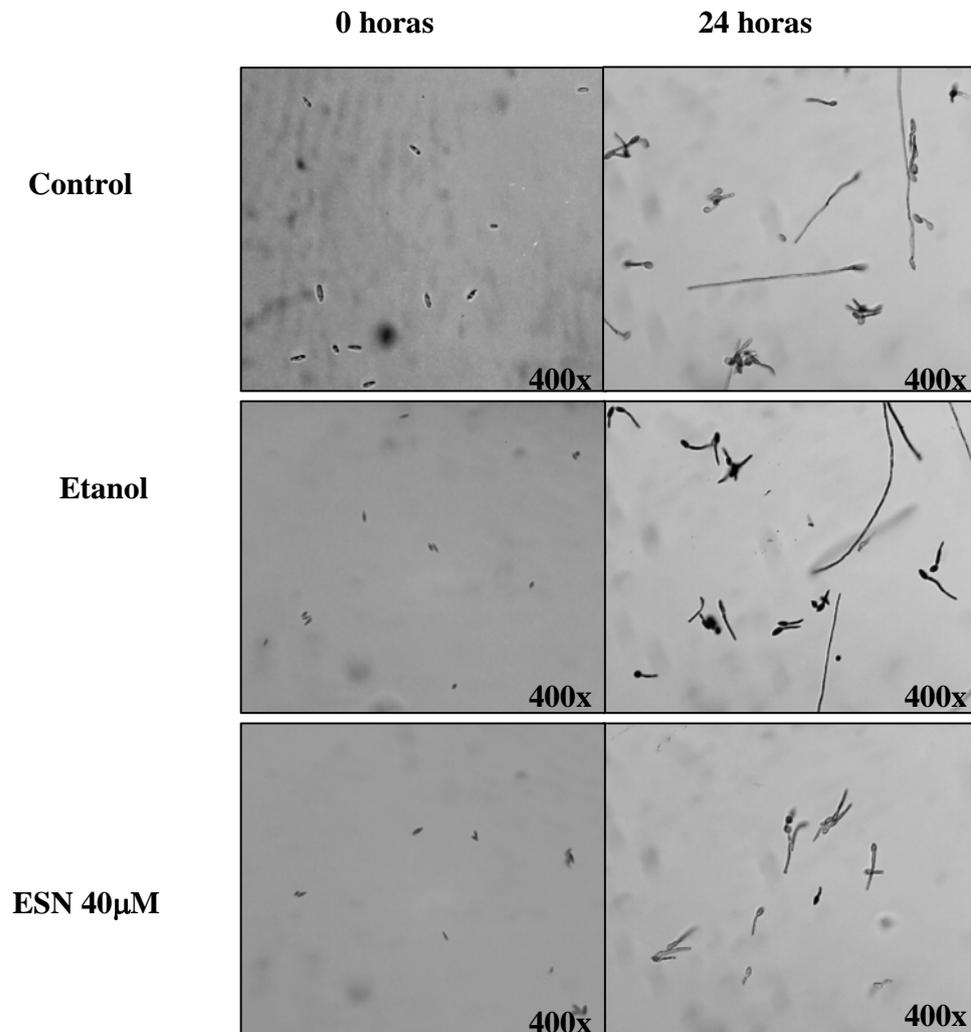


Figura 23. Efecto de la Esfinganina 40 μ M en la germinación de conidias de *F. verticillioides* (MY3) a las 24 horas de incubación en medio GYAM.

Al igual que en el ensayo anterior, se observa que ocurren dos efectos en presencia de la ESN 40 μ M; el primero es la reducción del número de conidias germinadas y el segundo es la reducción en el tamaño del tubo germinativo, las cuales se puede observar al comparar los controles con el tratamiento (Fig. 23).

Al comparar los ensayos podemos apreciar que se presenta el mismo efecto con ambas bases tanto en el medio GYAM como en el agua, donde se aprecia la reducción del

número de conidias germinadas y la reducción de la longitud del tubo germinativo. Comparando los efectos que producen las bases esfingoideas observamos que el efecto que se presenta en las muestras tratadas con esfinganina es más notorio que el que se presenta con fitoesfingosina a la misma concentración.

D. Cuantificación de FB1 por Cromatografía de capa fina (TLC).

Se realizó una evaluación preliminar de la producción y secreción de FB1, por cromatografía en capa fina a partir de los medios de cultivo líquido donde se creció el hongo por diferentes periodos de tiempo. Lo anterior se realizó para establecer el tiempo(s) óptimo(s) de incubación y saber si los niveles de FB1 podrían ser detectados por cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC). Se ha reportado que este método tiene un límite de detección de hasta 500 µg de FB1/gramo de sustrato y la presencia de la toxina se observa como una mancha color púrpura cuando se revela con una solución de *p*-anisaldehído.

Cromatografía en capa fina de extractos de medio GYAM de 1,5 y 7 días de incubación.

Se utilizó como estándar una solución de fumonisina B1 (1mM), de la cual se aplicaron volúmenes variables y mostró un Rf promedio de 0.20 cm. Se observaron manchas de color púrpura que migraron con un Rf cercano al del estándar en los extractos de los cultivos con 5 y 7 días de incubación (Fig 24). La intensidad de las manchas que se observaron es directamente proporcional a la concentración de FB1 presente en la muestra.

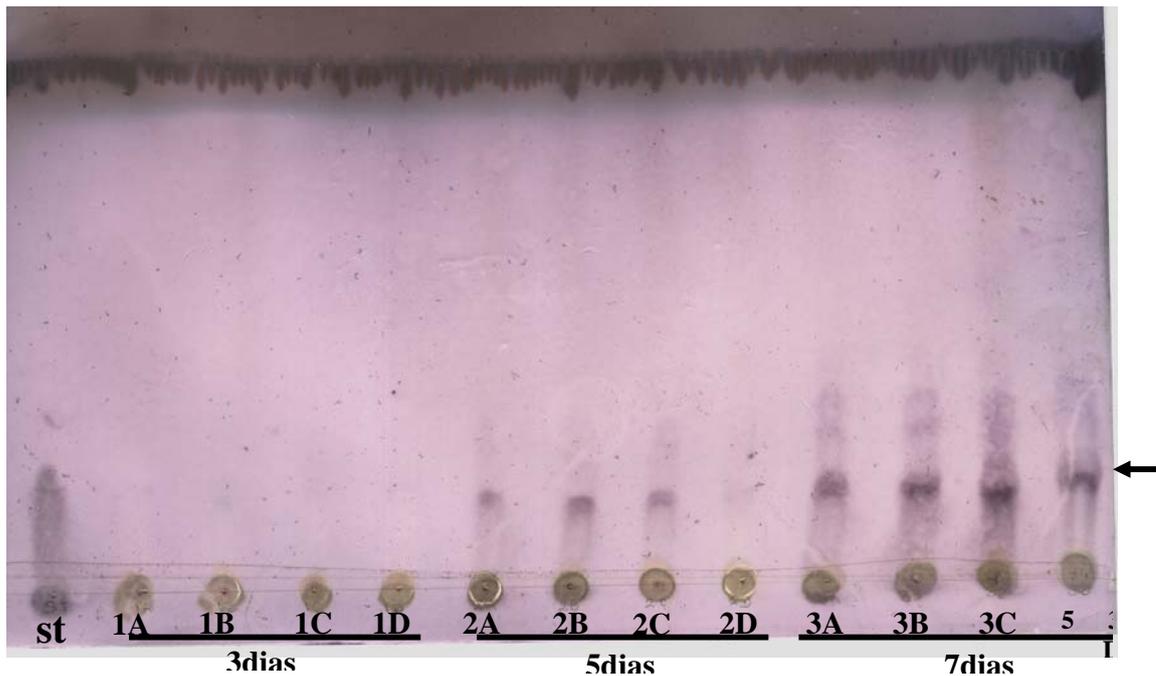
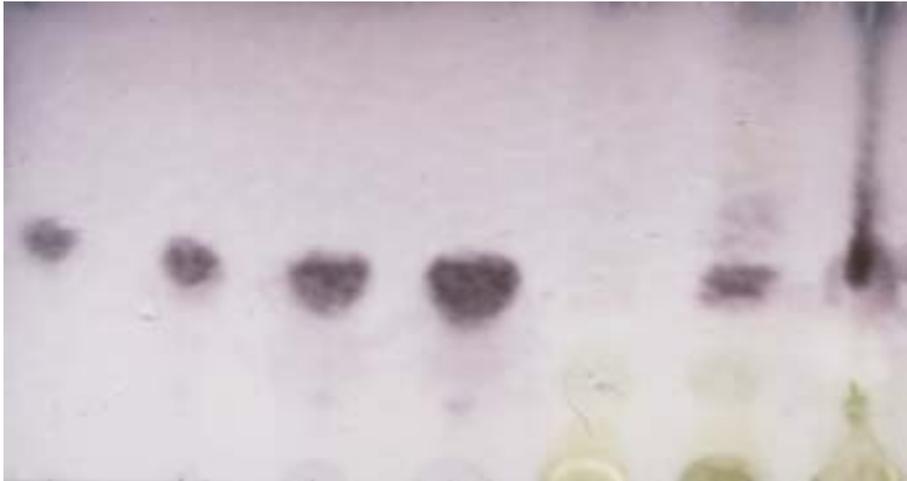


Figura 24: Análisis por cromatografía en capa fina de FB1 producida por *F. verticillioides* (cepa MY3) a tres tiempos de incubación diferentes. Esta cromatoplaque se preparó aplicando 20 μl de las muestra disueltas en 100 μl de ACN:H₂O 70:30 y se reveló por aspersion de *p*-anisaldehido en alcohol ácido.

La FB1 se detectó a partir de los 5 días de cultivo y la cantidad producida se incrementó a lo largo del tiempo, pues la mancha fue más intensa a los 7 días, con esto establecimos que para la cuantificación de FB1 por HPLC podíamos utilizar muestras de 5 a 7 días. Para estimar la concentración producida de FB1 a estos tiempos, se realizó una curva patrón en un rango de 2 a 16 nmoles (Fig. 25). Una vez revelada la placa, se analizó por densitometría y se gráfico los valores contra la cantidad de FB1 (Fig.26).



nmol 2 4 8 16 3 d 5 d 7 d

Figura 25: Cromatoplaca de la Curva patrón de FB1. En la cromatoplaca se aplicó cantidades variables de FB1 y los extractos de las muestras de 3, 5 y 7 días de cultivo de *F. verticillioides*.

