



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Estudios *in planta* del efecto del ácido ferúlico sobre la expresión de los genes reguladores y estructurales de la biosíntesis de fumonisina B1 en *Fusarium verticillioides*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
QFB Francisco Javier Martínez Fraca

Tutor principal:
Dr. Francisco Javier Plasencia de la Parra
Facultad de Química, UNAM

Comité tutor:
Dra. Maricarmen Quirasco Baruch
Facultad de Química, UNAM

Dr. José Adelfo Escalante Lozada
Instituto de Biotecnología, UNAM

Ciudad Universitaria, Ciudad de México. agosto, 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: Dra. Bertha María Josefina González Pedrajo

VOCAL: Dra. Sobeida Sánchez Nieto

VOCAL: Dr. José Guillermo de Jesús Aguilar Osorio

VOCAL: Dr. Manuel Gutiérrez Aguilar

SECRETARIO: Dr. Mauricio Trujillo Roldán

Sitio donde se desarrolló el tema:
Laboratorio 101, Departamento de Bioquímica
Facultad de Química, UNAM

Dr. F. Javier Plasencia de la Parra
Asesor

Q.F.B. Francisco Javier Martínez Fraca
Sustentante

Comité tutorial

Dra. Maricarmen Quirasco Baruch

Dr. José Adelfo Escalante Lozada

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis se realizó con el apoyo del proyecto DGAPA-PAPIIT IN213517 “Comunicación molecular en la interacción *Fusarium verticillioides* – maíz”.

Francisco Javier Martínez Fraca recibió una beca para sus estudios de Maestría de CONACYT (N° registro 817323) y una beca de obtención de grado por parte del proyecto PAPIIT IN213517.

Francisco Javier Martínez Fraca recibió apoyo del Programa de Apoyo para Estudios del Posgrado (PAEP) para asistir al XXXII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Bioquímica en el que se presentaron los avances de este trabajo.

Se agradece al Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT) por proporcionar las semillas de los genotipos de maíz empleadas en este trabajo.

ABREVIATURAS

µg. Microgramo	HPLC. Cromatografía de líquidos de alta resolución
µL. Microlitro	INEGI. Instituto Nacional de Estadística y Geografía
µM. Micromolar	Kpb. Kilopares de bases
15ADON. 15-acetildesoxinivalenol	LOOH. Lipoperóxido
ACN. Acetonitrilo	LOX. Lipooxigenasa
ACP. Proteína portadora de acilo	mg. Miligramo
AF. Ácido ferúlico	mm. Milímetro
BCL. Bases esfingoideas de cadena larga	mM. Milimolar
Ca3H. Cumarato 3 hidroxilasa	ND. No identificado
Ca4H. Ácido cinámico 4-hidroxilasa	O₂⁻. Anión superóxido
CoA. Coenzima A	OH[·]. Radical hidroxilo
COMT. Ácido cafeico metiltransferasa	PAL. Fenilalanina amonio liasa
DEPC. Dietil pirocarbonato	PDA. Agar Papa Dextrosa
DFA. Deshidrodímeros de ácido ferúlico	pg. Picogramo
DON. Desoxinivalenol	PKS= Policétido sintasa
ERG. Ergosterol	RH. Respuesta de Hipersensibilidad
EROS. Especies reactivas de oxígeno	RNA. Ácido Ribonucleico
FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación	RT-PCR. Reacción en cadena de la polimerasa acoplada a transcripción reversa.
FB1. Fumonisina B1	Rv. Oligonucleótido reverse
Fr. Oligonucleótido forward	SAGARPA. Secretaría de Agricultura, ganadería, desarrollo Rural, Pesca y Alimentación
Gln. Glutamina	Vol. Volumen
GYAM. Glucosa Extracto de levadura Asparagina Ácido málico	
H₂O₂. Peróxido de hidrógeno	
Ha. Hectáreas	

CONTENIDO

RESUMEN	1
I. INTRODUCCIÓN	2
1. Generalidades	2
2. Rutas de infección de <i>F. verticillioides</i> en maíz	3
3. Estructura y blancos moleculares de la fumonisina B1	5
4. Biosíntesis de fumonisinas	7
5. Regulación de la biosíntesis de fumonisinas	10
6. Efecto del estado redox en la producción de fumonisina	14
7. Los ácidos fenólicos como mecanismos de defensa constitutivos de la planta	15
II. ANTECEDENTES	22
III. JUSTIFICACIÓN	24
IV. HIPÓTESIS	24
V. OBJETIVOS	24
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	25
1. Material Biológico	25
2. Efecto del ácido ferúlico sobre la expresión de los genes <i>FUM</i> y reguladores de la biosíntesis de FB1 en un modelo <i>in vitro</i>.	25
2.1 Preparación del medio de cultivo PDA (Papa Dextrosa Agar)	25
2.2 Inóculo y conteo de conidias	26
2.3 Preparación de medio de cultivo GYAM	27
2.4 Inoculación de <i>F. verticillioides</i> en medio GYAM	28
2.5 Cosecha de FB1 a partir de medio GYAM	28
2.6 Cuantificación de FB1 en medio GYAM mediante HPLC	28
2.6.1 Preparación de la curva patrón y en muestras para el análisis por HPLC	28

2.6.2 Condiciones de análisis	29
2.7 Efecto del ácido ferúlico en los niveles de los transcritos de los genes <i>FUM</i> y reguladores de la biosíntesis de FB1	29
2.7.1 Preparación del micelio	29
2.7.2 Extracción de RNA total	30
2.7.3 Análisis electroforético del RNA total	31
2.7.4 Calibración por densitometría	31
2.8 Reacción RT-PCR	31
2.8.1 Síntesis de cDNA	31
2.8.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	32
2.9 Establecimiento de condiciones de amplificación para los genes reguladores <i>PAC1</i> , <i>AREA</i> , <i>ZFR1</i> y <i>FUM21</i>	35
2.10 Análisis Estadístico	36
3. Efecto del ácido ferúlico presente en pericarpio de maíz sobre la expresión de los genes <i>FUM</i> y reguladores de la biosíntesis de FB1 en un modelo <i>in vitro</i>.	36
3.1 Determinación de ácido ferúlico en el pericarpio de maíz.	36
3.1.1 Extracción de ácido ferúlico total	36
3.1.2 Extracción de ácido ferúlico libre	37
3.2 Cuantificación de ácido ferúlico total y libre mediante HPLC	37
3.2.1 Preparación de la curva patrón y en muestras para el análisis por HPLC	37
3.2.2 Condiciones de análisis	37
3.3. Inoculación de semillas de maíz y condiciones de incubación	38
3.4 Cosecha de biomasa fúngica de semillas de maíz para determinación de ergosterol	38
3.4.1 Análisis de ergosterol por HPLC	39
3.5 Determinación de FB1 a partir de semillas infectadas para su cuantificación	39

3.6 Cosecha de biomasa fúngica para extracción de RNA total	40
3.7 Extracción de RNA total y análisis de los transcritos de genes <i>FUM</i> y reguladores de la biosíntesis de FB1 mediante RT-PCR	40
VII. RESULTADOS	41
1. Efecto del ácido ferúlico sobre la producción de FB1 y sobre la expresión de los genes <i>FUM</i> y genes reguladores en un modelo <i>in vitro</i>.	41
1.1 Establecimiento de condiciones de amplificación para los genes reguladores <i>PAC1</i> , <i>AREA</i> , <i>FUM21</i> y <i>ZFR1</i>	41
1.2 Evaluación <i>in vitro</i> del efecto del ácido ferúlico sobre la expresión de los genes <i>FUM</i> y genes reguladores.	41
1.3 Efecto del ácido ferúlico sobre la producción de fumonisina B1 por <i>F. verticillioides</i> en un modelo <i>in vitro</i> .	42
2. Efecto del ácido ferúlico sobre la producción de FB1 y sobre la expresión de los genes <i>FUM</i> y genes reguladores en un modelo <i>in planta</i>.	44
2.1 Determinación del contenido de ácido ferúlico libre y conjugado en maíz Chalqueño.	44
2.2 Establecimiento del modelo de infección <i>in planta</i>	44
2.3 Expresión <i>in planta</i> de los genes <i>FUM</i> y genes reguladores	46
3. Efecto del contenido de ácido ferúlico en el pericarpio de la semilla de maíz sobre la producción de FB1 y la expresión de los genes <i>FUM</i> y genes reguladores	48
3.1 Evaluación del desarrollo de <i>F. verticillioides</i> en semillas de maíz con distinto genotipo de contenido de ácido ferúlico en pericarpio	48
3.2 Expresión de los genes <i>FUM</i> y el regulador <i>ZFR1</i> en los genotipos de maíz contrastantes en niveles de AF	50

3.3 Efecto del ácido ferúlico sobre la producción de FB1 en genotipos de maíz con alto y bajo contenido de AF	52
VIII. DISCUSIÓN	54
IX. CONCLUSIONES	60
X. PERSPECTIVAS	60
XI. BIBLIOGRAFÍA	61
XII. ANEXO DE MATERIALES Y MÉTODOS	71
XIII. ANEXO DE RESULTADOS	74

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Características microscópicas de <i>F. verticillioides</i> .	3
Figura 2. Vías de colonización de <i>Fusarium spp</i> en planta de maíz.	4
Figura 3. Estructura química de las fumonisinas del grupo B	5
Figura 4. Blancos moleculares de la FB1.	6
Figura 5. Estructura del locus <i>FUM</i>	7
Figura 6. Mecanismo de acción de la PKS para formar el policétido, base estructural de la FB1	8
Figura 7. Esquema de la ruta biosintética de FB1 en <i>Fusarium verticillioides</i>	9
Figura 8. Análisis de <i>FUM21</i> como regulador de la biosíntesis de fumonisinas.	10
Figura 9. Niveles de FB1 producidas en una cepa de <i>F. verticillioides</i> en la cepa silvestre y en la mutante del gen <i>ZFR1</i> .	13
Figura 10. Estructura de la pared celular de plantas.	16
Figura 11. Ácido ferúlico unido por enlace éster con lignina y un polisacárido	16
Figura 12. Esquema de los derivados fenólicos de la fenilalanina	17
Figura 13. Estructura del grano de maíz	18
Figura 14. Niveles de Ácido Ferúlico (AF) en pericarpios de 50 genotipos de maíz de CIMMYT	20
Figura 15. Niveles de transcritos de genes <i>FUM1</i> y <i>FUM8</i>	23
Figura 16. Cámara de Neubauer	26
Figura 17. Niveles de transcritos de genes del locus <i>FUM</i> y reguladores en <i>F. verticillioides</i>	42
Figura 18. Efecto del AF sobre la producción de FB1 en <i>F. verticillioides</i>	43
Figura 19. Infección de semillas de maíz “Chalqueño” por <i>Fusarium verticillioides</i>	45
Figura 20. Contenido de ergosterol en semillas de maíz “Chalqueño” infectadas con <i>Fusarium verticillioides</i> a distintos tiempos de incubación	46
Figura 21. Niveles de transcritos de genes del locus <i>FUM</i> y reguladores	47
Figura 22. Niveles de Fumonisina B1 producida en maíz “Chalqueño” durante el proceso de infección por <i>F. verticillioides</i> .	48

Figura 23. Infección de semillas de maíz de bajo AF y alto AF por <i>Fusarium verticillioides</i>	49
Figura 24. Contenido de ergosterol presente en las semillas de maíz con alto y bajo contenido de AF	50
Figura 25. Niveles de transcritos de genes del locus <i>FUM</i> y reguladores en semillas con alto AF	51
Figura 26. Niveles de transcritos de genes del locus <i>FUM</i> y reguladores en semillas con bajo AF	52
Figura 27. Niveles de FB1 producida por <i>F. verticillioides</i> en los genotipos de semillas de maíz con alto y bajo contenido de AF	53

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Productos de los genes contenidos en el locus <i>FUM</i>	7
Tabla 2. Producción de FB1 en cepa silvestre y mutantes PAC2Am y PAC2Am complementada (PAC2-C) de <i>F. verticillioides</i> .	12
Tabla 3. Composición química de las partes del grano de maíz	18
Tabla 4. Contenido de ácido ferúlico en la semilla de maíz de distintas variedades	19
Tabla 5. Contenido de ácido fenólico en las distintas partes de la semilla de maíz	21
Tabla 6. Capacidad antioxidante en las distintas partes de la semilla de maíz	21
Tabla 7. Efecto del ácido ferúlico sobre la biosíntesis de FB1. Niveles de FB1 excretada al medio.	22
Tabla 8. Composición final del medio GYAM	27
Tabla 9. Condiciones del detector de fluorescencia Shimadzu (RF-10AXL)	29
Tabla 10. Componentes y concentración final de la mezcla de reacción para la transcriptasa reversa (RT)	32
Tabla 11. Composición y concentración final de la mezcla de reacción para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	33
Tabla 12. Secuencia, Tm y tamaño del amplicón resultante en el estudio de los transcritos de genes <i>FUM</i> y reguladores de la biosíntesis de FB1	34
Tabla 13. Condiciones para la amplificación de los transcritos de los genes estudiados.	35
Tabla 14. Condiciones para la amplificación de los transcritos de los genes estudiados	40
Tabla 15. Condiciones de amplificación para genes reguladores	41
Tabla 16. Contenido de ácido ferúlico total, AF conjugado y AF libre en el pericarpio de semillas de tres genotipos de maíz.	44

RESUMEN

El maíz (*Zea mays L*) es uno de los granos con mayor consumo a nivel mundial su producción se ve constantemente afectada por la presencia de patógenos, lo cual ocasiona pérdidas económicas en su producción. *Fusarium verticillioides* es el principal hongo patógeno que afecta al maíz y produce micotoxinas como metabolitos. La principal micotoxina producida por este patógeno es la fumonisina B1 (FB1). Su biosíntesis depende de la presencia del locus *FUM* que contiene los genes codificantes de las enzimas que participan en su producción. La generación de fumonisinas es muy variable entre las distintas cepas de *F. verticillioides* y es afectada por distintos factores ambientales, así como componentes estructurales de la planta hospedera. *FUM21* forma parte del locus *FUM* y codifica un factor transcripcional que regula la expresión de otros genes del clúster. Además, otros genes fuera del locus *FUM* participan en la regulación de la biosíntesis de fumonisinas, algunos de estos en respuesta a factores ambientales. Sus productos pueden ser intermediarios en vías de señalización o factores de transcripción, como *PAC1*, *AREA* y *ZRF1*. Las plantas presentan distintos mecanismos de defensa frente a la infección de patógenos, como las defensas constitutivas que representan la primera barrera física que el patógeno debe penetrar. Los compuestos fenólicos constituyen una de estas defensas al formar parte de la pared celular vegetal. En el pericarpio de la semilla de maíz, el ácido ferúlico (AF) es el compuesto fenólico más abundante e, *in vitro*, este compuesto suprime el desarrollo de *F. verticillioides* y la biosíntesis de FB1. El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto del ácido ferúlico en modelos *in vitro* e *in planta* sobre la producción de FB1 y la expresión de los genes *FUM1*, *FUM8*, *PAC1*, *AREA*, *ZRF1* y *FUM21*, en *F. verticillioides*. En un modelo *in vitro*, el ácido (AF) inhibió la producción de FB1 y reprimió la expresión de *FUM1* y *FUM8* y del regulador *ZFR1*, sin afectar la expresión de *FUM21*, *AREA* y *PAC1*. En el modelo *in planta*, encontramos que en la mezcla de semillas con alto contenido de AF los niveles de FB1 producidos son menores a los de la mezcla de semillas con bajo AF. Este efecto no se asoció con los niveles de expresión de los genes *FUM*, pero sí con los niveles de expresión del regulador *ZFR1*. La expresión de los genes reguladores *AREA* y *PAC1* no se modificó durante la infección de semillas de maíz. El contenido de AF en el pericarpio de la semilla de maíz afecta la expresión de genes *FUM* y la producción de FB1.

I. INTRODUCCIÓN

1. Generalidades

El maíz (*Zea mays L*) es uno de los principales granos del grupo de los cereales de mayor consumo a nivel mundial debido a su aportación en carbohidratos y proteínas, y es componente central en la dieta diaria de la población en México. De acuerdo a datos publicados por la SAGARPA, en 2016, la producción nacional de maíz blanco fue de 22.2 millones de toneladas, que representó un aumento del 28.1% respecto a la producción en el año 2013 (17.3 millones de toneladas). México es el principal productor de maíz blanco a nivel mundial con una superficie sembrada de casi 7 millones de Ha en 2017 (SAGARPA 2017; INEGI 2019). Sin embargo, el rendimiento es muy variable según las condiciones; mientras que se obtienen rendimientos de 7.6 ton/Ha en zonas de riego, en las regiones de temporal, éstos son de apenas 2.2 ton/ha (INEGI, 2016).

Una de las limitantes en la producción y calidad del maíz es la presencia de microorganismos patógenos que causan diversas enfermedades durante distintas etapas de desarrollo de la planta ocasionando pérdidas económicas en su producción (Magan y Aldred, 2007). El principal hongo patógeno – por su ubicuidad y severidad– en maíz es *Fusarium spp.*, que puede infectar durante el desarrollo de la planta en el campo y/o durante el almacenamiento (Leslie et al., 2006). Su incidencia durante la pre-cosecha depende de varios factores como son las condiciones climáticas, la disponibilidad de agua y nutrientes, así como la presencia de insectos que puedan facilitar su dispersión y penetración del tejido (Magan y Aldred, 2007). Dos de las especies de *Fusarium* que atacan maíz son *F. graminearum* y *Fusarium verticillioides* (syn. *F. moniliforme*), cuya forma anamórfica es *Gibberella fujikuroi*. La mayoría de las especies del género *Fusarium spp.*, entre ellas *F. graminearum* y *F. verticillioides*, son necrótrofas y saprófitas (Nelson et al., 1994), cuya reproducción asexual es a través de microconidias que tienen una forma ovalada y se generan en cadenas monofiálides. También producen macroconidias, aunque en menor proporción, que son curvas y tienen entre 3 a 5 septos (Figura 1; Leslie et al., 2006).

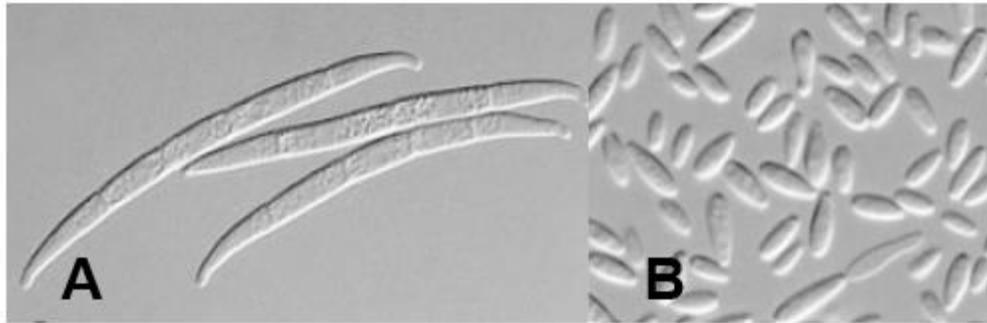


Figura 1. Características microscópicas de *F. verticillioides*. A. Morfología de macroconidias, B. Morfología de microconidias (Tomado de Leslie et al. 2006).

2. Rutas de infección de *F. verticillioides* en maíz

Las distintas enfermedades causadas por *F. verticillioides* en maíz se originan de acuerdo al tejido infectado y, por lo tanto, a la ruta de infección. La colonización del patógeno en la planta puede ser de forma local o sistémica. La colonización local ocurre cuando las conidias que sobreviven en el suelo infectan la raíz de una plántula que se desarrolla (Fig. 2A). El hongo crece a lo largo de la superficie de la raíz, y puede causar la pudrición de ésta si el inóculo es abundante y las condiciones ambientales son favorables. Los insectos juegan un papel importante para propiciar la colonización acarreando conidias hacia otros sitios de la planta como son al tallo o a la mazorca, además el daño mecánico provocado por éstos facilita la penetración y colonización (Fig. 2C y 2E).

La colonización sistémica ocurre cuando el hongo se encuentra como endófito en la semilla de maíz, generalmente sobrevive en el embrión de la semilla (Murillo et al., 1999) por lo que está presente desde su germinación, durante todo el desarrollo de la planta (Fig. 2B). Las conidias y el micelio del hongo pueden translocarse a través del tejido vascular del tallo y es capaz de diseminarse hacia las mazorcas en formación, donde puede colonizar de manera asintomática durante el ciclo de vida de la planta hasta su cosecha (Fig. 2F).

Otra ruta de infección en maíz es el canal estilar que permite el acceso a la semilla en formación (Fig. 2D) (Blacutt et al., 2018).

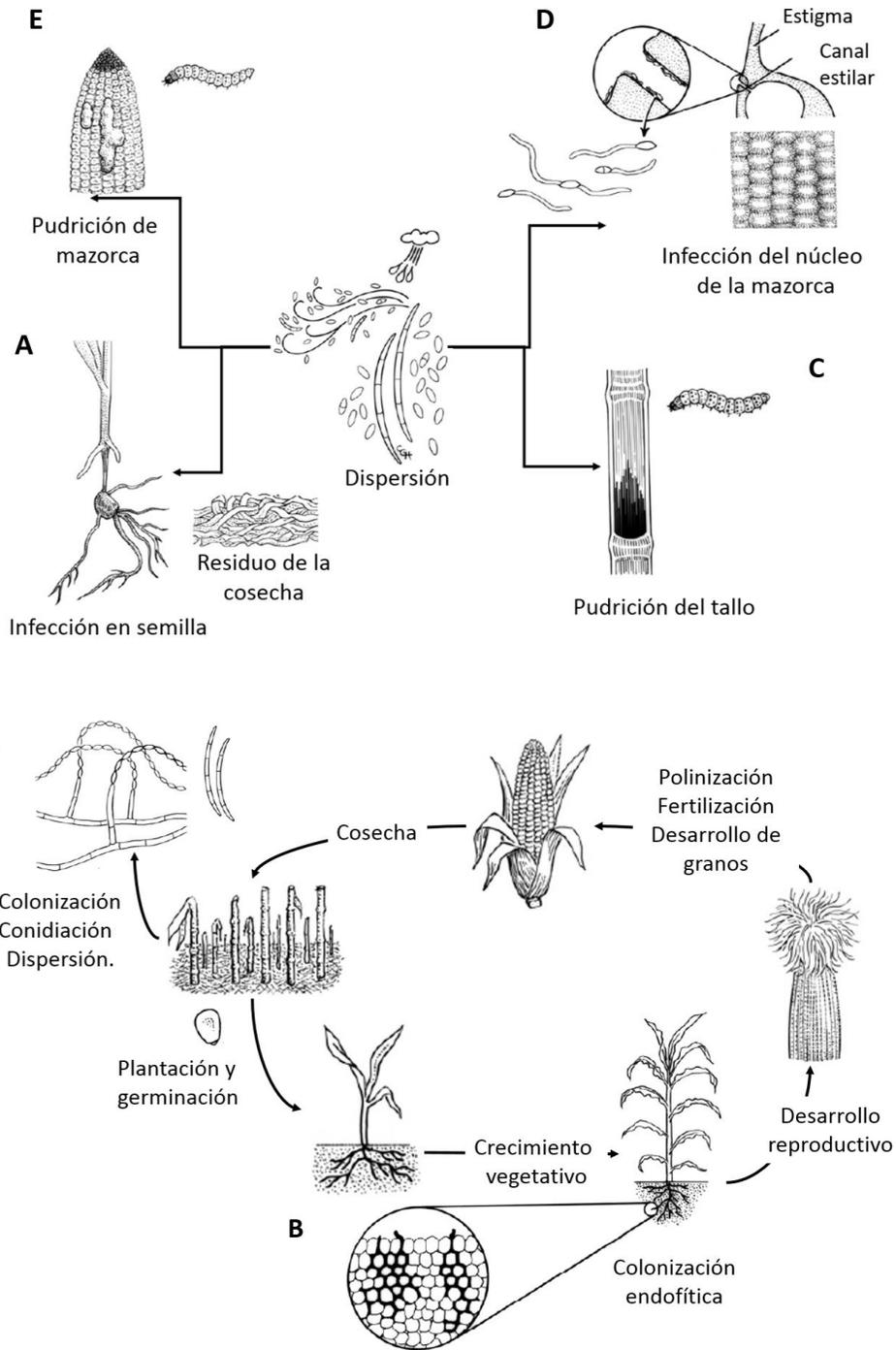


Figura 2. Vías de colonización de *Fusarium* spp en planta de maíz. A. *F. verticillioides* presente en suelo o residuos de tejido muerto infesta a las semillas o plántulas de maíz. **B.** La colonización sistémica ocurre cuando el patógeno se encuentra de forma endofítica en el maíz, puede estar presente durante todo el tiempo de desarrollo de la planta desde su germinación diseminándose en todos los tejidos. **C y E.** Las heridas en el tallo por daño mecánico, alimentación de insectos o por condiciones ambientales facilitan la entrada de *F. verticillioides* que causa pudrición del tallo. **D.** Penetración a través del canal del estilo para infectar la semilla en formación. **F.** *F. verticillioides* es capaz de sobrevivir y esporular en los rastrojos de maíz y el inóculo está presente para infecciones posteriores (Tomado y modificado de Blacutt, et al., 2018).

3. Estructura y blancos moleculares de la fumonisina B1

Una de las características que contribuye a la severidad de la infección de *F. verticillioides* en cultivos es la producción de micotoxinas. Al igual que otras especies de *Fusarium*, *F. verticillioides* produce varias micotoxinas que causan diversas enfermedades en animales y humanos, que consumen el grano contaminado. Las fumonisinas constituyen una familia de compuestos químicamente relacionados y son la principal micotoxina producida por este patógeno. Se han aislado y caracterizado más de 60 tipos de fumonisinas, y son las fumonisinas del grupo B las más abundantes (Shim et al., 2001). Dentro del grupo B se encuentran la FB1, FB2 y FB3 como las más preponderantes y en este grupo, la FB1 representa entre el 70-80% del total de fumonisinas producidas por *F. verticillioides*, FB2 (15-25% del total) y FB3 del 3 - 8% (Rheeder et al., 2002). La estructura de las fumonisinas del grupo B está formada por un esqueleto lineal de 19 o 20 carbonos con grupos hidroxilo, metilo y ácidos tricarbóxicos esterificados en diversas posiciones (Figura 3). Además de *F. verticillioides*, otras especies de *Fusarium ssp* que producen fumonisinas del grupo B son *F. oxysporum*, *F. proliferatum*, *F. anthophilum*, *F. dlamini*, *F. napiforme* y *F. nygamai* (Nelson et al., 1983; Proctor et al., 2013).

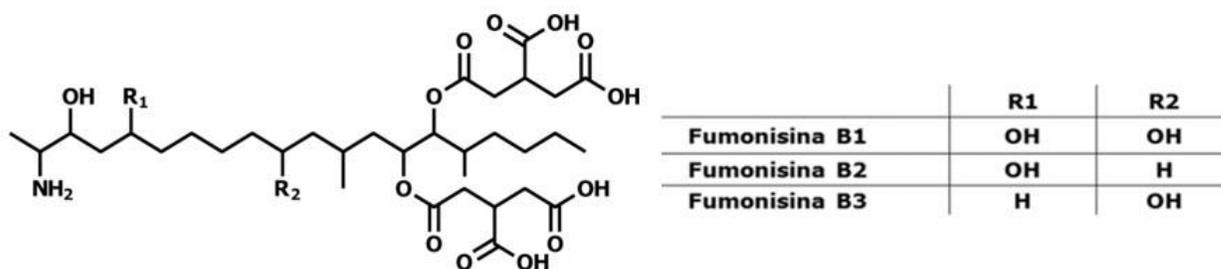


Figura 3. Estructura química de las fumonisinas del grupo B (FB1, FB2 y FB3) (de la Torre-Hernández et al., 2014).

La síntesis de FB1 no es esencial para que una cepa de *F. verticillioides* infecte maíz, pero su producción contribuye a la agresividad en distintas cepas (Galeana-Sánchez et al., 2017). Esta toxina tiene al menos tres distintos blancos moleculares en tejidos de maíz (Figura 4); inhibe a la esfinganina *N*-acil transferasa provocando acumulación de bases esfingoides (de la Torre-Hernández et al., 2010). Estas bases (esfinganina y

fitoesfingosina) funcionan como mensajeros intracelulares que conducen a la expresión de genes de defensa asociados a la vía del ácido salicílico y que inducen la muerte celular (de la Torre- Hernández et al., 2010; Sánchez-Rangel et al., 2012). También inhibe de forma acompetitiva a la ATPasa de protones de membrana plásmática (Gutiérrez-Nájera et al., 2005) y a algunas isoformas de las β -(1-3) glucanasas (Sánchez Rangel et al., 2012). La inhibición de la actividad de las isoformas básicas de β -1,3 glucanasas puede contribuir a la colonización al neutralizar la actividad de estas enzimas degradadoras de la pared celular fúngica.