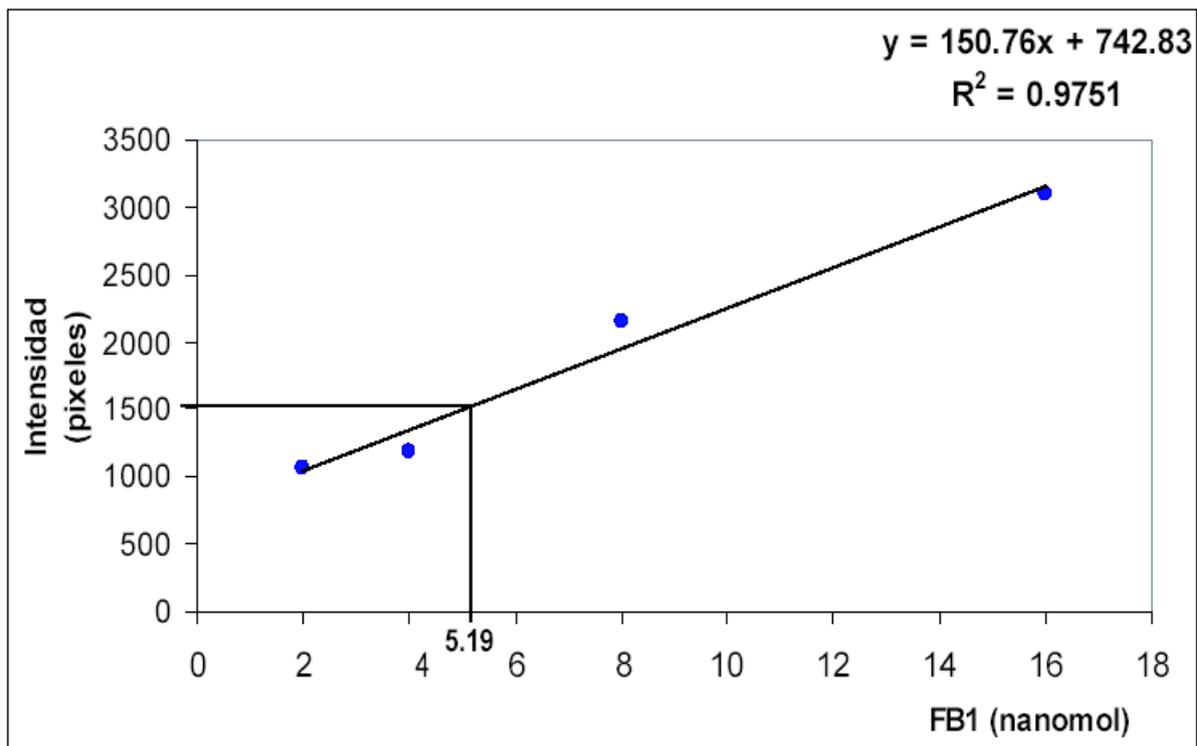


Figura 26. Curva patrón de FB1. Esta grafica se realizó calculando el área en pixeles de las manchas correspondientes a las diferentes concentraciones del estándar de FB1, (curva patrón) y de igual forma a las manchas correspondientes a las muestras.

Al graficar los resultados de la curva patrón, podemos estimar los niveles de FB1 producidos por las muestras utilizando la ecuación de la recta, solo se pudo estimar el valor de la muestra de 5 días que fue de 5 nmoles de FB1, debido a que la muestra de 7 días presenta una mancha de forma irregular que no pudo ser integrada.

E. Efecto de las bases esfingoideas en la producción de fumonisina B1.

El análisis cuantitativo de los niveles de FB1 producidos por *F. verticillioides* se realizó por cromatografía de líquidos de alta eficiencia, de los derivados fluorescentes de *o*-ftaldaldehído (OPA) de la FB1. Para este ensayo se utilizó una solución estándar de FB1 (1 mM) de la cual se hicieron las diluciones necesarias para elaborar curvas de calibración en el rango de 166 a 1333 fmol y de 62.5 a 200 fmol (Apéndice). Se hicieron algunos ajustes bajo las condiciones de flujo y fase móvil de tal manera que el derivado fluorescente de FB1 tuvo un tiempo de retención alrededor de 7.5 min (Fig. 27). Asimismo, se verificó que al inyectar FB1 en ausencia de OPA no se observara ningún pico y lo mismo se realizó con la fase móvil. Los extractos se eluyeron de tal forma que los niveles obtenidos se ajustaran a la curva patrón.

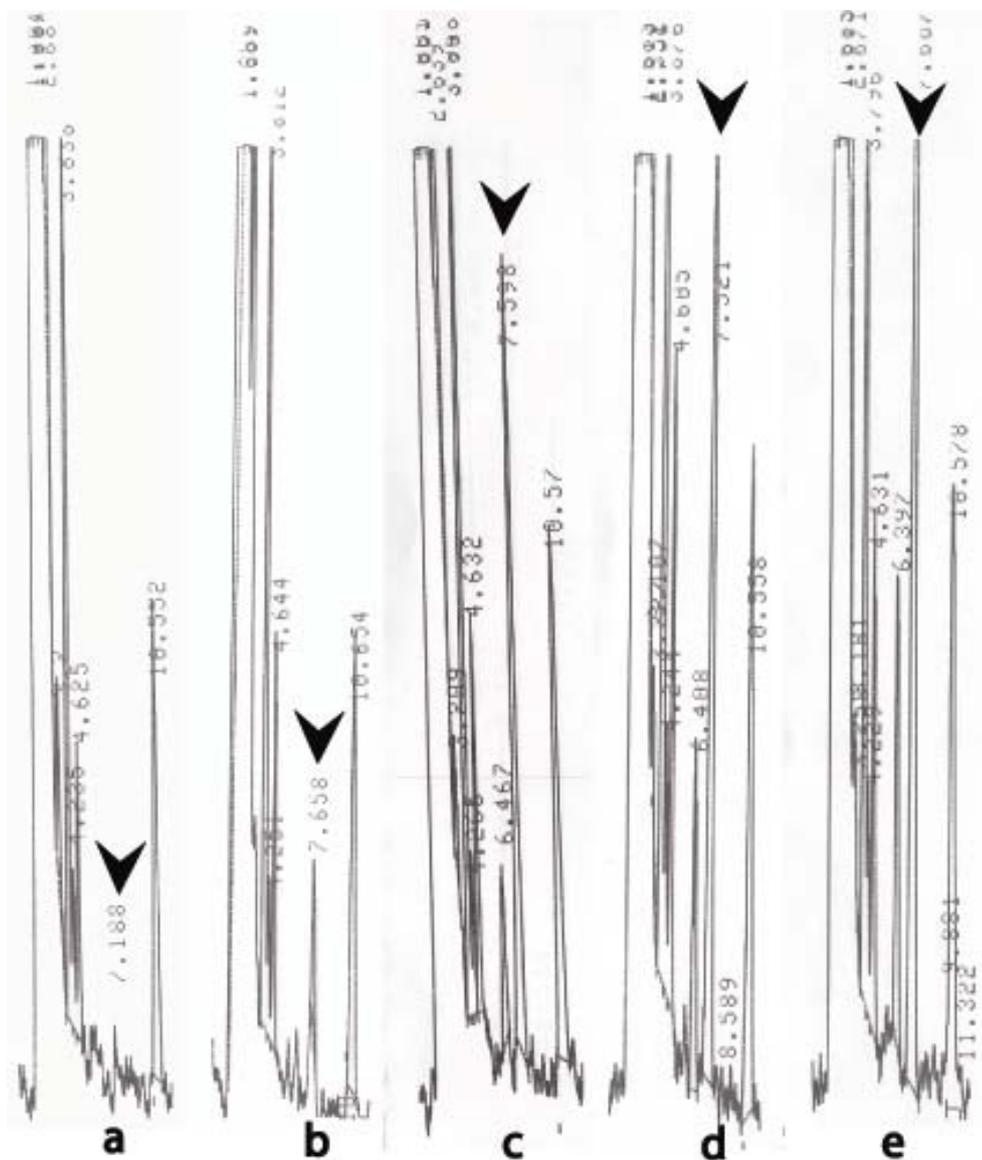


Figura 27: Ejemplo de los cromatogramas obtenidos de la inyección de cantidades crecientes de FB1. donde, a: Blanco, b:62.5 fmol, c:125 fmol, d:187.5 fmol, e:250 fmol, las flechas señalan el pico que corresponde a FB1, con un tiempo de retención de 7.1-7.8 min.

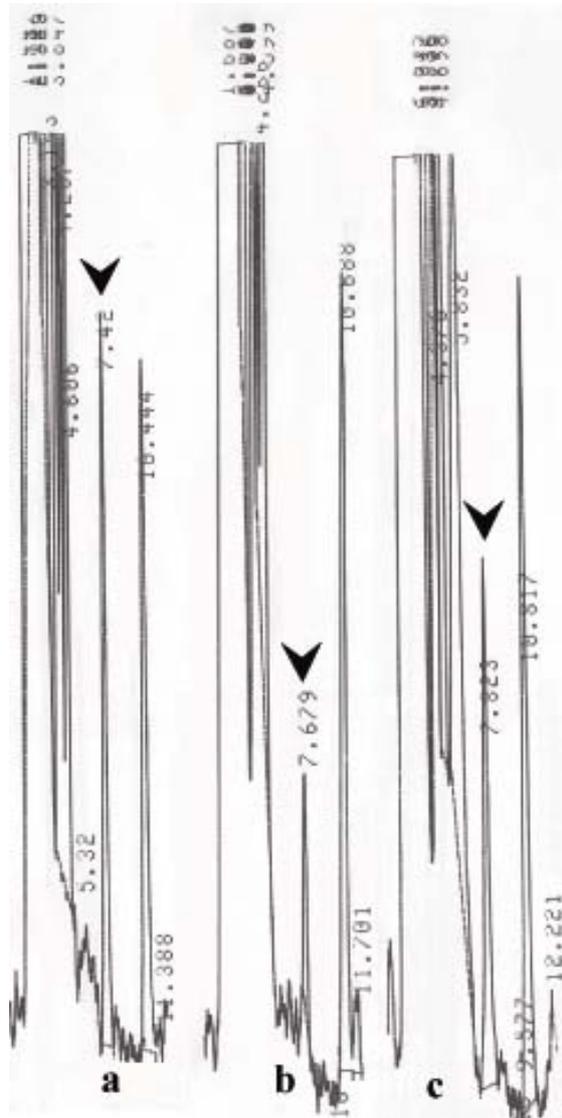


Figura 28_Ejemplo de los cromatogramas obtenidos en el análisis de Fumonisina B1 por HPLC en fase reversa. a: Cromatograma correspondiente a un estándar de FB1 (187.5 fmol). b: Cromatograma del medio de cultivo de *F. verticillioides* crecido en presencia de PSN por 2 días. c: Cromatograma del medio de cultivo de *F. verticillioides* crecido en presencia de ESN por 2 días. La flecha indica el pico correspondiente a FB1.

Efecto de la Fitoesfingosina en la producción de FB1 por *Fusarium verticillioides*.

Para este ensayo se utilizaron cultivos de *F. verticillioides* en medio GYAM de 8 y 9 días de incubación, a los cuales se les agregó PSN (40 μ M) al 6° día y se cosechó el micelio y el medio de cultivo dos y tres días después.