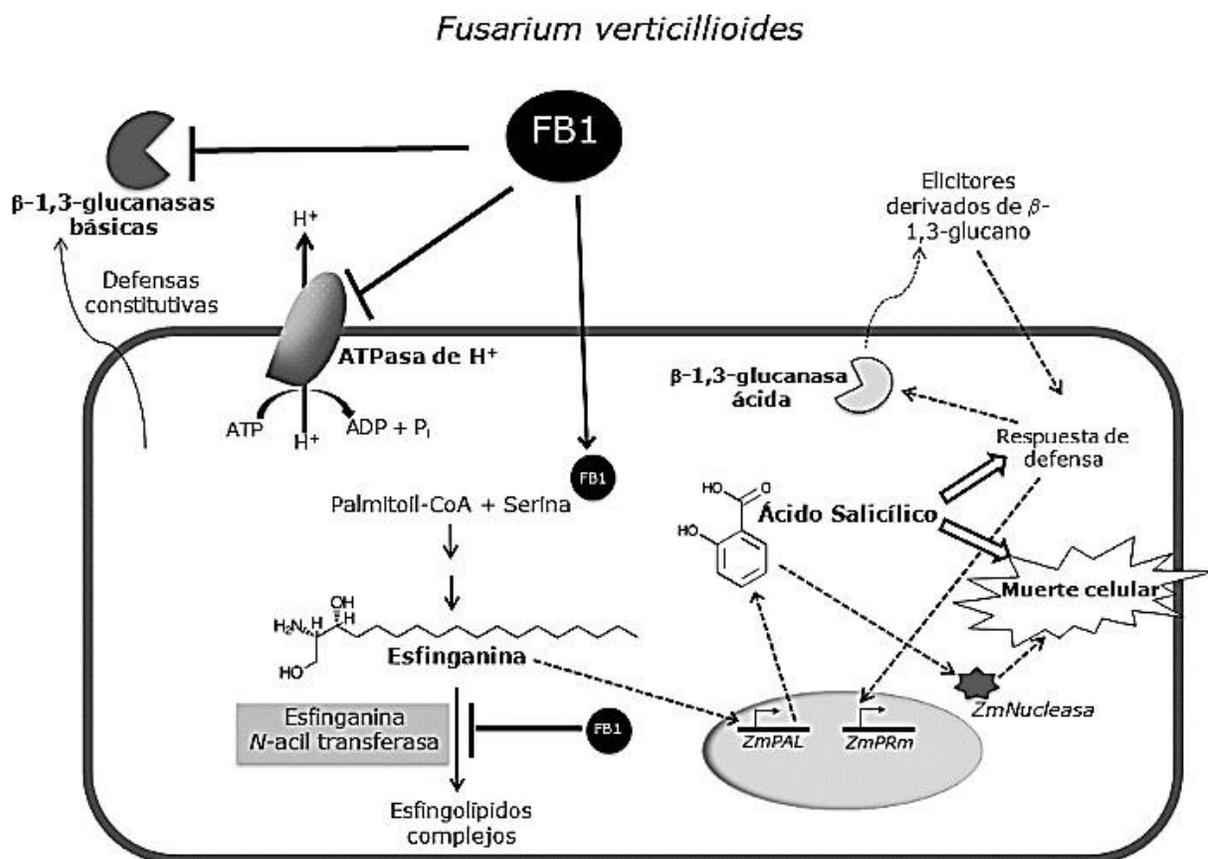


Figura 4. Blancos moleculares de la FB1. Los blancos moleculares de la FB1 durante la interacción planta-patógeno tienen un efecto inhibitorio. Los blancos moleculares son la ATPasa de H⁺, la esfinganina N-acil transferasa y las β -1,3-glucanasas básicas (de la Torre-Hernández et al., 2014).

El consumo de granos contaminados con fumonisinas de *F. verticillioides* se ha asociado con diversas enfermedades en animales y humanos. La ingesta de maíz contaminado causa leucoencefalomacia en equinos (Franeli et al.2011), edema pulmonar en cerdos

(Harrison et al. 1990) y se ha asociado con cáncer en hígado de rata (Howard et al. 2001) y cáncer en esófago de humanos (Sydenham et al. 1990).

4. Biosíntesis de fumonisinas.

La capacidad de sintetizar fumonisinas depende de la presencia del locus *FUM*, un clúster de 46 Kpb en el cromosoma 1 de *F. verticillioides*. Este locus comprende 17 genes que codifican para enzimas que participan en la biosíntesis de la toxina y su regulación, así como en la secreción de ésta (Figura 5; Tabla 1; Proctor et al., 1999 y 2003; Seo et al., 2001).

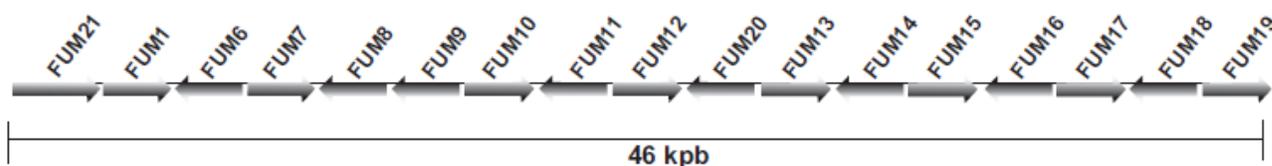


Figura 5. Estructura del locus *FUM* (de la Torre-Hernández et al., 2014).

Tabla 1. Productos de los genes contenidos en el locus *FUM* (Tomado y modificado de Montis et al., 2013).

Gen	Producto	Gen	Producto
<i>FUM21</i>	Factor transcripcional Zn ₂ Cys ₆	<i>FUM20</i>	ND
<i>FUM1</i>	Policétido sintasa	<i>FUM13</i>	Deshidrogenasa / reductasa
<i>FUM6</i>	Monooxigenasa / reductasa	<i>FUM14</i>	Péptido sintasa
<i>FUM7</i>	Alcohol deshidrogenasa	<i>FUM15</i>	P450 monooxigenasa
<i>FUM8</i>	Aminotransferasa	<i>FUM16</i>	Ácido graso sintasa
<i>FUM9</i>	Dioxigenasa	<i>FUM17</i>	Ceramida sintasa
<i>FUM10</i>	Ácido graso sintasa	<i>FUM18</i>	Ceramida sintasa
<i>FUM11</i>	Transportador de tricarboxilatos	<i>FUM19</i>	Transportador ABC
<i>FUM12</i>	P450 monooxigenasa		

*ND. No identificado.

La biosíntesis de fumonisinas inicia con la formación del esqueleto hidrocarbonado por la acción de la policétido sintasa (PKS) codificada por el gen *FUM1*. Esta enzima condensa 9 unidades de acetatos para formar la cadena de 18 carbonos (Figura 6). El producto del gen *FUM8* condensa al aminoácido *L*-alanina al esqueleto de la toxina (Huffman et al., 2010). En los pasos siguientes de esta vía ocurren hidroxilaciones catalizadas por oxigenasas codificadas por los genes *FUM6* y *FUM13* (Uhlig et al., 2012), así como esterificaciones de los ácidos tricarbónicos en las posiciones C14 y C15 por actividad de los productos de los genes *FUM7*, *FUM10*, *FUM11* y *FUM14* (Bojja et al., 2004).

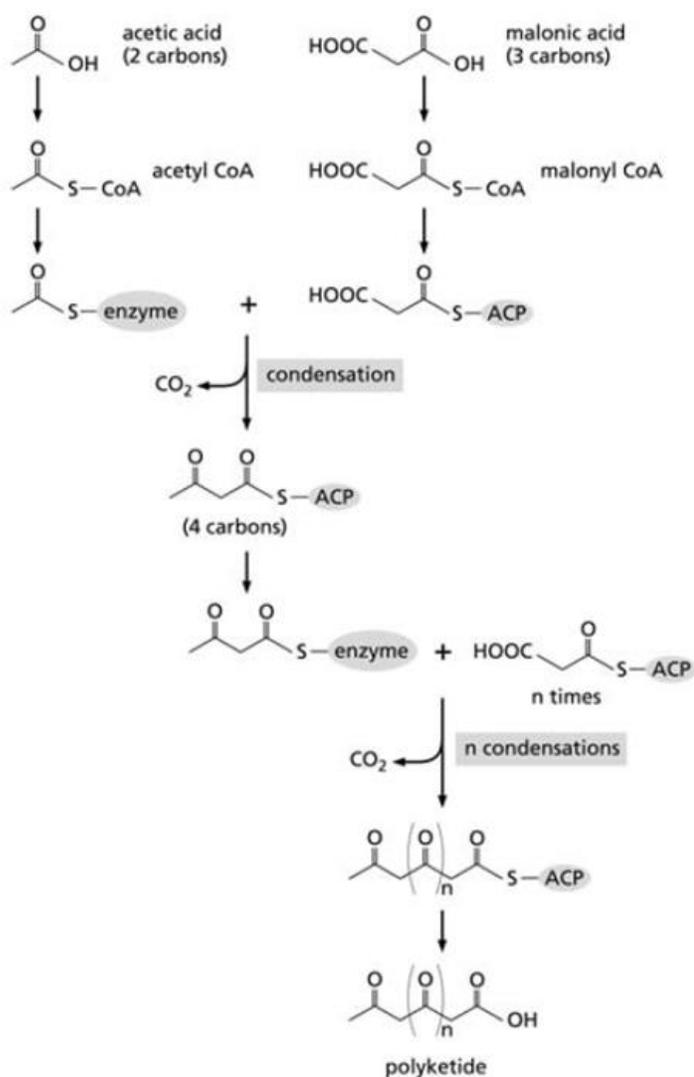


Figura 6. Mecanismo de acción de la PKS para formar el policétido, base estructural de la FB1. El ácido acético y el ácido malónico se convierten en sus ésteres de coenzima A (CoA) mediante la función de acil transferasa de la policétido síntasa (PKS) formando acetil-CoA y

malonil-CoA; la acetil-CoA se une al sitio activo de la cetosintasa de la PKS y el malonilo-CoA a un componente estructural del PKS llamado la proteína portadora de acilo (ACP). La condensación de las dos unidades por la cetosintasa, con la pérdida de un carbono del malonil-CoA como dióxido de carbono, produce una cadena de cuatro carbonos unida al ACP. Esto se transfiere de nuevo a la cetosintasa, y otras rondas de condensación con malonil-CoA (como se muestra) u otras unidades extensoras de cadena producen una cadena de policétido (Tomado de Hopwood, DA. 2004).

El carbonilo en C3 es reducido a hidroxilo por la deshidrogenasa, producto de *FUM13*. Asimismo, las hidroxilaciones en C5 y C10 son catalizadas por los productos de *FUM9* y *FUM12* las cuales son monooxigenasas dependientes de citocromo P450 (Proctor et al., 2003). Un esquema general de esta ruta biosintética de fumonisinas se presenta en la Figura 7 donde se muestran los pasos para la formación de FB1 y las enzimas responsables de cada uno de éstos.

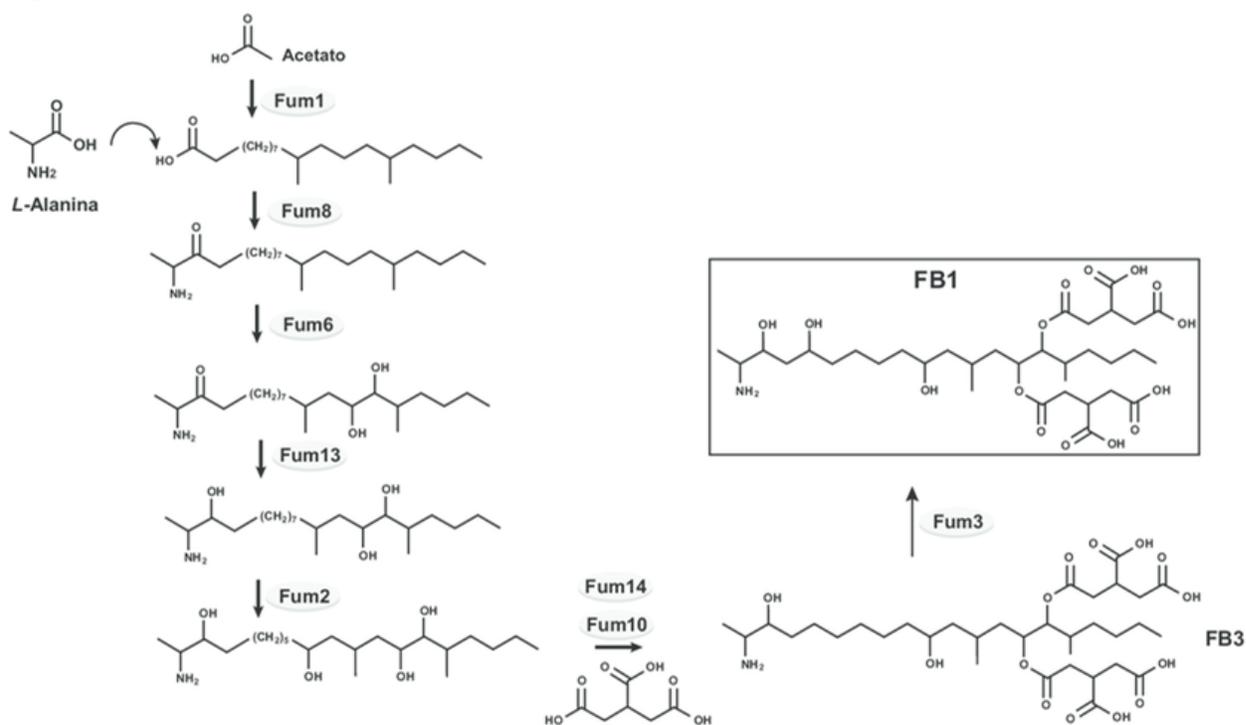


Figura 7. Esquema de la ruta biosintética de FB1 en *Fusarium verticillioides*. Se muestran los genes estructurales del locus *FUM* que participan en cada reacción.

5. Regulación de la biosíntesis de fumonisinas.

Uno de los genes del locus *FUM*, *FUM21* codifica un factor transcripcional de tipo dedo de zinc $Zn(II)_2Cys_6$ que regula positivamente la biosíntesis de FB1 y su presencia es requerida para la transcripción de los genes de este locus (Flaherty et al., 2004; Proctor et al., 1999). En mutantes en los que el gen *FUM21* es interrumpido, no se detectan, por Northern blot, los transcritos de los genes *FUM1*, *FUM6* y *FUM8*, y los niveles de FB1 se reducen. Cuando *FUM21* se sobreexpresa de forma ectópica, hay un aumento en los niveles de transcrito de los genes *FUM*, así como en la producción de fumonisina que es hasta de 1000 veces más respecto al presentado por la cepa silvestre (Figura 8; Rösler et al., 2016).

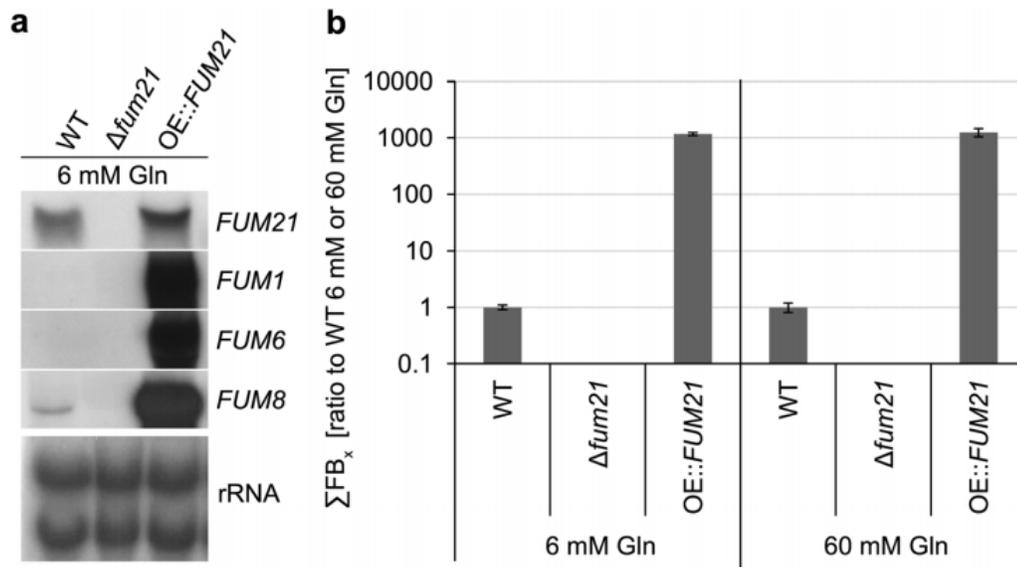


Figura 8. Análisis de *FUM21* como regulador de la biosíntesis de fumonisinas. a. Ensayo de RT-PCR, se observa que los transcritos de los genes *FUM21*, *FUM1*, *FUM6* y *FUM8* no son de fumonisina ΣFB_x (FB1 + FB2) en medio líquido, la mutante no presentó detección de fumonisinas (Rösler et al., 2016). **Gln.** Medio suplementado con glutamina como fuente de nitrógeno.

Además, la biosíntesis de fumonisinas es afectada por distintos factores ambientales, como la temperatura, la actividad del agua, el pH del medio, la disponibilidad de fuentes de carbono y nitrógeno, así como componentes estructurales de los tejidos de las plantas. Durante el almacenamiento de las semillas de maíz, el rango de temperatura óptima para la síntesis de fumonisinas es de 20 a 30°C, y una actividad del agua (a_w) de 0.93 a 0.95 (Marín et al., 1999). Las fuentes de carbono y nitrógeno afectan a la producción de

fumonisininas pues existe una relación positiva entre la cantidad de fuentes de carbono como la glucosa o fructosa y la cantidad de FB1 producida. Sin embargo, hay una relación negativa con la disponibilidad de fuentes de nitrógeno ya que a menor cantidad de aminoácidos disponibles aumenta la síntesis de fumonisininas. Estudios en maíz determinaron que los granos inmaduros que carecen de almidón no son conducentes para la producción de FB1 y que la fracción de amilopectina o dextrina induce la síntesis de la toxina en comparación con la fracción de amilosa (Bluhm & Woloshuk, 2005). En otro estudio se comparó la producción de FB1 en granos de maíz en los que se separó el embrión del endospermo y se encontró que, en este tejido, *F. verticillioides* produce casi cinco veces más FB1 que en el embrión (Shim et al., 2003). Para la síntesis *in vitro*, en un medio definido, se ha determinado que un pH ácido (3 – 3.5) favorece la producción de fumonisinina, y por ejemplo el medio GYAM que contiene glucosa, extracto de levadura, asparagina y ácido málico promueve la síntesis de la micotoxina (Picot et al., 2010; Flaherty et al., 2003).

Reguladores de la síntesis de fumonisinina.

Además de *FUM21*, se han identificado otros genes que participan en el control de la biosíntesis de fumonisininas. Éstos se localizan fuera del locus *FUM* y sus productos son intermediarios en vías de señalización o factores de transcripción que responden a condiciones ambientales. Dentro de los genes que codifican factores de transcripción se encuentran: *PAC1*, *AREA* y *ZRF1*.

FvPAC1. Es un regulador en la respuesta a cambios ambientales, como el pH del ambiente y a la disponibilidad de fuentes de nitrógeno. En *Aspergillus nidulans* *PacC* codifica un factor de transcripción cuyos niveles de expresión dependen del pH del medio donde se desarrolla (Calcagno-Pizarelli et al., 2007; Peñalva et al., 2002). Mutantes de *Aspergillus* en el gen *PacC* no crecen a un pH alcalino (Peñalva et al., 2002).

El gen ortólogo de *PacC* en *F. verticillioides*, *FvPAC1* codifica un factor transcripcional que responde a los cambios de pH; su expresión constitutiva se ha asociado a la represión de la síntesis de FB1 y a la represión de la expresión de genes estructurales del locus *FUM* (Flaherty et al., 2003). La expresión de este gen en cepas silvestres favorece el desarrollo del hongo a pH ácido tanto para el crecimiento radial como en la

conidiación y disminuye al incrementarse el pH del medio. La mutante del gen *FvPAC1* (*PAC2Am*) produce niveles mayores de FB1 que la cepa silvestre (Tabla 2; Flaherty et al., 2003), tanto en medio líquido como en granos de maíz, por lo que se considera este gen como un represor de la producción de fumonisina.

Tabla 2. Producción de FB1 en cepa silvestre y mutantes *PAC2Am* y *PAC2Am* complementada (*PAC2Am-C*) de *F. verticillioides*. (Tomado y modificado de Flaherty et al., 2003).

Cepa	Producción de FB1	
	Semillas de maíz (μg FB1 / g maíz)	Medio líquido definido (μg FB1 / mL)
Silvestre	480 \pm 20	120 \pm 17
<i>PAC2Am</i>	650 \pm 50	160 \pm 20
<i>PAC2Am-C</i>	475 \pm 29	120 \pm 20

FvAREA

Los hongos filamentosos, como *F. verticillioides*, tienen la capacidad de utilizar distintas fuentes de nitrógeno para su metabolismo. Estas pueden ser sales de amonio, nitratos o aminoácidos. El gen *FvAREA*, codifica un factor de transcripción que participa en la regulación del metabolismo del nitrógeno, se une a las secuencias GATA en los promotores. Este gen es necesario para el crecimiento de *F. verticillioides* en los granos de maíz maduro y también se requiere para producción de metabolitos secundarios. En *G. fujikuroi*, el gen *GfAREA* regula la expresión de genes estructurales involucrados en la biosíntesis de giberelina (Mihlan et al., 2003). En *F. verticillioides*, el gen *FvAREA* se requiere para la biosíntesis de fumonisina pues mutantes de este gen tienen menor tasa de crecimiento que las cepas silvestres y reducidos niveles de expresión de genes los genes *FUM1* y *FUM8*, lo que repercute en la biosíntesis de FB1 en semillas de maíz. Cuando estas mutantes son complementadas con el ortólogo de *A. nidulans*, los niveles de FB1 se recuperan hasta en un 50% y en su crecimiento hasta en un 90% (Kim et al., 2008; Tudzynski et al., 1999).

FvFST1* y *FvZFR1

En *F. verticillioides*, se han estudiado mecanismos reguladores que relacionen la utilización de fuentes de carbono por el patógeno con su capacidad de sintetizar FB1. De acuerdo a Niu et al., 2017, ha reportado que el gen *FST1* codifica para un transportador de inositol y posiblemente de FB1 sin embargo aún no se tiene claro el papel que juega en *F. verticillioides*. Se ha estudiado que el gen *FvFST1* codifica un transportador putativo de carbohidratos que participa en la percepción de la disponibilidad de fuentes de carbono y cuya expresión está regulada por el factor transcripcional *FvZFR1*. En mutantes de delección de *ZFR1* ocurre una disminución en la expresión de *FST1* repercutiendo en niveles menores de FB1, hasta en un 80% (Fig. 8). Es posible que la capacidad de percibir azúcares sea un factor importante durante la síntesis de la toxina, sin embargo, su represión no afecta el desarrollo micelial (Bluhum et al., 2008). Éste, al igual que *FUM21*, codifica un factor transcripcional con estructura de dedos de zinc y funciona como un regulador positivo de la producción de FB1 ya que en mutantes *ZFR1*, se reprime la expresión de los genes del locus *FUM* y hay una reducción de hasta 12 veces en los niveles de la toxina con respecto a la cepa silvestre, además de que codifica un factor de transcripción han sugerido que entre sus blancos podrían estar algunos genes del locus *FUM* y no solo *FST1* (Figura 9; Flaherty et al., 2004).

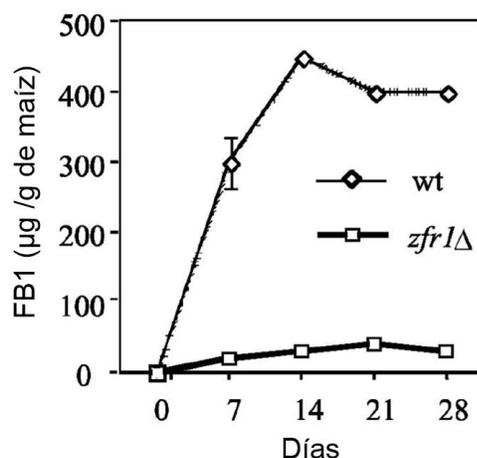


Figura 9. Niveles de FB1 producidas en una cepa de *F. verticillioides* en la cepa silvestre y en la mutante del gen *ZFR1*. Se observa una disminución considerable en los niveles de FB1 producidos por la cepa con la mutante (Tomado y editado de Flaherty et al., 2004).

6. Efecto del estado redox en la producción de fumonisina

La mayoría de los estudios sobre regulación de la síntesis de fumonisina se han realizado *in vitro*, pero en el proceso de la infección del grano, de la mazorca o del tallo de maíz, influyen muchos factores ambientales que incluyen la superficie de la planta hospedera (Keller et al., 1997; Shim y Woloshuk, 1999; Jiménez et al., 2003; Jurado et al., 2008).

En respuesta al estrés biótico, las plantas han desarrollado múltiples mecanismos de defensa frente a patógenos que pueden influir en el resultado de la interacción. Una de estas respuestas es la producción de especies reactivas de oxígeno (EROS), como el anión superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el radical hidroxilo (HO^\cdot) y los lipoperóxidos (LOOH). Estas moléculas tienen distintos grados de capacidad oxidante y actúan sobre proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. Además, participan en varias vías de transducción de señales y se ha demostrado que en *F. graminearum* el estado redox influye en la producción de la micotoxina deoxinivalenol (Ponts et al., 2007).

Los tricotecenos son las principales micotoxinas producidas por *F. graminearum* entre las que se incluye al desoxinivalenol (DON) y sus derivados acetilados como el 3-acetildeoxinivalenol (3ADON) o 15-acetildeoxinivalenol (13ADON) (Ponts et al., 2006). Bajo estrés oxidativo, por adición de H_2O_2 , se incrementan la producción de DON y 15ADON, lo que coincide con un aumento en la expresión de los genes *Tri4*, *Tri5* y *Tri12*, cuyos productos participan en la biosíntesis de los tricotecenos. El efecto del estado redox se comprobó con la adición de catalasa que causó una reducción en la producción de desoxinivalenol (Ponts et al., 2007).

En *F. verticillioides* se han realizado también experimentos *in vitro* (Ferrigo et al., 2015) para evaluar el efecto del estrés oxidativo inducido por H_2O_2 sobre la producción de fumonisina B1 y sobre la expresión de genes del locus *FUM*. Se observó que la adición de H_2O_2 modula la producción de FB1. Sin embargo, los resultados no son concluyentes pues, mientras que en dos cepas de *F. verticillioides* (*Fv3* y *Fv8*), la producción de FB1 se incrementó en presencia de H_2O_2 , en otras tres cepas (*Fv1*, *Fv4*

y *Fv7*) la producción es inhibida. Consistente con esto, se ha observado que compuestos fenólicos con actividad antioxidante inhiben la biosíntesis de fumonisinas. El ácido ferúlico, el ácido cafeíco y el ácido vainílico son antioxidantes de origen vegetal e inhiben *in vitro* hasta un 90% la producción de FB1 a una concentración de 0.005 mM (Beekrum et al., 2003).

7. Los ácidos fenólicos como mecanismos de defensa constitutivos de la planta

Las plantas presentan distintos mecanismos de defensa frente a la infección de patógenos, que se clasifican como constitutivos e inducibles. Las defensas constitutivas representan la primera barrera física que el patógeno tiene que atravesar para producir la infección, los componentes estructurales varían dependiendo del tejido y lo constituyen las ceras y cutinas en la superficie, así como polisacáridos que son componentes de la lamela (pectina) y la pared celular (celulosa) (Ferreira et al., 2007). Otros de los compuestos estructurales son los ácidos fenólicos, que se pueden encontrar en forma libre o conjugada, entrecruzando polímeros de la pared celular. Asimismo, otros compuestos fenólicos se polimerizan para formar la lignina que también contribuye al reforzamiento de la pared celular (Figura 10 y 11) (Robbins,2003).