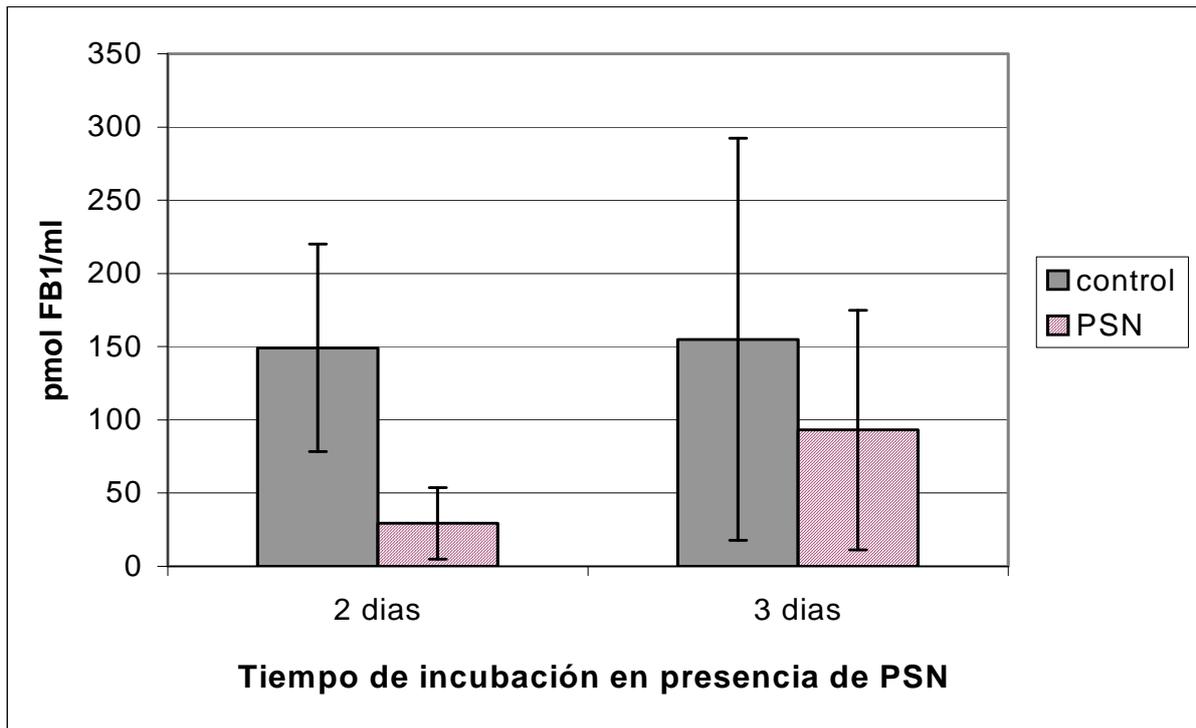


Figura 29. Niveles de FB1 producida por *F. verticillioides* (cepa MY3) crecido en ausencia y presencia de PSN 40 μ M por dos y tres días. Las determinaciones se realizaron por triplicado de muestras independientes.

En la figura 29 se observa que los niveles de FB1 producidos en ausencia de PSN no variaron entre los 2 y 3 días. Se observó una disminución en los niveles de FB1 detectados en las muestras tratadas con PSN y para el tiempo de 2 días esta reducción fue de aproximadamente el 84% con respecto al control. Si bien el valor de la media a los tres días fue menor que el control, la dispersión de los datos fue muy grande para obtener una conclusión válida.

Efecto de la Esfinganina en la producción de FB1 por *Fusarium verticillioides*

Para este ensayo se utilizaron cultivos de *F. verticillioides* en medio GYAM, a los cuales se les agregó esfinganina (40 μ M) al 6° día, se cosecharon el micelio y el medio de cultivo dos y tres días después de la adición de la base. Los resultados obtenidos se observan en la Figura 30 donde se muestran los resultados a los 2 y 3 días de exposición con la base.

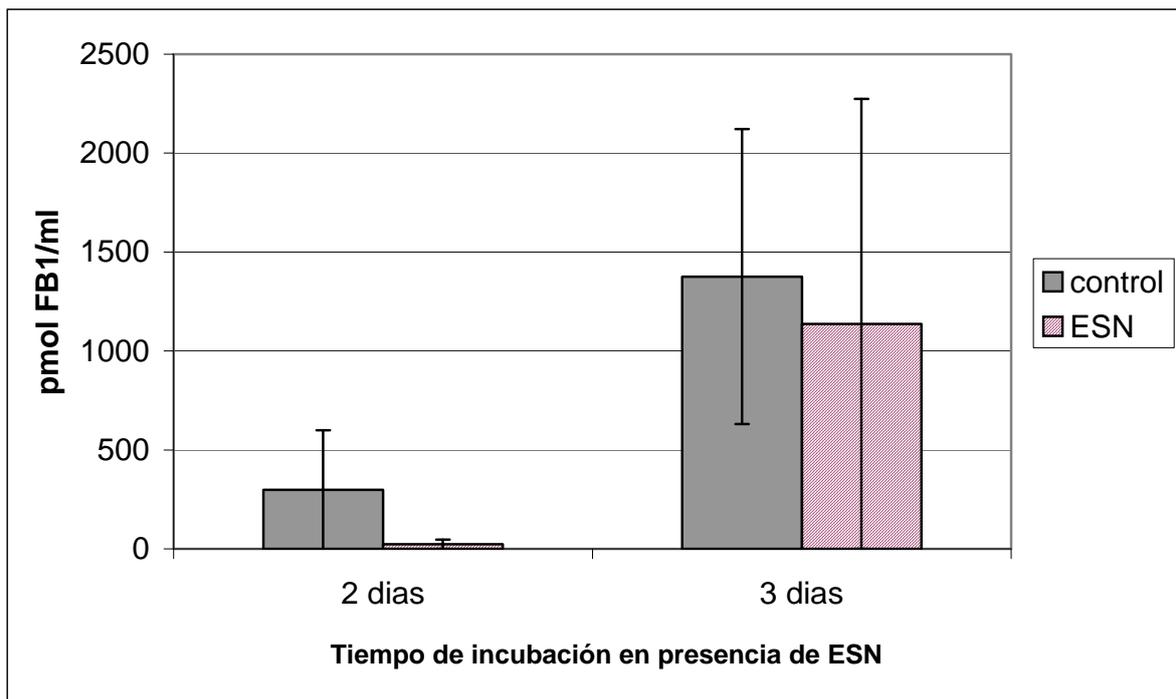


Figura 30: Niveles de FB1 producida por *F. verticillioides* (cepa MY3) crecido en ausencia y presencia de ESN 40 μ M por dos y tres días. Las determinaciones se realizaron por triplicado de muestras independientes.

También en estas condiciones se observó una reducción importante (88%) en los niveles de FB1 cuando se hizo la incubación con ESN a los dos días. Los resultados de este experimento mostraron una desviación muy grande, especialmente a los tres días.

Efecto de la mezcla de Fitoesfingosina/Esfinganina en la producción de FB1 por *F. verticillioides*.

Para este ensayo se utilizaron cultivos de *F. verticillioides* en medio GYAM a los cuales se les agregó la mezcla esfinganina (20 μ M) + fitoesfingosina (20 μ M) al 6^o día, dos y tres días después se cosecharon el micelio y el medio de cultivo. Los resultados obtenidos de FB1 a los 2 y 3 días de exposición a la mezcla (fig. 31).

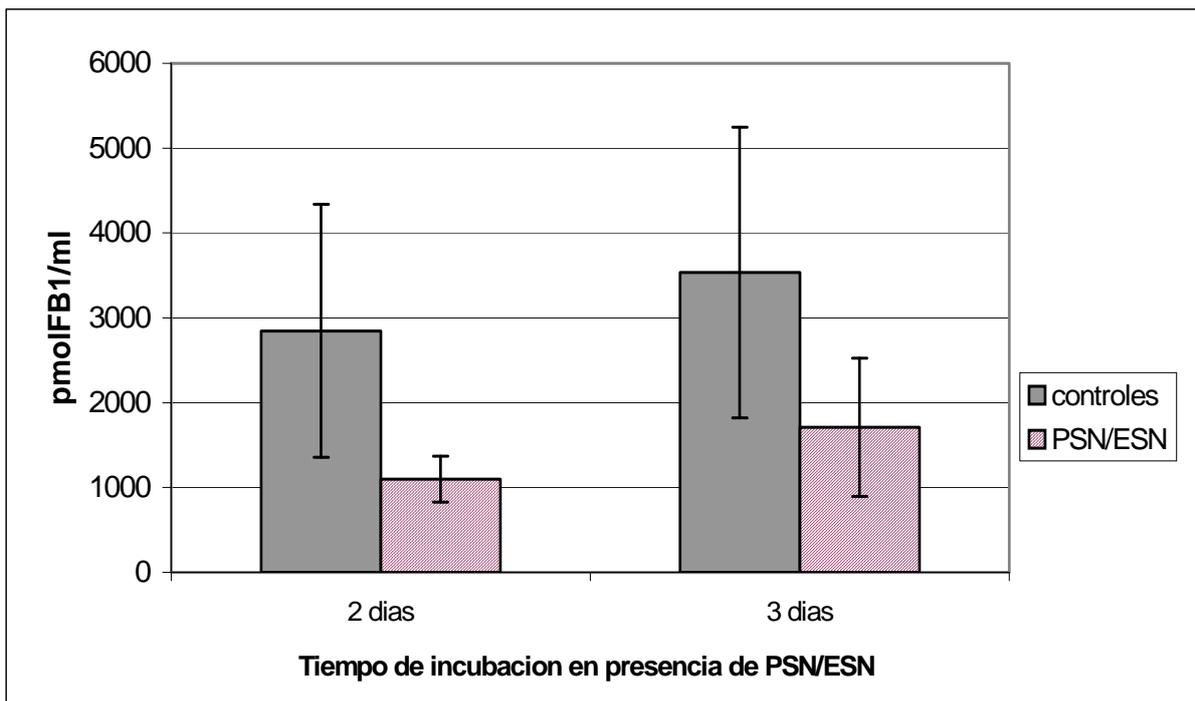


Figura 31: Niveles de FB1 producida por *F. verticillioides* (cepa MY3) crecido en ausencia y presencia de la mezcla PSN/ESN (40 μ M) por dos y tres días. Las determinaciones se realizaron por triplicado de muestras independientes.

Nuevamente, el efecto de las bases esfingoideas fue más claro a los dos días y se observó una reducción del 65% en los niveles de FB1 cuando se incubó el hongo en presencia de la mezcla PSN/ESN. A los tres días se observaron diferencias en los valores de la media pero no fueron significativos debido a la dispersión de los datos.

F. Efecto de las bases esfingoideas sobre la expresión de genes de la biosíntesis de fumonisinas.

Cuantificación de los niveles de transcritos de los genes *FUM1* y *FUM8* por RT-PCR.