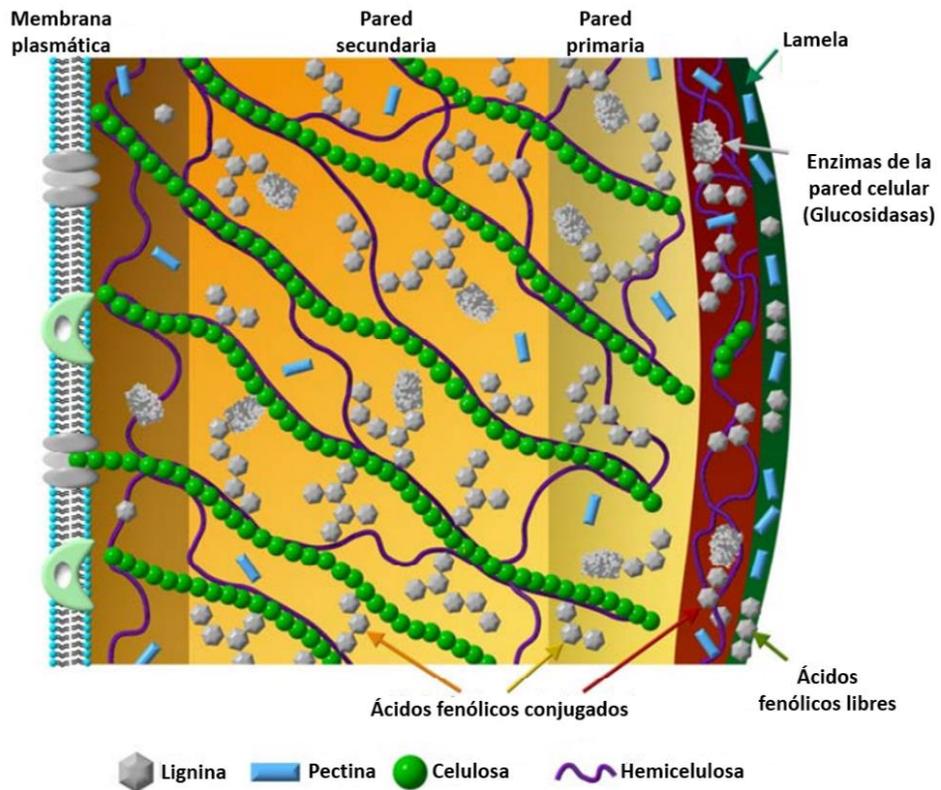


Figura 10. Estructura de la pared celular de plantas. Se muestran los componentes de la pared celular como son la pectina, celulosa, hemicelulosa y la lignina. La mayor parte de los ácidos fenólicos se encuentran conjugados dentro de la lignina la cual se encuentra entrecruzada entre los distintos polisacáridos que conforma la pared. Los ácidos fenólicos libres se encuentran en la capa exterior de la pared unidos mediante puentes de hidrógeno (Tomado y modificado de Achyuthan et al., 2010)

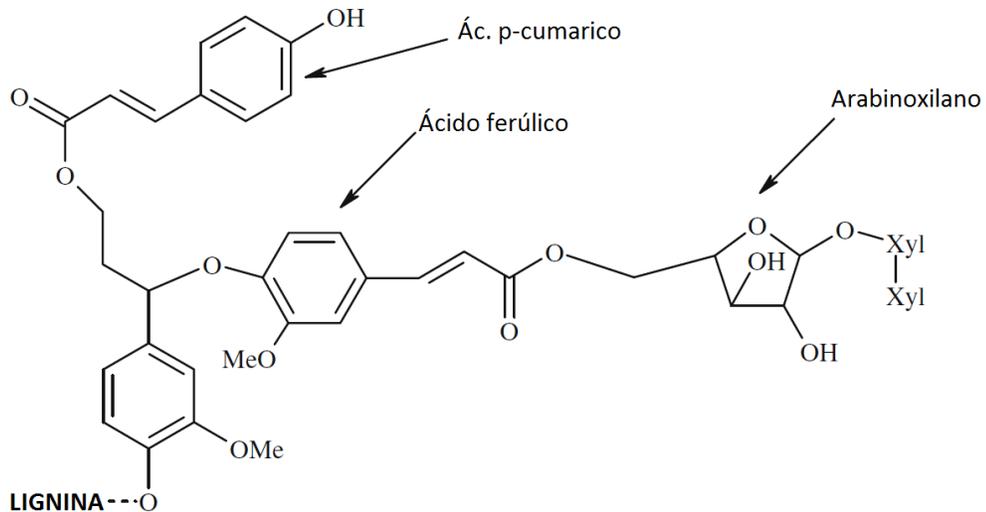


Figura 11. Ácido ferúlico unido por enlace éster con lignina y un polisacárido (Tomado y modificado de Buranov & Mazza, 2009).

Los compuestos fenólicos son un grupo amplio de compuestos de origen natural los cuales pueden presentar uno o más anillos fenólicos, en este grupo se encuentran los flavonoides, los lignanos, las cumarinas y los ácidos fenólicos (Robbins, 2003). La biosíntesis de ácidos fenólicos deriva del metabolismo del ácido shikímico iniciando con la condensación de la eritrosa 4-fosfato con fosfoenolpiruvato para dar origen al corismato (Herrmann, 1995), precursor aromático del aminoácido fenilalanina y por acción de la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL). Esta enzima inicia el metabolismo de los fenilpropanoides, originando al ácido cinámico el cual es hidroxilado en dos posiciones para formar ácido cafeico. La metilación de éste por la enzima COMT (ácido cafeico metiltransferasa) genera al ácido ferúlico (Figura 12; Seigler 1997).

Uno de los órganos que contiene niveles elevados de ácidos fenólicos y en el que ocurre la interacción *Fusarium* – maíz, es la semilla, que está compuesta por tres capas de tejido: el embrión, el endospermo y el pericarpio (Figura 13).

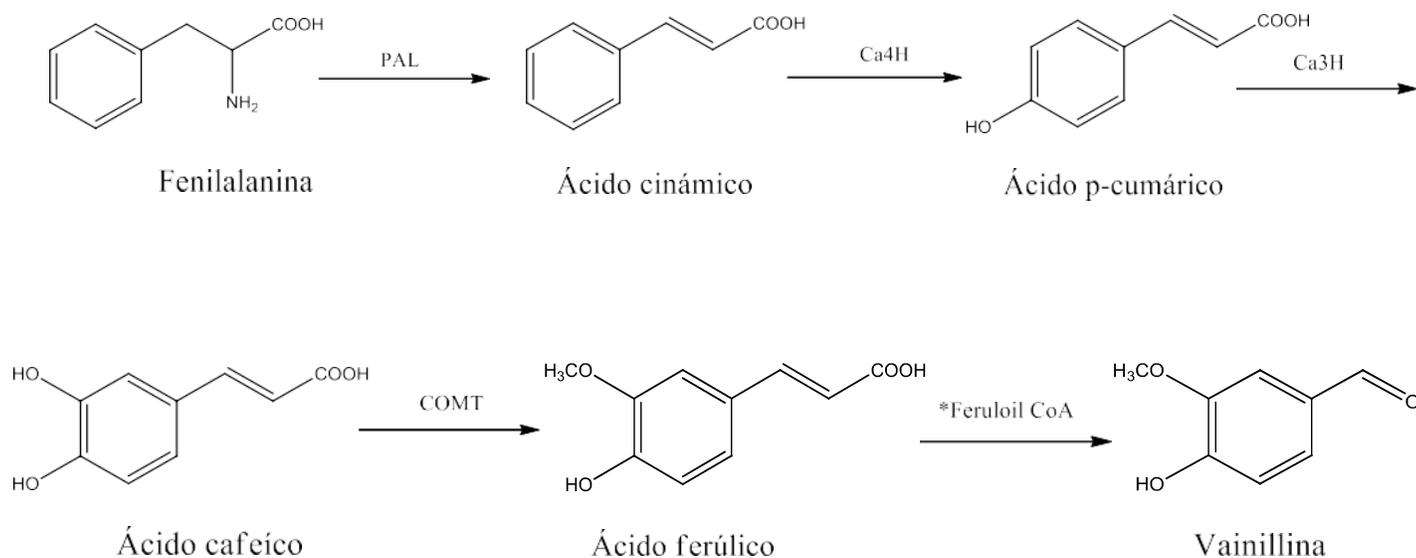


Figura 12. Esquema de los derivados fenólicos de la fenilalanina. Estructura de los productos obtenidos a partir de la fenilalanina producto de la ruta del Shikimato para dar lugar a los ácidos fenólicos más comunes encontrados en plantas. **PAL:** Fenilalanina amonio liasa; **Ca4H:** ácido cinámico 4-hidroxilasa; **Ca3H:** cumarato 3 hidroxilasa; **COMT:** ácido cafeico O- metiltransferasa. ***Feruloil CoA:** Posible enzima que participa en la transformación de ácido ferúlico a vainillina (Ochoa-Alejo et al., 1993).

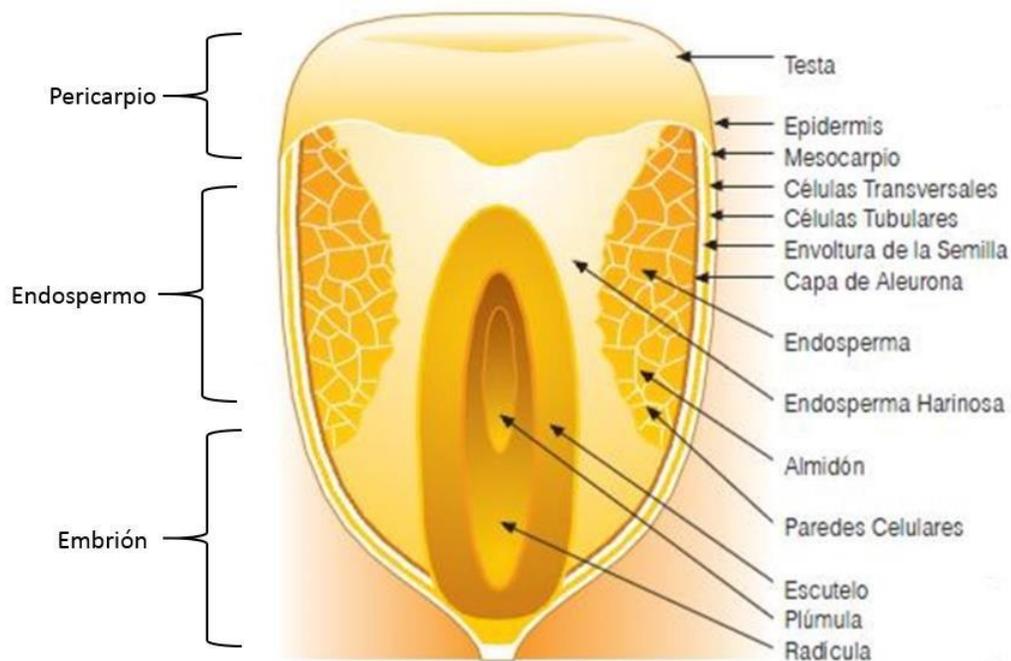


Figura 13. Estructura del grano de maíz. Corte transversal de un grano de maíz donde se muestran cada una de sus partes que lo conforman. Tomado y editado de <http://www.fao.org/docrep/t0395s/t0395s00.htm>

La composición química de cada una de estas partes es distinta, y es el pericarpio la primera barrera de defensa frente a patógenos (Kâhkônén et al., 1999). La composición química difiere entre las distintas partes de la semilla. Por ejemplo, el pericarpio presenta mayor contenido de fibra cruda compuesta por hemicelulosa, celulosa y lignina. El endospermo contiene un alto contenido de almidón y en el embrión se encuentran la mayor parte de las proteínas y lípidos que contiene la semilla (Tabla 3).

Tabla 3. Composición química de las partes del grano de maíz (Tomado de FAO 1993)

Componente	Pericarpio (%)	Endospermo (%)	Embrión (%)
Proteínas	3.7	8.0	18.4
Extracto etéreo	1.0	0.8	33.2
Fibra cruda	86.7	2.7	8.8
Cenizas	0.8	0.3	10.5
Almidón	7.3	87.6	8.3
Azúcares	0.34	0.62	10.8

El contenido de ácido ferúlico en la semilla de maíz varía en los distintos tejidos. Por ejemplo, los niveles de AF presentes en el endospermo promedian 150 mg de AF conjugado/100 g y aproximadamente 2 mg de AF libre/100 g. El AF libre constituye 1.3% del AF total (López Martínez et al., 2009) y no hay diferencias significativas entre los genotipos de maíz (Tabla 4).

Tabla 4. Contenido de ácido ferúlico en endospermo de la semilla de maíz de distintas variedades (López-Martínez et al., 2009).

Variedad	Total	Libre	Conjugado
Negro	151 ± 1.3 ^b	1.87 ± 0.3 ^b	150 ± 1.4 ^c
Mm04c1	151 ± 2.4 ^b	1.89 ± 0.1 ^b	149 ± 1.3 ^c
No04C2	151 ± 1.9 ^b	1.91 ± 0.2 ^b	149 ± 3.3 ^c
M3M2c2	151 ± 1.9 ^b	1.91 ± 0.2 ^b	149 ± 3.3 ^c
Morado	154 ± 1.3 ^b	1.97 ± 0.09 ^b	152 ± 1.5 ^b
AREQ	153 ± 2.6 ^b	1.96 ± 0.1 ^b	151 ± 2.4 ^b
Ver 42	154 ± 1.3 ^b	1.89 ± 0.2 ^b	152 ± 1.9 ^b
O337	153 ± 2.1 ^b	2.10 ± 0.4 ^b	151 ± 1.4 ^b
Rojo	153 ± 2.3 ^b	2.02 ± 0.5 ^b	151 ± 2.9 ^b
Pinto	151 ± 2.5 ^b	1.98 ± 0.2 ^b	149 ± 1.6 ^d
RaO04PV	151 ± 1.7 ^b	2.02 ± 0.1 ^b	149 ± 2.1 ^c
M5IG04	153 ± 2.3 ^b	1.92 ± 0.3 ^b	151 ± 3.3 ^b
Mr-m	151 ± 1.9 ^b	1.97 ± 0.5 ^b	149 ± 2.4 ^c
RO	150 ± 2.2 ^b	1.96 ± 0.4 ^b	148 ± 2.2 ^c
Azul	152 ± 1.3 ^c	2.02 ± 0.4 ^b	149 ± 2.2 ^c
Naranja	164 ± 4.2 ^a	2.42 ± 0.2 ^{ab}	161 ± 3.3 ^a
Amarillo	140 ± 1.1 ^d	2.01 ± 0.1 ^b	138 ± 1.1 ^e
Blanco	148 ± 2.1 ^c	1.57 ± 0.6 ^b	146 ± 2.3 ^d

a-d. Misma letra en superíndice dentro en la columna indica que no hay diferencias significativas ($p > 0.05$). Concentración expresada en mg de ácido ferúlico / 100 g de tejido.

Sin embargo, cuando se analiza el contenido de AF en el pericarpio de las semillas de maíz, sí hay diferencias en los niveles de este compuesto en 50 genotipos que van de 5mg/g hasta los 25 mg/g de AF conjugado (Figura 14A). El AF es el compuesto fenólico más abundante en el pericarpio de la semilla de maíz (Figura 14B).