Para asociar los cambios que ocurren por la presencia de las bases esfingoideas en los niveles de producción de FB1, se cuantificaron los niveles de transcritos de dos genes esenciales para la biosíntesis de FB1 el gen *FUM1* y el gen *FUM8*. El gen *FUM1*, codifica para una proteína con actividad de policétido sintasa (PKS). El gen *FUM8*, codifica para la enzima que condensa la *L*-alanina con el policétido.

Estos ensayos se realizaron a partir de muestras de RNA total obtenido del micelio del hongo incubado por 2 y 3 días con la base esfingoidea respectiva, como se describió en los experimentos de producción de FB1. Se utilizó el transcrito de tubulina (*TUB*) como control de cargado, ya que este gen se expresa constitutivamente.

Efecto de la fitoesfingosina en los niveles de transcritos de *FUM 1* y *FUM 8*.

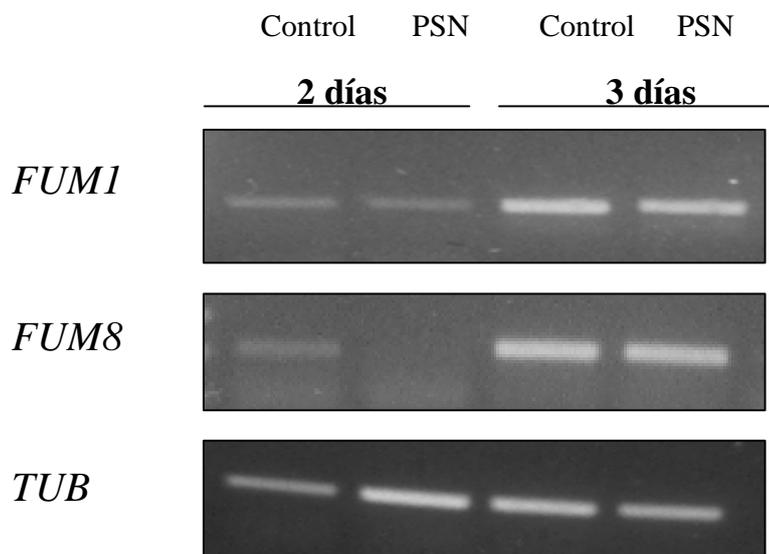


Figura 32: Niveles de transcrito de los genes *FUM1* y *FUM 8* en muestras de 2 y 3 días en presencia de PSN 40 μ M determinados por RT-PCR a partir de RNA total.

La cuantificación de los niveles de transcrito se logró mediante la densitometría de cada una de las bandas y la normalización de éstas mediante el control de cargado. Los resultados obtenidos se reportaron como la relación con respecto a su control (Fig. 33).

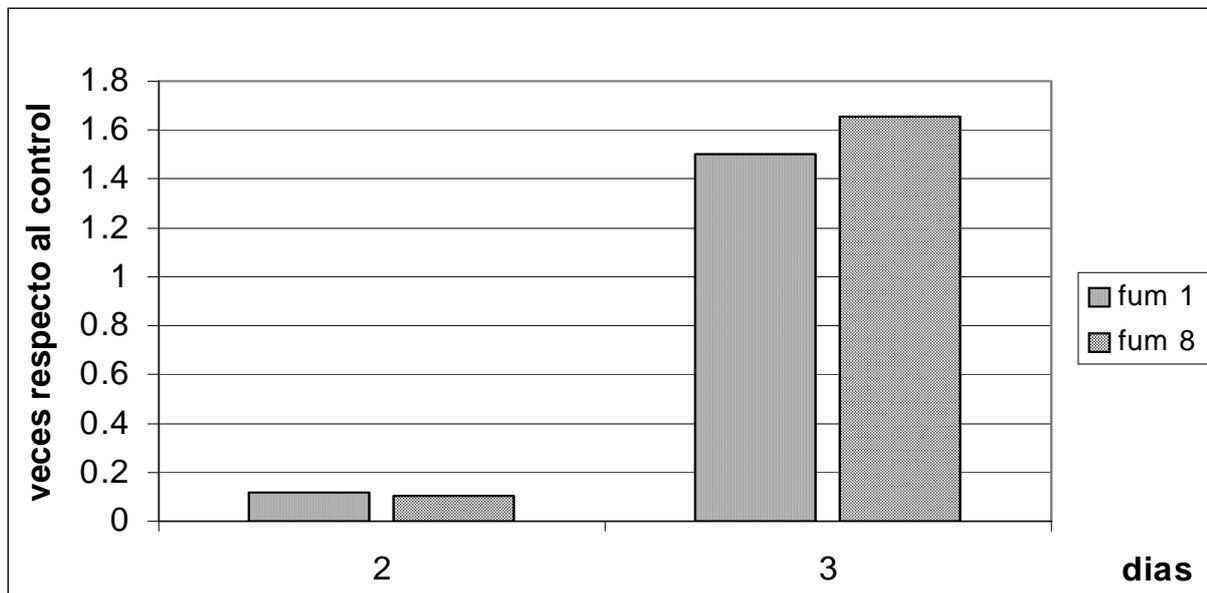


Figura 33: Niveles de expresión de los transcritos de los genes *FUM1* y *FUM8*, de muestras de 2 y 3 días en presencia de PSN 40 μ M, los resultados se expresan en veces respecto a su control.

Se puede apreciar que los niveles de expresión de ambos transcritos, *FUM1* y *FUM8* en las muestras que corresponden a 2 días de incubación con PSN, son mucho menores que el control respectivo. Esta reducción es aproximadamente 8 veces con respecto a los niveles detectados en el control. Sin embargo, a 3 días de incubación con PSN, los niveles de ambos transcritos, *FUM 1* y *FUM 8*, aumentaron discretamente (50 a 60%) respecto a las muestras no tratadas. Estos datos concuerdan con los resultados de la cuantificación de FB1 por HPLC, ya que cuando se cuantifican los niveles producidos en presencia de PSN se observa que en muestras de 2 días los niveles de FB1 son menores respecto al control.

Efecto de la esfinganina en los niveles de transcritos de *FUM 1* y *FUM 8*.

También la esfinganina provocó una reducción en los niveles de transcrito de los genes *FUM8* y *FUM1* a los 2 días de incubación (Fig. 34). A los 3 días las diferencias en los niveles del transcrito *FUM1* ya no fueron tan claras, pero el nivel del transcrito de *FUM8* decreció de manera importante (Fig. 35). Esta observación se reflejó cuando se hizo la cuantificación por densitometría (Fig. 36), que refleja un decremento del 50 al 90% en los niveles del transcrito *FUM8* y una reducción del 80% en los niveles del transcrito *FUM1* a los 2 días.

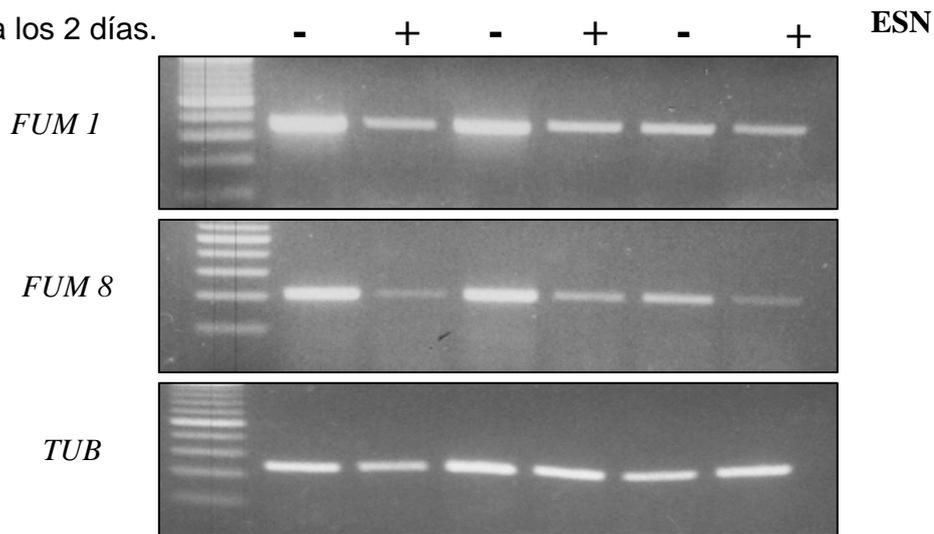


Figura 34: Niveles de expresión de los genes *FUM 1* y *FUM 8* en muestras de 2 días de incubación en presencia de ESN 40 μ M.

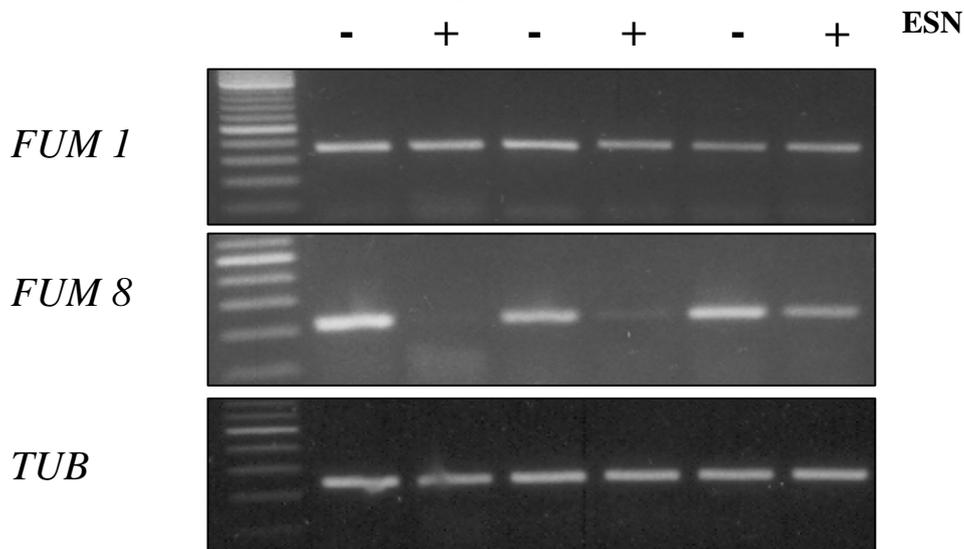


Figura 35: Niveles de expresión de los genes *FUM 1* y *FUM 8* en muestras de 3 días de incubación en presencia de ESN 40 μ M.

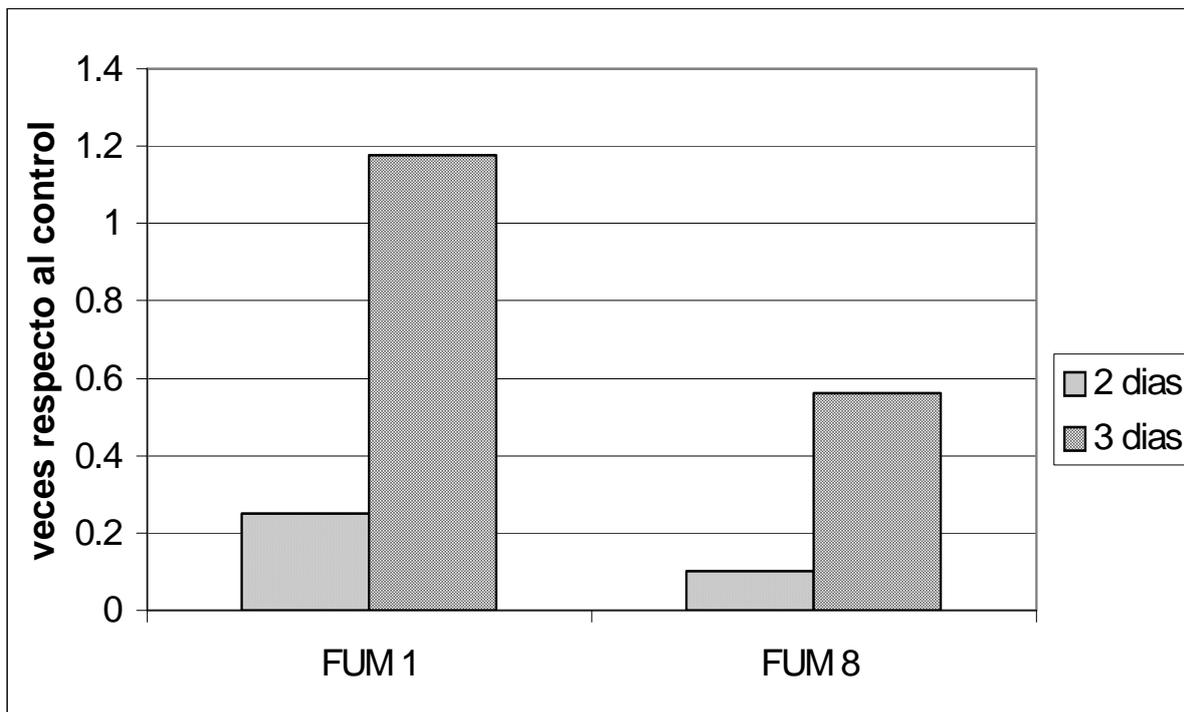


Figura 36: Niveles de expresión de los transcritos de *FUM1* y *FUM8*, de muestras de 2 y 3 días en presencia de ESN 40 μ M.

Ensayo 3: Expresión de los transcritos de *FUM1* y *FUM8* en muestras de 2 y 3 días de incubación en presencia de la mezcla de Fitoesfingosina/Esfinganina (PSN/ESN).

Para este ensayo se utilizó una mezcla de PSN 50 μ M y ESN 50 μ M para tener una concentración final de 100 μ M.

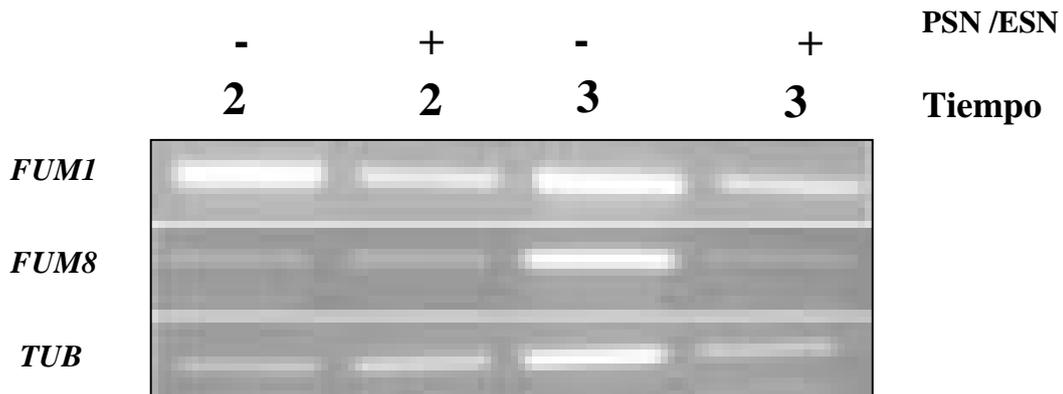


Figura 37: Niveles de expresión de los genes *FUM 1* y *FUM 8* en muestras de 2 y 3 días de incubación en presencia de una mezcla de PSN/ ESN 100 μ M.

En la figura 37 se observa que la mezcla de las bases afecta la expresión de los transcritos de *FUM 1* a los 2 tiempos de incubación, ya que la intensidad de las bandas se ve disminuida, mientras que para los transcritos de *FUM 8* parece solo afectar su expresión a los 3 días de incubación en presencia de la mezcla. Para cuantificar los efectos que se provocan en la expresión de los transcritos se realizó la densitometría de cada una de las bandas y la normalización de estas utilizando el control de cargado. Los resultados se reportan en veces con relación al control (Fig. 38)

En la gráfica podemos observar el efecto que tiene la mezcla de las bases esfingoideas en la expresión de *FUM 1* y *FUM 8*, donde se ve que los niveles de expresión alcanzados a los 2 y 3 días de incubación con la mezcla son alrededor de un 20% menores que los niveles detectados en los controles.

Lo anterior concuerda con los niveles de FB1 detectados por HPLC en presencia de la mezcla de las bases ya que en ese ensayo observamos que los porcentajes de disminución de los niveles de FB1 para ambos tiempos son muy cercanos entre las muestras, este mismo efecto lo observamos en la gráfica de arriba, donde vemos que los niveles de expresión de ambos transcritos a los dos tiempos son casi iguales.

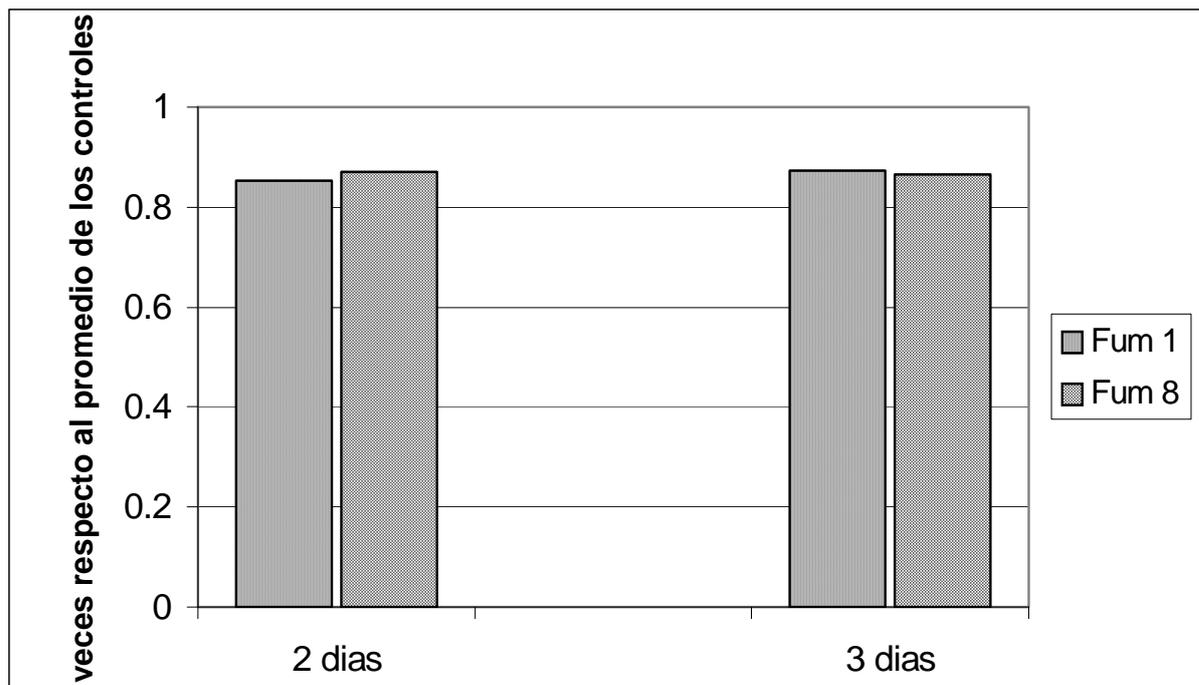


Figura 38: Niveles de expresión de los transcritos de *FUM8* y *FUM 1*, de muestras de 2 y 3 días en presencia de ESN 40 μ M.

VII. DISCUSION.

Efecto de las bases esfingoideas fitoesfingosina y esfinganina en el crecimiento y desarrollo de *Fusarium verticillioides*.

Los esfingolípidos son considerados biomoléculas con importantes implicaciones en el reconocimiento y comunicación celular, así como en la regulación del crecimiento y otros procesos relacionados con la patogénesis. Se ha demostrado que la esfingosina (ESN) es una molécula altamente bioactiva en mamíferos, que se puede difundir a través de las membranas celulares muy fácilmente, lo cual le permite tener efectos en diferentes compartimentos celulares aunque no se han caracterizado sus funciones, mientras la fitoesfingosina (PSN) se encuentra de manera abundante en plantas y levaduras. La PSN en *Saccharomyces cerevisiae* desarrolla un papel muy importante en la respuesta al estrés por calor (Hannun et al., 2001). Se ha demostrado que la PSN y la ESN (4µg/ml) tienen un efecto antifúngico sobre *Aspergillus niger* (Mormeneo et al., 2008), induciendo el proceso de muerte celular irreversible (Cheng et al., 2003).

En este estudio evaluamos los efectos producidos por las bases esfingoideas (fitoesfingosina y esfinganina) sobre el desarrollo de *F. verticillioides*. Nuestros resultados indican en general que la fitoesfingosina (PSN) tiene un efecto discreto sobre el desarrollo de *F. verticillioides*, mientras esfinganina (ESN) presenta un mayor efecto sobre éste, lo anterior se ve reflejado en la disminución del número de conidias producidas, en la disminución del crecimiento radial y en la disminución en la geminación de sus conidias en presencia de diferentes concentraciones de bases esfingoideas.

Se observó que la fitoesfingosina provocó una disminución en la producción de conidias, esto se determinó por cuenta directa, sin embargo, es difícil obtener una conclusión sobre el efecto de esta base esfingoidea pues el control con etanol causó una reducción de aproximadamente el 30% en el número de conidias, mismo efecto que mostró la concentración más alta de fitoesfingosina (40 µM). Además, los datos con las distintas concentraciones de fitoesfingosina mostraron una gran dispersión. También se utilizó un método indirecto donde se midió la turbidez de la suspensión de conidias y la producción de pigmento rojo espectrofotométricamente, con el fin de relacionar estos resultados con los niveles de biomasa producidos, sin embargo, a pesar de los resultados

obtenidos no podemos afirmar que este parámetro guarde una relación proporcional con la biomasa debido a que para establecer esta relación se deben de estudiar otros factores.