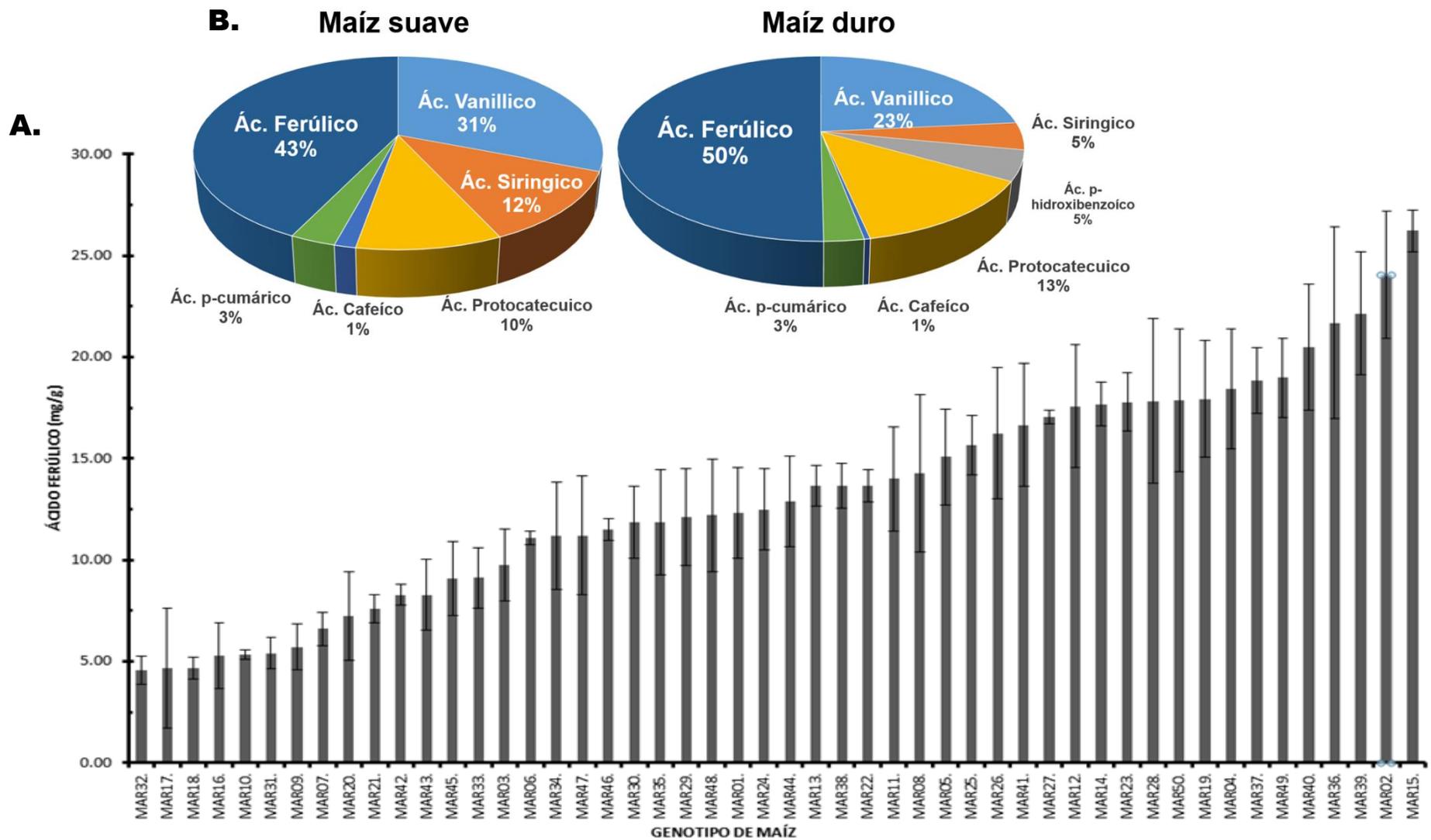


Figura 14. A. Niveles de Ácido Ferúlico total (AF total) en pericarpios de 50 genotipos de maíz. Los niveles de AF en los distintos genotipos evaluados está en el rango desde aproximadamente 5 mg/g hasta los 25 mg/g. (Informe CIMMYT, 2014). **B. Contenido de ácidos fenólicos en dos genotipos de maíz.** El pericarpio de la semilla de maíz contiene diversos ácidos fenólicos siendo el ácido ferúlico el compuesto mayoritario dentro de este grupo (tomado y modificado de Das y Singh, 2015).

Tabla 5. Contenido de ácidos fenólicos en las distintas partes de la semilla de maíz. Se determinó el contenido total de ácido fenólico presente en el tejido del maíz, los ácidos fenólicos presentes en forma conjugada se encuentran en mayor contenido respecto a los presentes de forma libre presentan (tomado y modificado de Das y Singh, 2015).

Contenido de ácido fenólico (μg / g de muestra)				
		Pericarpio	Embrión	Endospermo
Maíz suave	Libre	267.5 \pm 28.9	468.7 \pm 23.0	6.2 \pm 0.6
	Conjugado	4329.6 \pm 221.5	3428.6 \pm 101.2	172.0 \pm 11.1
	Total	4597.1 \pm 250.4	3897.3 \pm 124.3	178.2 \pm 11.7
Maíz duro	Libre	157.9 \pm 27.4	262.3 \pm 20.8	19.3 \pm 1.3
	Conjugado	5523.3 \pm 292.2	1341.9 \pm 80.6	224.0 \pm 14.6
	Total	5681.2 \pm 319.6	1604.3 \pm 101.4	243.0 \pm 16.9

Tabla 6. Capacidad antioxidante en las distintas partes de la semilla de maíz. Se determinó la capacidad antioxidante mediante la eliminación de H_2O_2 presente en el tejido del maíz, los ácidos fenólicos presentes en forma conjugada presentaron la mayor parte del total de la actividad antioxidante (tomado y modificado de Das y Singh, 2015).

Capacidad de eliminación de H_2O_2 (g de muestra)				
		Pericarpio	Embrión	Endospermo
Maíz suave	Libre	4.4 \pm 0.9	29.1 \pm 0.3	2.9 \pm 0.02
	Conjugado	367.6 \pm 2.9	217.5 \pm 3.1	39.5 \pm 0.4
	Total	371.9 \pm 3.8	246.6 \pm 3.4	42.5 \pm 0.5
Maíz duro	Libre	15.2 \pm 0.5	29.1 \pm 0.3	2.5 \pm 0.6
	Conjugado	127.0 \pm 11.7	113.2 \pm 9.1	21.6 \pm 0.4
	Total	139.2 \pm 12.2	142.3 \pm 9.4	24.2 \pm 1.0

El contenido de ácidos fenólicos y su capacidad antioxidante se evaluó en dos variedades de maíz: suave y duro; que difieren en la proporción de endospermo vitreo. El maíz suave tiene un 55% de endospermo vitreo mientras que el maíz duro un 64%. Estos genotipos también difieren ácidos fenólicos en el pericarpio, embrión y endospermo (Tabla 5). Los ácidos fenólicos, tanto en su forma libre como conjugada, tienen capacidad de eliminar al peróxido (Tabla 6), por lo que su papel estructural y antioxidante está en función de los niveles totales (Das y Singh, 2015).

II. ANTECEDENTES

In vitro, los ácidos fenólicos suprimen el desarrollo de *F. verticillioides* y la biosíntesis de FB1, y estos efectos son dependientes de la concentración del ácido (Beekrum et al. 2003). Para conocer si el mecanismo de inhibición de producción de FB1 implicaba la represión de la expresión de genes de la ruta biosintética, estudiamos el efecto del ácido ferúlico (0.05 mM y 0.1 mM) sobre la biosíntesis de FB1 y la expresión de los genes *FUM1* y *FUM8*. La tabla 7 muestra los resultados obtenidos de los niveles de FB1 en el control de disolvente (EtOH al 0.1%) de hasta un 65% respecto al medio sin disolvente (GYAM). El ácido ferúlico reprime la biosíntesis de FB1 en un 55% respecto al control con EtOH al 0.1% a una concentración de 0.05 mM, y a una concentración de ácido ferúlico a 0.1 mM los niveles fueron inferiores a 200 pg/mg que constituye el límite de cuantificación del sistema utilizado (Martínez-Fraca, 2017).

Tabla 7. Efecto del ácido ferúlico sobre la biosíntesis de FB1. Niveles de FB1 excretada al medio (Promedio de pg FB1/mg micelio \pm DS, n=6).

FB1 (pg/mg micelio)			
GYAM	EtOH (0.1%)	FA (0.05 mM)	FA (0.1 mM)
1002.5 \pm 109.8	1648.8 \pm 81.4	890.4 \pm 62.3	< 200

*GYAM. Medio Glucosa, extracto de levadura, ásparagina y ácido málico.

Se evaluaron los niveles de transcrito mediante RT-PCR punto final en presencia de ácido ferúlico (0.05 y 0.1mM), se observó que a la concentración más alta reprime la

expresión de *FUM1* y *FUM8* en un 15 y 18%, respectivamente (Figura 15) (Martínez-Fraca, 2017).

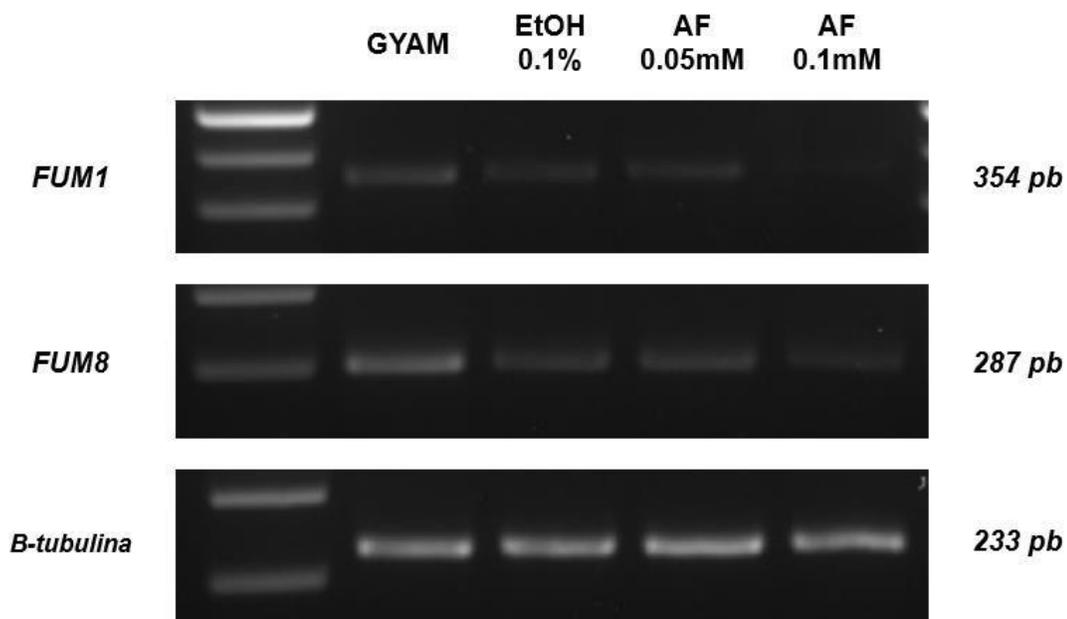


Figura 15. Niveles de transcritos de genes *FUM1* y *FUM8*. cDNAs de transcritos de genes del locus *FUM* (*FUM1* y *FUM8*) obtenidos por RT-PCR a partir de RNA total del micelio de *F. verticillioides* (Martínez-Fraca, 2017)

Estos resultados indican que el ácido ferúlico inhibe la biosíntesis de FB1 a través de la represión de la expresión de genes del locus *FUM*. Sin embargo, el mecanismo por el cual el ácido ferúlico tiene este efecto sobre la producción de FB1 es aún desconocido.

III. JUSTIFICACIÓN

El presente trabajo pretende explorar si el ácido ferúlico altera la regulación de la biosíntesis de fumonisina a través su efecto sobre los factores transcripcionales – *PAC1*, *AREA*, *ZRF1* y *FUM21*– que responden a cambios en el ambiente y que controlan la expresión de genes del locus *FUM*. Además, para trasladar estos datos *in vitro* a la interacción *F. verticillioides* – maíz, se estudiará *in planta* la infección de *Fusarium*, la producción de FB1 y expresión de los genes *FUM* en genotipos de maíz que contrastan en los niveles de ácido ferúlico en su pericarpio.

IV. HIPÓTESIS

En la interacción entre *Fusarium verticillioides* y maíz, el ácido ferúlico del pericarpio de la semilla afecta la biosíntesis de fumonisina B1 a través de alterar la expresión de factores de transcripción que controlan la expresión de los genes *FUM*.

V. OBJETIVOS

Objetivo General

Estudiar el efecto del ácido ferúlico en modelos *in vitro* e *in planta* sobre la producción de fumonisina B1 y expresión de los genes *FUM1*, *FUM8*, *PAC1*, *AREA*, *ZRF1* y *FUM21*, en *Fusarium verticillioides*.

Objetivos Particulares

- Evaluar *in vitro* el efecto del ácido ferúlico sobre la expresión de los genes *FUM* y reguladores de la biosíntesis de FB1.
- Establecer un modelo *in planta* para evaluar la colonización de *F. verticillioides*, la producción de FB1 y la expresión de genes *FUM* y genes reguladores.
- Estudiar la colonización de *F. verticillioides*, producción de FB1 y expresión de genes *FUM* y genes reguladores en genotipos de maíz contrastantes en contenido de ácido ferúlico en el pericarpio.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS.

1. Material Biológico.

Cepa de *Fusarium verticillioides*.

Se utilizó la cepa de *F. verticillioides* MY3, la cual se aisló de semillas de maíz recolectadas en el Valle del Yaquí, Sonora, México (Sánchez-Rangel et al., 2005). Esta cepa se mantiene en sustrato estéril a -20°C y se plaquea un poco del sustrato en PDA para producir el inóculo de conidias como se describe más adelante.

Genotipos de maíz.

- Semilla de maíz raza “Chalqueño”, obtenido en el mercado de Chalco, Edo. de México.
- Semillas de líneas híbridas y endogámicas de maíz proporcionadas por el Centro de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT, El Batán, Edo. de México).

2. Efecto del ácido ferúlico sobre la expresión de los genes *FUM* y reguladores de la biosíntesis de FB1 en un modelo *in vitro*.