En los experimentos en los que evaluamos el efecto en la germinación de las conidias se observa una reducción del número de conidias en presencia de cada una de las bases siendo el efecto más evidente en presencia de ESN. Lo anterior concuerda con los resultados reportados por Castro et al., 2008, donde se evaluaron los efectos que produce la fitoesfingosina (PSN 10 $\mu\text{g/ml}$) sobre el hongo *Neurospora crassa*. Dos parámetros importantes que se observaron en este trabajo fueron la viabilidad de las esporas sexuales (conidias) de *N. crassa* después de la exposición a PSN y el efecto que tiene sobre la germinación. La exposición de las conidias de *N. crassa* wt a PSN por un tiempo prolongado (120 min) da como resultado la muerte del 80% de las células. También evaluaron el efecto de la PSN sobre la germinación, donde se encontró que ésta fue inhibida en 50% y el inicio de la germinación tuvo en retraso de 2 h con respecto a los controles (Castro et al., 2008). Un efecto similar observamos cuando se exponen las conidias de *F. verticillioides* a PSN o ESN, ya que se presentó una disminución en la germinación y en la longitud del tubo germinativo a las 22 y 42 horas de incubación. Con base en la información presentada por Granjo et al., 2007 donde se presentan los resultados de las curvas de crecimiento de las conidias de *F. verticillioides* en medio de cultivo Jacson & Benett, el cual es un medio rico en sales, glucosa y factores de crecimiento (ver apéndice) lo cual favorece la aparición del tubo germinativo en las primeras 4 horas pos inoculación por lo que se esperaría que para tiempos de incubación mayores de 4 horas en medio GYAM, el cual es un medio rico en glucosa que favorece el desarrollo de las conidias, estas contarán con la presencia del tubo germinativo, y al rededor de las 24 horas comenzara la formación de las hifas, esto siguiendo sus condiciones de estudio, por lo que lo anterior solo podemos tomarlo como una aproximación. Pues, nosotros vemos que las conidias que se incubaron en agua tienen la aparición del tubo germinativo dentro de las primeras 24 horas y a las 42 horas ya ha comenzado la formación de hifas. Mientras las conidias incubadas en medio GYAM presentan la aparición del tubo germinativo durante las primeras 9 horas, y a las 21 horas ya se ha comenzado la formación de hifas. Cuando tenemos presentes alguna de nuestras bases estos cambios morfológicos se observan a tiempos más largos.

El efecto de las bases esfingoideas sobre el desarrollo de *F. verticillioides* también se observó a través de la determinación del crecimiento radial de la colonia en medio de

cultivo PDA. Al suplementar este medio con PSN o ESN se observó una reducción significativa y dependiente de dosis en el tamaño de la colonia. Varios experimentos realizados por Dickson et al. (2002) en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* muestran a los esfingolípidos como metabolitos que regulan el crecimiento aunque su modo de acción aún no es claro. Un ejemplo de esto es la inhibición del crecimiento al adicionar bases exógenas, los cuales bloquean la absorción de nutrientes del medio de cultivo, esto sugiere que LCB's exógenos podrían regular el transporte de nutrientes o afectan la membrana del hongo. Tomando en cuenta lo anterior podemos pensar que la disminución del diámetro de la colonia está relacionada con una deficiente absorción de nutrientes o bien por la inducción de un proceso de muerte celular.

Efecto de las bases esfingoideas en la producción de fumonisina B1.

La mayoría de las micotoxinas, incluyendo la FB1 pertenecen a los metabolitos secundarios de los hongos, es decir estos compuestos se producen después de que uno o más nutrientes son limitados. Los metabolitos secundarios son producidos a partir de uno o más metabolitos primarios. Los metabolitos primarios son compuestos producidos antes de que los nutrientes sean absorbidos, catabolizados y después metabolizados a compuestos como acetatos, aminoácidos o ácido glutámico. La producción de metabolitos secundarios está regulada principalmente por la existencia de las condiciones que favorecen el crecimiento del hongo. (Miller, 2001). En hongos filamentosos, generalmente los genes de las enzimas responsables de la biosíntesis de los metabolitos secundarios se encuentran en agrupados en regiones denominadas cluster (Proctor et al., 2002). En el caso de *F. verticillioides* se ha localizado un locus *FUM* en el cromosoma 1, que está conformado por 15 genes *FUM*, los cuales han recibido el nombre de genes estructurales de la ruta biosintética de la fumonisina.

La caracterización molecular de *FUM1* (poliquétido sintasa), *FUM6* (citocromo P450 monooxigenasa), y *FUM8* (aminotransferasa), demostró que su presencia es crítica para la biosíntesis de FB1 pues la interrupción de cualquiera de ellos provoca una reducción significativa en los niveles de producción de la toxina (Shankar et al, 2006).

El producto de *FUM8* es muy similar a la clase II de α aminotransferasas, las cuales pertenecen a un grupo de enzimas que catalizan la condensación de los aminoácidos con acil-CoA (Seo et al., 2001). Cuando este gen es eliminado, no se detectan fumonisinas.

Dada la importancia de estos dos genes en la biosíntesis de fumonisinas se determinaron los niveles de transcrito de estos genes como una medida de su expresión. Cuando las colonias son tratadas con PSN 40 μ M por 2 días, se observó que los niveles de expresión de los transcritos tanto de *FUM1* como de *FUM8* se redujeron aproximadamente un 90 % con respecto al control, lo cual se vio reflejado en los niveles de FB1 cuantificados por HPLC, donde también se observó una reducción. Al cuantificar los niveles de ambos transcritos en colonias tratadas con PSN 40 μ M por 3 días, se observó que los niveles de expresión aumentaron discretamente con respecto al control. Estos resultados nos reflejan que la PSN provoca una alteración en la biosíntesis de FB1 aunque no es claro cual es el blanco específico de esta base esfingoidea, pero el efecto que produce es disminuir los niveles de FB1.

El efecto que se observó en los niveles de los transcritos de *FUM1* y *FUM8* al exponer a *F. verticillioides* a la presencia de ESN 40 μ M por 2 días, fue una reducción en su expresión de alrededor de un 90% respecto a su control. Este efecto concuerda con los niveles cuantificados de FB1 por HPLC, ya que estos fueron menores a su control. Sin embargo, los niveles de expresión de *FUM1* a los 3 días de tratamiento con ESN aumentaron casi un 20 % respecto a su control, pero este efecto no se observó con el transcrito de *FUM8*, ya que a los 3 días de tratamiento con ESN los niveles de expresión se redujeron casi un 40 %.

Cuando utilizamos una mezcla de las bases PSN/ESN (40 μ M), se observó que la expresión de los genes *FUM1* y *FUM8* a los 2 y 3 días se ve disminuida alrededor de un 18% respecto a su control. Estos resultados también se ven reflejados en los niveles de FB1 cuantificados por HPLC, ya que para ambos tiempos la producción se ve disminuida con respecto a su control y para ambos casos esta reducción es cercana al 50%.

En el escenario de la interacción *Fusarium* – maíz el hongo produce fumonisinas que interrumpen el metabolismo de esfingolípidos en la célula vegetal, causando la acumulación de bases esfingoideas que posiblemente median la muerte celular, y eventualmente la lisis celular. Por esta lisis, las bases esfingoideas acumuladas se liberan y entran en contacto con el hongo, posiblemente afectando entonces su crecimiento y la producción de fumonisinas.

VIII. CONCLUSIONES.

- Se observó que la presencia de las bases esfingoideas (ESN y PSN) provocaron una disminución en el crecimiento y desarrollo de *F. verticillioides* (crecimiento radial, la germinación y conidiación).
- Observamos que la mezcla (50/50) de ESN y PSN no produce efectos mayores que los que se presentan cuando se adiciona cada base de manera individual.
- Las bases esfingoideas (PSN y ESN) alteran la biosíntesis de fumonisina, de manera transitoria, lo cual provoca una disminución en la producción de FB1 y en la expresión de genes de la ruta biosintética

IX. PERSPECTIVAS.

- Realizar un ensayo en el que se estudie el efecto de concentraciones menores de las bases esfingoideas sobre la producción de fumonisina y la expresión de los genes de la ruta biosintética.
- Estudiar el efecto de las bases sobre la producción de FB₂ debido a que esta fumonisina es la segunda más abundante a nivel producción.
- Estudiar el efecto de las bases esfingoideas en los niveles de expresión de los genes reguladores de la biosíntesis de fumonisinas en *F. verticillioides*.

IX. BIBLIOGRAFIA.

- Abbas H.K, Tanaka T, Duke S.O, Porter J.K, Wray E.M, Hodges , L.,Sessions A.E, Wang E.,Merril A.H, Ryley R.T. 1994. Fumonisin and AAL toxin induced disruption of sphingolipids metabolism with accumulation of free sphingoid bases. *Plant Physiology* 106: 1085-1093.
- Ayerst G. 1969. The Effect of moisture and temperature on growth and spore germination in some fungi. *Journal of Stored Product Research*. 5: 127 – 141.
- Beremand M, McCormick S.P. 1992. Biosynthesis and regulation of trichothecene production by *Fusarium* species. *Handbook of Applied Mycology*. 5: 359-384.
- Bohinski Robert C., 1998. *Bioquímica*. 5^{ta} edición. Editorial Pearson Educación. México. pp 418-456.
- Bourne H.R, Sanders D.A, McCormick F. 1990. The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. *Cell Nature*. 348:125-132
- Bluhm B.H, Woloshuk C.P. 2006. FcK1, a C-Type cyclin-dependent kinase, interacts with Fcc1 to regulate development and secondary metabolism in *Fusarium verticillioides*. *Fungal Genetics and Biology*, 43: 146-154.
- Brandwagt B, Mesbah L, Takken F, Laurent P, Kneppers T, Hille J, Nijkamp J. 2000. A longevity assurance gene homolog of tomato mediates resistance to *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici* toxins and fumonisin B1. *Proceedings National Academy Sciences, USA* 97: 4961-4966.
- Brown D, Butchko R, Busman M, Proctor R. 2007. The *Fusarium verticillioides* *FUM* gene cluster encodes a Zi(II)2Cys6 Protein that affects *FUM* gene expression and fumonisin production. *Eukaryotic Cell*. 6: 1210-1218.
- Cameron B R, 1995. *Procesos malignos del esófago en oncología Práctica*. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires, 242-253.
- Carter H.E, Glick F.J, Norris W.P, Philips G.E. 1947. Biochemistry of the sphingolipids. III. Structure of sphingosine. *Journal of Biological Chemistry*. 170: 285-295.
- Castro A, Lemos C, Falcao A, Glass L, Videira A. 2008. Increased resistance of complex 1 mutants to phytoesphingosine-induced programmed cell death. *Journal of Biological Chemistry*. 283: 19314-19321.
- Cheng J, Park T, Chio L, Fisch A, Ye X. 2003. Induction of apoptosis by sphingoid Long-Chain Bases in *Aspergillus nidulans*. *Molecular and Cell Biology*. 23: 167-177.