2.1 Preparación del medio de cultivo PDA (Papa Dextrosa Agar)

Para preparar 250 mL de medio de cultivo PDA (Sigma-Aldrich) al 0.5X / agar al 1.5%, se pesó 4.9 g de PDA y 3.8 g de agar, se suspendió en 250 mL de agua desionizada y se mezcló en un frasco con tapón de rosca de 500 mL. El medio se esterilizó en autoclave por 20 min a 1.2 kg/cm² y 120°C y se dejó enfriar aproximadamente a 40-45°C. En la campana se vació 25 mL de medio PDA en cajas Petri estériles, se enfrió y se solidificó a temperatura ambiente por 24 h y se guardaron para su uso a 4°C.

2.2 Inóculo y conteo de conidias

La cepa MY3 de *F. verticillioides* contenida en el sustrato estéril se inoculó en medio PDA y se incubó de 7 a 10 días a 29°C bajo luz fluorescente. Transcurrido ese tiempo, se añadió de 5 a 10 mL de agua estéril al micelio de aproximadamente 5 cm de diámetro, se agitó la caja Petri por 90 min a 150 rpm a temperatura ambiente. La superficie del medio se raspó con una punta estéril para desprender las conidias del micelio. La suspensión de conidias se recolectó en un tubo de ensaye de 10 x 75 mm con tapón de rosca. Cuando se observó material particulado, el tubo se centrifugó a 13,400 rpm en la centrífuga Beckman (GS-6R). En tubos de microfuga se hicieron diluciones para probar la más adecuada para el conteo de conidias, se tomó una alícuota y se colocó en la cámara de Neubauer. (Fig. 16). La cámara se colocó sobre el microscopio enfocando con el objetivo de 40X. Se contaron las conidias de los cuadrantes I, II, III y IV.

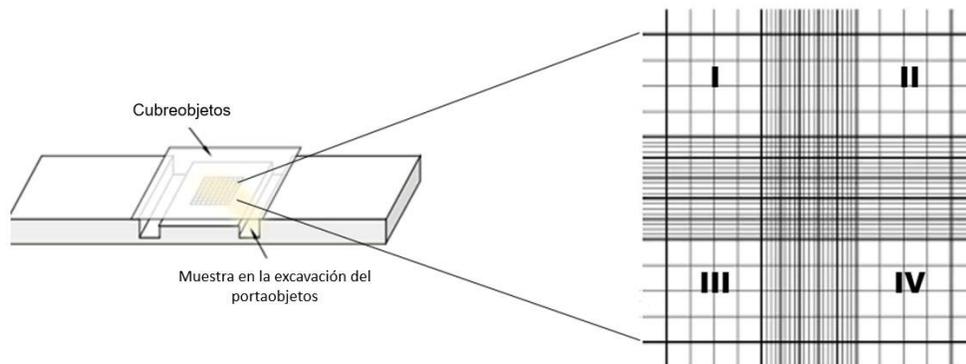


Figura 16. Cámara de Neubauer. El conteo se realizó en cada cuadrante obteniendo el promedio del conidias en el conteo.

Para obtener el número de conidias se utilizó la siguiente fórmula:

$$[\text{Conidias/mL}] = [X][FD][10000]$$

Donde:

X = Promedio del # de conidias en los cuadrantes I, II, III y IV.

FD = Factor de dilución.

10⁴ = Volumen en cada uno de los cuadrantes = 10⁻⁴ mL.

Se calculó el volumen necesario para preparar una suspensión de conidias según el experimento. Para los estudios de producción de FB1 en el modelo *in vitro* en el medio GYAM se requieren 50,000 conidias/mL.

2.3 Preparación de medio de cultivo GYAM

El medio GYAM es un medio de cultivo que estimula la producción de fumonisina (Bojja et al., 2004). Para la preparación del medio previamente se preparó un stock de sales 10X y una solución de asparagina 40 mM (ANEXO DE MATERIALES). Por cada 100 mL de medio GYAM que se preparó, se pesaron 2.16 g de glucosa, 0.05 g de extracto de levadura y 0.67 g de ácido málico, se disolvió en 20 mL de agua desionizada, se agregó 10 mL del Stock de sales 10X (ANEXO TM1) y 70 mL de agua desionizada. Se esterilizó en autoclave por 20 min a 1.2 Kg/cm² y 120°C. Una vez estéril, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se le agregó 20 mL de solución de asparagina 40 mM previamente esterilizada por filtración a través de una membrana de acetato de celulosa 0.22 µm (Merk-Millipore USA). Las concentraciones finales de cada componente del medio GYAM se muestran en la tabla 8.

Tabla 8. Composición final del medio GYAM.

Compuesto	Concentración en medio
Glucosa	0.12 M
Extracto de levadura	0.05 %
Ácido 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

*Componentes del Stock de sales 10X

2.4 Inoculación de *F. verticillioides* en medio GYAM

En matraces Erlenmeyer de 50 mL con tapón de rosca se agregaron 15 mL de medio GYAM en cada uno. A partir de la suspensión de conidias se inoculó 50,000 conidias a cada matraz de cada réplica por tratamiento. Los matraces se incubaron por 7 días estáticos a 27°C en oscuridad.

2.5 Cosecha de FB1 a partir de medio GYAM

Una vez terminado el periodo de incubación se tomó una alícuota de 2 mL del medio de cultivo de cada replica y se transfirió a tubos de microfuga de 2 mL. Estos se centrifugaron a 13,400 rpm en una centrífuga Minispin[®] Eppendorf. El sobrenadante se decantó en otro tubo de microfuga que se etiquetó y almacenó a -20°C hasta su análisis.

2.6 Cuantificación de FB1 en medio GYAM mediante HPLC

La cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) es una técnica de separación de compuestos presentes en una mezcla líquida con base en la partición que tengan entre la fase estacionaria y la fase móvil. Para la detección la FB1 se aprovecha la presencia del grupo amino, que reacciona con *o*-ftaldialdehído (OPA) en presencia de β -mercaptoetanol para formar un complejo fluorescente (Sydenham et al., 1992).

2.6.1 Preparación de la curva patrón y en muestras para el análisis por HPLC

A partir de un estándar de FB1 con una concentración 1 mM se prepararon las diluciones de cada punto de la curva utilizando concentraciones de 72, 54, 36, 18 y 9 $\mu\text{g/mL}$. Los derivados fluorescentes de los estándares y las muestras se prepararon mezclando 10 μL de estándar o de muestra con 25 μL de OPA en un tubo de microfuga de 2 mL y se incubó a temperatura ambiente por 3 min. Se agregaron 465 μL de acetonitrilo:agua (1:1 v/v) y se almacenaron en hielo. Para el análisis se inyecta en el HPLC 20 μL de una dilución 1:200 en acetonitrilo:agua (ACN:H₂O) de cada estándar y 20 μL de una dilución adecuada para el análisis de tal manera que el área bajo la curva esté en el rango de la curva estándar. La preparación de cada estándar se muestra en

el apéndice (tabla TM2).

2.6.2 Condiciones de análisis

Se utilizó como fase móvil una mezcla de metanol-amortiguador de fosfatos 50 mM (70:30) ajustada a pH=3, y como fase estacionaria una columna Pursospher® (Merk-Millipore USA) RP-18 de 15 cm por 4.6 mm, tamaño de partícula de 5 µm. Se usó una bomba LC10-AD (Shimadzu, USA) operando a un flujo de 1.2 – 1.5 mL/min. Se empleó un detector de fluorescencia RF-10AXL (Shimadzu, USA) programado a una longitud de onda de excitación de 335 nm y una longitud de onda de emisión de 440 nm. Los parámetros del detector de fluorescencia se muestran en la tabla 9.

Tabla 9. Condiciones del detector de fluorescencia Shimadzu (RF-10AXL)

Función	Valor
λ_{exc}	335
λ_{em}	440
GAIN	2
SCAN	2
RANGE	1
SENSITIVITY	1
RESPONSE	4

Las condiciones del integrador C-R5A (Shimadzu, USA) fueron las siguientes: Atenuación 3; Pendiente 35 000-40 000; Método 2021; Formato 0021.

2.7 Efecto del ácido ferúlico en los niveles de los transcritos de los genes *FUM* y reguladores de la biosíntesis de FB1

2.7.1 Preparación del micelio

A partir de las mismas unidades experimentales empleadas para el análisis de FB1, se colectó el micelio para la extracción de RNA total. El medio de cultivo se filtró a

través de un embudo Büchner en una membrana Miracloth estéril conectado a un matraz kitasato y a la línea de vacío. El micelio retenido en la membrana Miracloth se lavó con agua estéril y se retiró el exceso de agua con el filtro.

2.7.2 Extracción de RNA total

Una vez filtrado el micelio, se pesó y se colocó en un mortero estéril y se congeló con N₂ líquido. Se añadió Trizol™ (Invitrogen, USA) en proporción 4:1 con relación a la masa del tejido y se pulverizó con el pistilo hasta obtener una mezcla suficientemente homogénea y con adición constante de N₂ líquido para evitar la degradación del RNA. La suspensión se incubó a temperatura ambiente durante 5 min, se transfirió a tubos de microfuga y se centrifugó a 13,400 rpm (Minispin® Eppendorf, Germany) durante 15 min a 4°C. El sobrenadante se transfirió a un tubo de microfuga estéril y se le agregaron 200 µL de una mezcla de FCI (Fenol-Cloroformo-Isoamílico 25:24:1) y se agitó por 15 segundos y cada tubo se centrifugó a 13,400 rpm durante 10 min a 4°C.

La fase acuosa se transfirió a un tubo de microfuga estéril y se le agregaron 400 µL de cloroformo, se centrifugó a 13,400 rpm durante 5 min a 4°C. El sobrenadante se separó y se le adicionaron 400 µL de cloroformo y se centrifugó de nuevo a 13,400 rpm por 5 min a 4°C. El sobrenadante se separó en un tubo de microfuga estéril y se le agregó un volumen de isopropanol, se mezcló muy bien y se incubó a temperatura ambiente durante 10 min. Una vez incubado se centrifugó a 13,400 rpm durante 10 min a 4°C. El sobrenadante se decantó y el botón se lavó con 1 mL de EtOH al 70 %, se centrifugó otra vez por 5 min, se decantó el sobrenadante y el pellet se secó a temperatura ambiente por 5 min. El botón se disolvió en 500 µL de H₂O-DEPC, se le agregaron 167 µL de LiCl 8 M y se incubó a 4°C durante toda la noche.

La muestra se centrifugó por 15 min a 4°C. El botón se disolvió en 250 µL de H₂O-DEPC, se le agregaron 500 µL de EtOH al 95 % y 25 µL de acetato de sodio 3 M. Se incubó toda la noche a -70°C, y al día siguiente se centrifugó a 13,400 rpm por 20 min a 4°C, se lavó con 1 mL de EtOH al 70 % dos veces. Se eliminó el EtOH residual y el botón se secó a temperatura ambiente por 10 min y se resuspendió en 40 µL de H₂O-DEPC; el RNA total se cuantificó espectrofotométricamente en un equipo NanoDrop 2000

(Thermo Fisher Scientific, México) y se almacenó a -70°C hasta su uso (Chomczynski & Sacchi, 1987).

2.7.3 Análisis electroforético del RNA total

La integridad del RNA total se evaluó mediante un análisis electroforético en un gel de agarosa al 2.5 %. Para su preparación, se suspendió la agarosa en 25 mL de H_2O -DEPC, se le agregó 0.5 mL de solución TAE-DEPC 50X (ANEXO) y 10 μL de bromuro de etidio (0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), como intercalador de ácidos nucleicos el cual permite la visualización del RNA al ser expuesto a luz ultravioleta. Se utilizó como amortiguador de corrida 500 mL de solución TAE-DEPC 1X. Se prepararon las muestras adicionando 1 μg de RNA y 2 μL de amortiguador de carga. Se corrió por 45 minutos a 85 V. El gel se colocó en un transiluminador UV y fue digitalizado en un sistema ChemiDoc™ MP para su análisis por densitometría.

2.7.4 Calibración por densitometría

El ajuste o calibración por densitometría se realiza con el objetivo de partir de la misma cantidad de RNA total en una reacción de RT. Mediante el software ImageJ se realiza el análisis densitométrico de las dos bandas de RNA ribosomal (18S y 28S) resuelto en un gel de agarosa donde fue cargado 1 μg de cada muestra. Se tomó como criterio que la diferencia entre los valores de densitometría de las bandas de RNAr no fueran mayores a un 15 %. En caso de que hubiera diferencias mayores entre muestras, se ajustaba el volumen a cargar y se repetía el análisis densitométrico hasta minimizar dicha diferencia. Se añadió a cada muestra inhibidor de nucleasas (Martínez-Fraca, 2017).

2.8 Reacción RT-PCR

2.8.1 Síntesis de cDNA

A partir de 1 μg de RNA se sintetizó cDNA mediante la transcriptasa reversa (kit ImProm-II Promega). El RNA se mezcló con 1 μL de Oligo dT (500 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ oligo dT 5'-

Tabla 11. Composición y concentración final de la mezcla de reacción para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Reactivo	Volumen para 1 reacción	Concentración final
Buffer 5x Green Promega	4 μ L	1x
dNTPs 10 mM	0.4 μ L	0.2 mM
Oligonucleótido Fr	0.6 μ L	0.6 μ M
Oligonucleotido Rv	0.6 μ L	0.6 μ M
Taq Polimerasa	0.25 μ L	0.02 U
H ₂ O estéril	9.15 μ L	c.b.p. 15 μ L
	15 μ L	Volumen final

Una vez preparada la mezcla de reacción se combinaron los 15 μ L de ésta con los 5 μ L de cDNA-H₂O, se agitó en el vórtex, se centrifugó brevemente en una microfuga y se colocó en el termociclador Applied Biosystems GeneAmp System 9700. Las secuencias de los cebadores empleados, sus valores de T_m y el tamaño del amplicón se muestran en la tabla 11. Las secuencias se diseñaron con apoyo del software Primer 3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) a partir de la secuencia del cDNA reportada en la base de datos de GenBank, o bien se consultaron de reportes en la literatura como lo muestra la tabla 12.

Tabla 12. Secuencia, Tm y tamaño del amplicón resultante en el estudio de los transcritos de genes *FUM* y reguladores de la biosíntesis de FB1 de este trabajo.