- De Nijs M, Van Egmond H, Nauta M, Rombouts F, Notermans S. 1997. Assesment of human exposure to Fumonisin B1. *Journal of Food protection*. Vol. 661, issue 7, pp 879-884.
- Desjardins A E, Proctor R H. 2001. Biochemistry and genetics of *Fusarium* toxins. en :*Fusarium*. Summerell. Editorial:APS Press. St. Paul, Minnesota. pp 22 – 137.
- Devlin T.M. 2004 “Bioquímica” 4^{ta} edición. Editorial: Reverte. Barcelona España.
- Du L, Zhu X, Gerber R, Huffman J, Lou L, Jorgenson J, Yu F, Zaleta-Rivera K, Wang Q. 2008. Biosynthesis of sphinganine-analog mycotoxins. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 35: 455-464.
- Eun-Kyung K, Maragos C, Kendra D. 2004. Liquid chromatographic determination of fumonisins B1, B2 and B3 in corn silage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52:196-200.
- Fennema. O. 1993. “Química De Alimentos” .Editorial Acribia. Zaragoza, p.p 158-161, 221-261.
- Flaherty J. E, Woloshuk C. 2004. Regulation of fumonisin biosynthesis in *Fusarium verticillioides* by a Zinc binuclear cluster-Type Gene, ZFR1. *Applied and Environmental Microbiology*. 5: 2650-2659.
- Flaherty J E, Pirttitlâ A, Bluhm H, Woloshuk P. 2003. PAC1, a pH regulatory gene from *Fusarium verticillioides*. *Applied and Environmental Microbiology*. 69: 5222-5227.
- Frisvard J, Smedgard J, Samson R, Larsen T, Thrane U. 2007. Fumonisin B2 production by *Aspergillus niger*. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 55(23): 9727-9732.
- Granjo C, Alves dos Reis T, Gambale W, Correra B. 2007. Morphogenesis and growth kinetic of *Fusarium verticillioides*. *Mycopathologia*. 164: 119-126.
- Greaves-Fernández N. 2005. Efecto de esfingolípidos en la expresión del gen de la glicoproteína rica en hidroxiprolina de Maíz. Tesis Maestría, Facultad de Química. UNAM Posgrado en Ciencias Bioquímicas.
- Hannun Y, Chiara L, Argraves K. 2001. Enzymes of sphingolipid metabolism: from modular to integrative signaling. *Biochemistry*. 40: 4893-4900.
- Harris D C. 2001. Análisis químico cuantitativo. Editorial. Reverte, S. A. Barcelona España.
- Hendricks K, 1999. Fumonisin and neural tube defects in South Texas. *Journal of Epidemiology*. 10: 198-200.
- Hu, L.B., Zhang, T., Yang, Z.M., Zhou, W., Shi, Z.Q. 2008. Inhibition of fengycins on the production of fumonisin B1 from *Fusarium verticillioides*. *Letters in Applied Microbiology*. Vol.48. pp 84-89.

- Jackson L S, Hlywka J J, Senthil K R, Bullerman L B, Musser S M. 1996. Effects of time, temperature, and pH on the stability of fumonisin B1 in an aqueous model system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 44: 906-912.
- Jazwinski M, Conxselmann A. 2002. LAG1 puts the focus on ceramide signaling. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 34:1491-1495.
- Kim H, Woloshuk. 2008. Role of AREA, a regulator of nitrogen metabolism, during colonization of maize kernels and fumonisin bioynthesis in *Fusarium verticillioides*. *Fungal Genetics and Biology*, 45:947-953.
- Lynch D, Dunn T. 2004. An introduction to plant sphingolipids and review of recent avances in understanding their metabolism and fuction. *New Phytologist*. Vol 161: 677-702.
- Marmoneo, Manresa A, Casas J, Llebaría A, Delgado A. 2008. “ Fungal growt inhibitory properties of new phytosphingolipid analogues”. *Journal of Applied Microbiology*, 104, 1075-1081
- Murray R.K, 1994, *Bioquímica de Harper*, Editorial: El manual moderno, México.
- Nelson PE, 1992. Taxonomy and biology of *Fusarium moniliforme*. *Mycopathologia*, 117: 29-36
- Nelson P.E, Toussoun T.A, Marasas ,WOF. 1983. *Fusarium species, An ilustrated manual for identification*. The Pennsylvania State. University Press: University Park, PA. pp:1-193
- Pascale M., Visconti A, Pronczuk M, Wisniewska H, Chelkowski J. 2002. Accumulation of fumonisins, beauvericin and fusaproliferin in maize hybrids inoculated under field conditions with *Fusarium proliferatum*. *Mycological Research*. 106: 1026-1030.
- Picot A., Barreau C., Pinson-Gadais L.,Caron D.,Lannou C., Richard-Forget F. 2010. Factors of the *Fusarium verticillioides*-maize enviroment modulating fumonisin production. *Critical Reviews in Microbiology*,1-11.
- Plasencia de la Parra J., Yescas Huerta K., Rivas San Vicente M. 2001. La interacción de *Fusarium*-Maiz como modelo para estudiar el papel de los esfingolípidos en el desarrollo vegetal”. *Avances en Bioquímica y Biología molecular en plantas*. UNAM Facultad de Química.
- Proctor RH, Plattner R.D., Brown D.W., Desjardins A.E. 2002. Organization and distribution of fumonisin biosynthetic genes in *Fusarium*. *Mycopathologia*. 155: 29.

- Proctor R., H., Plattner R., Brown D, Seo J.A, Lee Y.W. 2004. Discontinuous distribution of fumonisin biosynthetic genes in the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycological Reserch*. 108: 815-822.
- Proctor R., H., Plattner R., Brown D, Seo J.A, Lee Y.W. 2004. Discontinuous distribution of fumonisin biosynthetic genes in the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycological Reserch*. Vol 108,issue 7,pp 815-822.
- Proctor R., H., Plattner R., Desjardins A., Busman M. Buchco E. 2006. Fumonisin production in the maize pathogen *Fusarium verticillioides*: Genetic basis of naturally occurring chemical variation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 2424-2430.
- Quinta,L.M. 1982 Publicações do Laboratorio Nacional de Engenharia e Tecnologia Industrial. - LNETI - DCEAI nº 92, ET - 10, pp.1 - 12.
- Reid L.M., Nicol R.W., Ouellet T., Savard M., Miller J.D., Young J.C., Stewart D.W., Schahfsma A.W. 1999. Interaction of *Fusarium graminearum* and *F. moniliforme* in maize ears: disease progress, fungal biomass, and mycotoxin accumulation. *Phytopathology* .89: 1028-1038.
- Rivas San Vicente M.L.. 2001. Análisis por cromatografía líquida de alta eficiencia de los niveles de bases esfingoideas en ejes embrionarios de maíz expuestos a la fumonisina B1. Tesis licenciatura Q.A. Facultad de Química, UNAM
- Rheeder, J. P., Marasas, W., Vismar, H. 2002. Production of Fumonisin Analogs by *Fusarium* Species. *Applied and Enviromental Microbiology*. 68: 2101-2105.
- Sánchez Rangel, Diana. 2003. Aislamiento y detección de *Fusarium verticillioides* y de fumonisinas en maíz (*Zea mays*). Tesis licenciatura Q.F.B.. Facultad de Química, UNAM
- Sánchez-Rangel, D., SanJuan-Badillo, A., 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.
- Seo JA, Proctor RH, Plattner RD. 2001. Characterization of four clustered and coregulated genes associated with fumonisin biosynthesis in *Fusarium verticillioides*. *Fungal Genetics and Biology*. 34: 155-165.

- Shaojie Li, Kyung M, Guse D, Donkin B, Proctor R . 2006. FvVE1 regulates filamentous growth, the ratio of microconidia to macroconidia and cell wall formation in *Fusarium verticillioides*. *Molecular Microbiology* 62: 1418-1432.
- Shankar S, Butchko R, Won-Bo S. 2006. The putative G-protein GBP1 is negatively associated with fumonisin B1 production in *Fusarium verticillioides*". *Molecular Plant Pathology*. 7: 381-389.
- Shephard G.S, Stokenstrom S, Sydenham E.W. 1994. Worldwide survey of fumonisin contamination of cron and corn-based products. *Journal of AOAC international*, 79: 671-687.
- Shim W-B, Woloshuk C. 1999. Nitrogen repression of fumonisin B1 biosynthesis in *Gibbrella fijiikuroi*. *FEMS Microbiology Letters*. 177:109-116.
- Shim W-B, Woloshuk C. 2001. Regulation of Fumonisin B1 Biosynthesis and Conidiation in *Fusarium verticillioides* by a Cyclin-Like (C-Type) gene, FCC1. *Applied and Environmental Microbiology*. 67: 1607-1612.
- Smith, J.E., Moss, M.O. 1985. *Mycotoxins Formation, analysis and significance*. John Wiley and Sons (Eds.), chapter 3, pp.33 - 35.
- Takitani S *et al.* 1979. Spectrodensitometric determination of trichothecene mycotoxins with 4 (p- nitrobenzyl) piridine on silicagel thin layer chromatography. *Journal of Chromatography* 172: 335 -342
- Timberlake. K. C. 1997, *Química, introducción a la química general, a la orgánica y a la Bioquímica*. Editorial Oxford University Press, Harla México. pp 551-554
- Velluti A., Marin S, Brtucci L, Ramos A, J. Y Sanchis V. 2000. The effect of fungal competition on colonization of maize grain by *Fusarium moniliforme*, *F. proliferatum* and *F. graminearum* and on fumonisin B1 and Zearalenone formation. *International journal of Food Microbiology*. 59: 59-66.
- Wang E., Norred W.P, Bacon C.W., Riley R.T, Merrill A.H. 1991. Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins. *Journal of Biological Chemistry*. 226: 14486-14490.
- Williams, L.D. Mererdith, F.I., Riley, R.T. 2004. Fumonisin-ortho-phthalaldehyde derivative is stabilized at low temperature. *Journal of chromatography B*. 311-314.
- Yescas Huerta K.R. 2001 .“Fumonisin, toxinas contaminantes de maíz, producidas por *Fusarium* spp., propiedades, incidencia y análisis. Tesis licenciatura, QFB. Facultad de Química .UNAM. trabajo bibliográfico.

Zaleta Rivera K. M.,2007.Papel de *Fum14p* y *Fum8p* en las biosíntesis de las fumonisinas producidas por *Fusarium verticillioides* y clonación parcial del cluster de genes involucrados en la biosíntesis del compuesto antifúngico HSAF. Tesis doctorado.IPN.

AOAC Oficial method 2001.4 "Determination of Fumonisin B1 and B2 in Corn and Corn Flakes",Liquid Chromatography with Immunoaffinity Column Cleanup First action 2001
www.doc88.com/p-74284353625.html

X. APENDICE.

A. Soluciones.

Alcohol ácido para la solución de *p*-anisaldehído.

Reactivos:

90%Metanol

5% Acido sulfúrico

5% Acido acético

1.-Se vierte el metanol en un vaso de precipitados con un agitador magnético.

2.-Se agrega el ácido acético y se mezcla por un minuto.

3.-Se agrega el ácido sulfúrico y se mezcla por un minuto.

Medio de cultivo Jackson & Benett.

REACTIVO	CANTIDAD (g/L)
Glucosa	90
Sulfato de amonio	3.5
Fosfato monobásico de potasio.	2
Sulfato de magnesio heptahidratado	0.3
Cloruro de calcio dihidratado	0.4
Sulfato de magnesio monohidratado	16
Tiamina	500
Riboflavina	500
Pantotenato	500
Niacina	500
Piridioxiamina	500
Ácido tiotico	50
Ácido fólico	50
Biotina	50
Vitamina B ₁₂	50

Preparación de la fase móvil para el análisis por HPLC.

Buffer de fosfatos:

Se disolvieron 6.9 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-H}_2\text{O}$ en 1 litro de agua y se ajustó el pH a 3 (con 1 mL de ácido fosfórico)

Para preparar 500 mL de fase móvil

Metanol (grado HPLC) 350 mL

Buffer de fosfatos (50 mM, pH 3.0) 150 mL

Una vez mezclado, ajustar el pH a 3, añadiendo aprox. 2 mL de ácido fosfórico. Verificar usando papel pH.

Buffer de boratos, 50 mM, pH 9.7

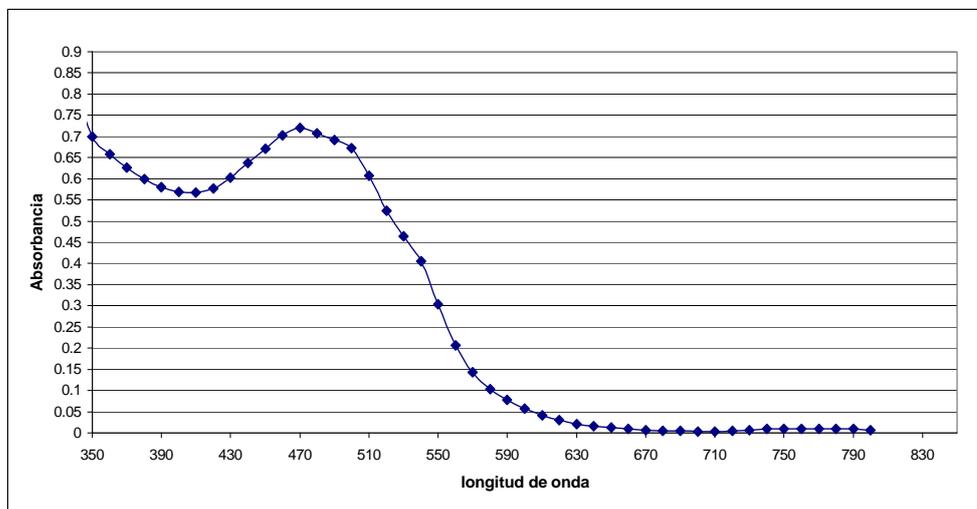
Pesar 1.9 g de tetraborato de sodio ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$; P.M. 381.4 g/mol) y disolver en 80 mL de agua. Ajustar el pH a 9.7 con NaOH, 1M y aforar a 100 mL

SOLUCIÓN STOCK DE OPA 7.45 mM (*o*-phthaldialdehyde; SIGMA P-0657): P.M. = 134.1 g/mol

Solución de OPA (esta se debe preparar el día del análisis)

- Pesar 2 mg de OPA
- Disolver en 400 μL de metanol grado HPLC
- Diluir con 2 mL de amortiguador de boratos 50 mM, pH 9.7.
- Añadir 3 μL de β -mercaptoetanol
- Mezclar bien y almacenar en el refrigerador (4°C) o en hielo. Solamente utilizar fresca el día de la preparación.

Determinación de la longitud de onda para la la cuantificación espectrofotométrica del pigmento de *Fusarium verticillioides*.

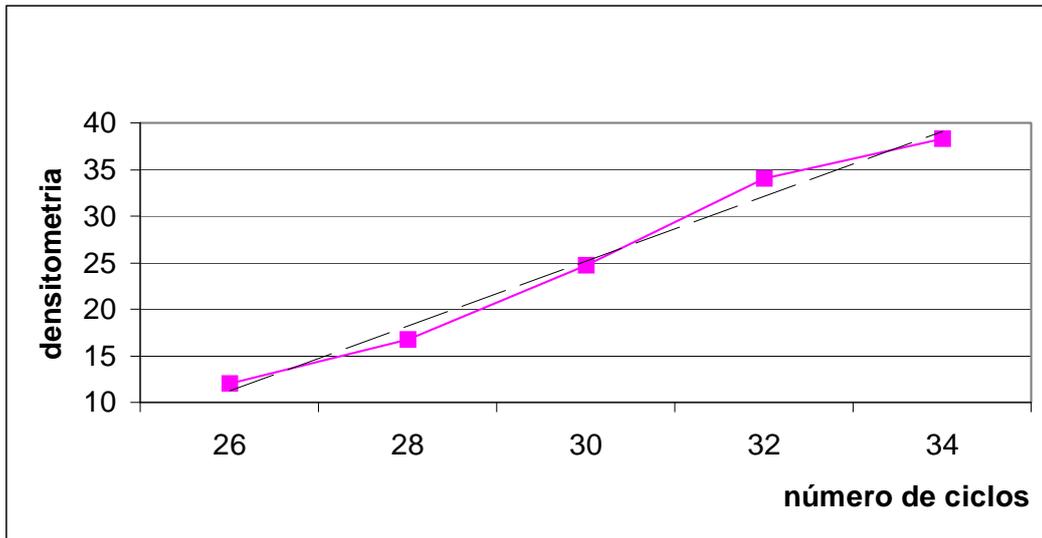


Elaboración de curvas de calibración para el análisis de FB1 por HPLC.

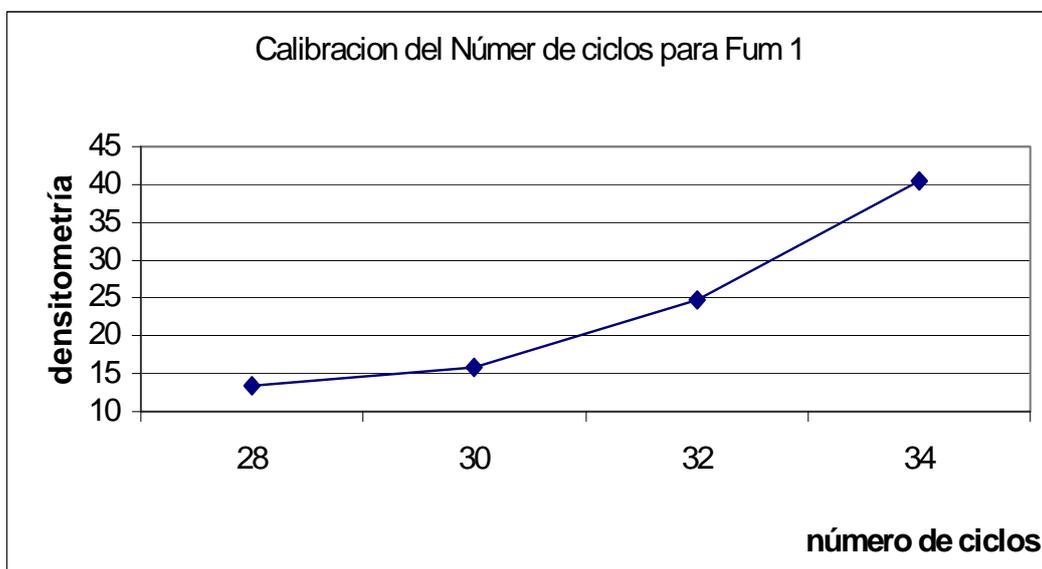
Tabla 14. Cantidades y concentraciones utilizadas en la preparación de la curva patrón de FB1

Muestra	OPA	ACN:H ₂ O	fmol en 20µl
Blanco	50µl	400µl	0
2.5 µl FB ₁ 50µM	50µl	397µl	62.5
5.0 µl FB ₁ 50µM	50µl	395µl	125
7.5 µl FB ₁ 50µM	50µl	393µl	187.5
10 µl FB ₁ 50µM	50µl	390µl	250

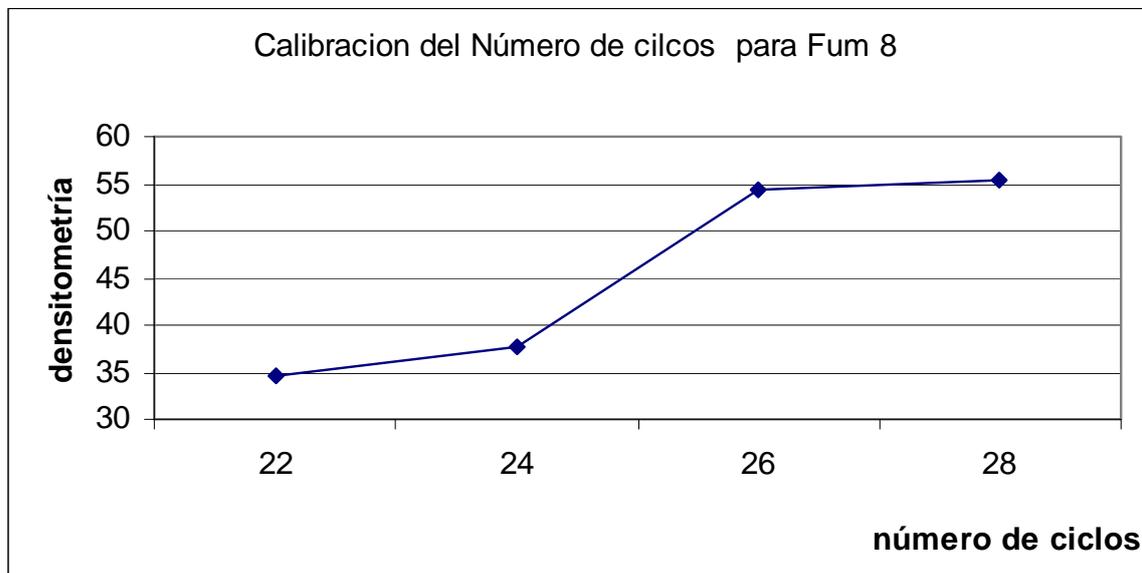
Gráficas de Calibración del número de ciclos para los transcritos de Tubulina, Fum1 y Fum 8.



Calibración del numero de ciclos para *Tub*. Se observa que la parte lineal se encuentra en el rango de 28-30 ciclos.



Calibración del numero de ciclos para *Fum1*. Se observa que la parte lineal se encuentra en el rango de 32-34 ciclos.



Calibración del número de ciclos para *Fum8*. Se observa que la parte lineal se encuentra en el rango de 24-26 ciclos