Nombre del Primer	Secuencia 5' -> 3'	Tm (°C)	Gen	Tamaño del amplicón (pb)	Referencia
FVTUBF	5'-TGCTCATTCCAAGATCCGCG-3'	54.0	<i>β-TUB</i>	233	Hu et al., 2008.
FVTUBR	5'-GTAGTTGAGGTCACCGTAGGAGG-3'	59.0			Hu et al., 2008.
*ef1	5'- ATGGGTAAGGA(A/G)GACAAGAC -3'	52.0	<i>TEF</i>	450	Geiser et al., 2004.
*ef22	5'- AGGAACCCCTTACCGAGCTC -3'	53.0			Geiser et al., 2004.
FUM53F (FUM1)	5'-CTTGAACGCGGAGCTAGATTAT-3'	53.0	<i>FUM1</i>	354	Sánchez-Rangel et al., 2005.
FUM53R (FUM1)	5'-ATCCGTGTATGCATATGTCGAG-3'	53.0			Sánchez-Rangel et al., 2005.
FUM8F	5'-TGAGAAGGATGTTTCATGACGCC-3'	55.0	<i>FUM8</i>	287	Hu et al., 2008.
FUM8R	5'-TTGGACCCAGCTCTGCCA-3'	53.0			Hu et al., 2008.
FUM21Fv Fr	5'- GCCATCATTGCAACACATTC -3'	64.0	<i>FUM21</i>	143	Visentin et al., 2012
FUM21Fv Rv	5'- AAAATGTCGGTCGAGGTGAC -3'	63.9			Visentin et al., 2012
FvPac1 Fr	5'- TGGATGTTGACCCCAAGAGC -3'	67.4	<i>PAC1</i>	332	Este trabajo
FvPac1 Rv	5'- AGGTCCATTGCATCGCATCT -3'	66.8			Este trabajo
FvAREA Fr	5'- GTCCGCCAGTAGCTTCAACT -3'	63.3	<i>AREA</i>	352	Este trabajo
FvAREA Rv	5'- TACGATCCGCCGCAAGTATC -3'	67.0			Este trabajo
FVZFR1 FOR	5'- CCCAACTACCAGCAAAGAGC -3'	63.7	<i>ZFR1</i>	211	Este trabajo
FVZFR1 REV	5'- TATCAGGACGCCATGTCAAA -3'	64.1			Este trabajo

*.- Oligonucleótidos utilizados para el gen de factor de elongación 1 α (TEF) en el modelo *in planta*.

2.9 Establecimiento de condiciones de amplificación para los genes reguladores *PAC1*, *AREA*, *ZFR1* y *FUM21*

Para comprobar el correcto diseño de cada oligonucleótido obteniendo los productos esperados y la ausencia de subproductos se realizó una electroforesis horizontal de agarosa con DNA genómico de *F. verticillioides* y se estableció que en todos los casos se obtenía un solo producto del tamaño esperado. Para el establecimiento de las condiciones de amplificación del transcrito de cada gen se realizó un barrido de ciclos a distintas temperaturas de alineamiento de acuerdo a las temperaturas teóricas que proporcionó la plataforma primer3plus para cada oligonucleótido y cada producto. Se realizó el análisis densitométrico de los amplicones con el software ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>), y los resultados para los genes *PAC1*, *AREA*, *FUM21*, *ZFR1* y *TEF* se muestran en la tabla 9 (Figuras R2, R3, R4, R5 y R6 respectivamente). Toda esta información se resume en la tabla 13.

Tabla 13. Condiciones para la amplificación de los transcritos de los genes estudiados.

Gen	Temperatura de desnaturalización	Temperatura de alineamiento	Temperatura de síntesis	Conc. de Oligos	Ciclos
<i>Tubulina</i>	94°C	54°C	72°C	0.6 µM	26
* <i>TEF</i>	94°C	53°C	72°C	0.6 µM	26
<i>FUM8</i>	94°C	54°C	72°C	0.6 µM	26
<i>FUM1</i>	94°C	54°C	72°C	1.2 µM	36
<i>FUM21</i>	94°C	54°C	72°C	1.8 µM	28
<i>PAC1</i>	94°C	62°C	72°C	0.3 µM	26
<i>AREA</i>	94°C	62°C	72°C	0.3 µM	26
<i>ZFR1</i>	94°C	62°C	72°C	0.6 µM	26

2.10 Análisis Estadístico

Los resultados se analizaron usando el programa Statistix V.4.0, mediante el análisis de varianza (ANOVA) de una vía y comparación de medias por la prueba de Tukey; $p \leq 0.05$). Cada uno, para los ensayos de cuantificación de FB1 y de análisis de amplicones se utilizaron 4 réplicas por cada tratamiento.

3 Efecto del ácido ferúlico presente en pericarpio de maíz sobre la expresión de los genes *FUM* y reguladores de la biosíntesis de FB1 en un modelo *in vitro*.

3.1 Determinación de ácido ferúlico en el pericarpio de maíz.

Se pesaron aproximadamente 15 g de semillas secas de cada genotipo evaluado las cuales se colocaron en un tubo para centrífuga (Falcón™) de 50 mL, se añadió agua desionizada hasta sumergirlas, se agitaron a 200 rpm durante 2 h a temperatura ambiente. Se decantó el agua y las semillas se colocaron en papel absorbente. Se separó manualmente el pericarpio y se eliminó el pedicelo. El pericarpio se secó en papel absorbente, se pesó y se almacenó a temperatura ambiente.

3.1.1 Extracción de ácido ferúlico total

Se pesaron 100 mg de pericarpio seco y se pulverizaron con nitrógeno líquido hasta que quedó un polvo fino. El polvo se transfirió a un tubo de vidrio y se agregaron 4 mL de NaOH (2 M), se incubó en oscuridad durante 2 h a 200 rpm a temperatura ambiente (Lab-line® Orbit Environ-Shaker, USA). Se añadieron aproximadamente 700 μ L de HCl concentrado hasta llevar a un pH=2 y se centrifugó a 3000 rpm (Beckman GS-6R) durante 5 min a 4°C. Se separó el sobrenadante (2 mL aproximadamente) y se mezcló con 5 mL de acetato de etilo; se agitó en vortex y se dejó reposar durante 10 min hasta separar las fases. Se tomó la fase orgánica y se transfirió a un tubo de vidrio limpio. La extracción se repitió una vez más y se juntaron las fases orgánicas. Se evaporó el solvente a sequedad a 35°C bajo flujo de nitrógeno y se disolvió el residuo en 500 μ L de metanol:agua (1:1). Se almacenó a -20°C hasta su análisis (López-Martínez et al., 2009).

3.1.2 Extracción de ácido ferúlico libre

Se pesaron de 600 a 700 mg de pericarpio seco y se molieron con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino, se transfirió a un tubo de vidrio y se añadió 1.4 mL de EtOH 80 % frío y se agitó durante 10 min a 200 rpm a temperatura ambiente (Lab-line® Orbit Environ-Shaker, USA). Se recolectó el sobrenadante y se transfirió a un tubo de vidrio limpio. Se repitió la adición de EtOH 80 % y la extracción para juntar los sobrenadantes. El solvente se evaporó hasta dejar aproximadamente 2 mL que se transfirieron a tubos de microfuga y se terminó de evaporar a sequedad a 35°C bajo flujo de nitrógeno. Se disolvió el residuo en 100 µL de metanol:agua (1:1) y se almacenó a -20°C hasta su análisis (López-Martínez et al., 2009).

3.2 Cuantificación de ácido ferúlico total y libre mediante HPLC

3.2.1 Preparación de la curva patrón y en muestras para el análisis por HPLC

Se preparó una solución madre de ácido ferúlico a una concentración de 1 mg/mL disuelto en metanol-agua (1:1). A partir de este estándar se prepararon las diluciones de cada punto de la curva utilizando concentraciones de 10.0 , 5.0 , 2.5, 1.25 y 0.625 µg/mL. Para el análisis se inyectó en el HPLC 20 µL de cada estándar y 20 µL de una dilución adecuada para el análisis de las muestras. La preparación de cada estándar se muestra en el apéndice (tabla TM3).

3.2.2 Condiciones de análisis

La cuantificación de los ácidos fenólicos totales y de ácido ferúlico libre se realizó mediante HPLC con detector de UV/VIS. Se utilizó como fase móvil metanol-agua (ácido acético 4%) (25:70) y como fase estacionaria una columna Pursospher® (Merk-Millipore USA) RP-18 de 15 cm por 4.6 mm, tamaño de partícula de 5 µm (Hempel & Bohm, 1996). Se usó una bomba con un flujo de 1.2 – 1.5 mL/min. Se empleó un detector de UV/VIS SPD-10AC (Shimadzu, USA) programado a una longitud de onda de 335 nm, rango 0.01,

sensibilidad 1 y respuesta 4. Las condiciones del integrador C-R5A (Shimadzu, USA) fueron las siguientes: Atenuación 3; Pendiente 8000-10,000; Método 2021; Formato 0.

Para los experimentos realizados en los modelos *in planta* se utilizó la cepa MY3 de *Fusarium verticillioides* (Sánchez-Rangel et al., 2005) obtenida a partir de un inóculo de sustrato estéril conservado a -20 °C. El cultivo del hongo y su conteo de conidias para su inoculación se describe en la metodología utilizada en el modelo *in vitro*, en este modelo se utilizaron 10^7 conidias/mL.

3.3. Inoculación de semillas de maíz y condiciones de incubación

Se desinfectaron semillas de maíz (15 g) con 100 mL de hipoclorito al 2.5% en frascos con tapón de rosca, se agitó vigorosamente durante 2 min y se decantó el hipoclorito, se realizó el lavado de las semillas con agua estéril de 2 a 3 veces y se decantó el sobrenadante. Las semillas se colocaron en papel absorbente y se colocaron en un matraz, se sumergieron en una suspensión de conidias de *F. verticillioides* (10^7 conidias/mL) y se mantuvieron en agitación a 100 rpm durante 6 h (Stuart™ SI30H Hybridization Oven, UK). Las semillas inoculadas se sembraron en cajas Petri con agar 1.2 %. Las cajas se incubaron durante 6, 12 y 24 h a 29°C bajo luz fluorescente y a estos tiempos se colectó la biomasa fúngica (micelio y conidias) de las semillas. También se colectó la suspensión de conidias con las cuales se realizó su inoculación mediante centrifugación (3400 rpm por 10 min) en un tubo Falcon; el botón fue recolectado y almacenado a -70°C hasta su uso para la extracción de RNA total.

3.4 Cosecha de biomasa fúngica de semillas de maíz para la determinación de ergosterol.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación (6 h, 12 h y 24 h), se sumergieron las semillas en un matraz con 50 mL de agua estéril y se agitaron por 10 min. El sobrenadante se centrifugó a 3400 rpm (Beckman GS-6R) durante 10 min y el botón se resuspendió en 2 mL de metanol. Esta suspensión se transfirió a un tubo de fondo plano con tapón de rosca al cual se agregaron 2 mL de KOH (60 %), se mezcló en vórtex e incubó a 65 °C con agitación por una 1 h (Stuart™ SI30H Hybridization Oven, UK); al

término de la incubación los tubos se sumergieron en hielo para enfriar a temperatura ambiente. La suspensión se transfirió a tubos de vidrio. Se adicionó 2.5 mL de hexano, se agitó en vórtex por 30 s y la fase orgánica se transfirió a un tubo limpio. La extracción se repitió una vez más. El hexano se evaporó a 50°C bajo flujo de nitrógeno gaseoso. Cuando se llegó aproximadamente a 1 mL de hexano en el tubo se transfirió a tubos de microfuga de 1.5 mL para concluir la evaporación, se resuspendió en 200 µL de metanol, se almacenó a -20°C hasta su análisis (Gessner et al., 1991).

3.4.1 Análisis de ergosterol por HPLC

A partir de un estándar de ergosterol de 10 mg/mL se prepararon las diluciones de cada punto de la curva utilizando concentraciones de 1, 0.5, 0.25, 0.125 y 0.0625 mg/mL y metanol como solvente. A partir de la concentración de 1 mg/mL se prepararon los puntos de la curva de 0.020, 0.010 mg/mL. Para el análisis se inyectó en el HPLC 20 µL de cada estándar y 20 µL de una dilución adecuada para el análisis de las muestras (Gessner et al., 1991).

Para la separación se utilizó como fase móvil metanol-acetonitrilo (80:20) y como fase estacionaria una columna Pursospher® RP-18 (Merk-Millipore USA) de 15 cm por 4.6 mm, tamaño de partícula de 5 µm. Se usó una bomba LC10-AD (Shimadzu, USA) con un flujo de 1.5 mL/min. Se empleó un detector de UV/VIS SPD-10AC (Shimadzu, USA) programado a una longitud de onda de 290 nm, rango 0.01, sensibilidad 1 y respuesta 4. Las condiciones del integrador Shimadzu C-R5A fueron las siguientes: Atenuación 3; Pendiente 8000-10,000; Método 2021; Formato 0.

3.5 Determinación de FB1 a partir de semillas infectadas para su cuantificación

Las semillas de maíz infectadas con *F. verticillioides* (6 h, 12 h y 24 h) se transfirieron a un tubo Falcón de 50 mL al cual se añadieron 40 mL de una mezcla de acetonitrilo:agua (9:1, vol:vol). Los tubos se agitaron a 250 rpm por 2 h y el sobrenadante se decantó en tubos de ensaye y el solvente se evaporó a sequedad (55°C) bajo un flujo de nitrógeno gaseoso. El residuo se disolvió en 200 µL de acetonitrilo:agua (1:1) y se transfirió a tubos de microfuga y se almacenaron a -20°C hasta su análisis. La

cuantificación de FB1 se realizó mediante HPLC acoplado a un detector de fluorescencia según se describe en la sección 2.7 de materiales y métodos.

3.6 Cosecha de biomasa fúngica para extracción de RNA total

Una vez transcurrido el tiempo de incubación se colocaron las semillas en un matraz con 100 mL de agua estéril y se agitó a 250 rpm durante 10 min para separar la biomasa fúngica. El sobrenadante se centrifugó a 3400 rpm por 10 min y se recolectó el botón. Se transfirió a un tubo de microfuga y fue almacenado a -70°C hasta su uso para la extracción de RNA.

3.7 Extracción de RNA total y análisis de los transcritos de genes *FUM* y reguladores de la biosíntesis de FB1 mediante RT-PCR

La metodología utilizada para realizar el análisis de la expresión génica la cual conlleva desde la extracción de RNA total con el micelio recolectado a partir de las semillas inoculadas, la síntesis de cDNA y la reacción en cadena de la polimerasa junto al análisis densitométrico se realizó siguiendo el protocolo descrito previamente como se realizó en los experimentos *in vitro*. Para la RT-PCR de los amplicones evaluados se utilizaron las condiciones mostradas en la tabla 14 a partir de las condiciones ya establecidas para el modelo *in vitro*. Los productos de amplificación fueron mediante el software ImageJ.

Tabla 14. Condiciones para la amplificación de los transcritos de los genes estudiados (Aguilar-Estevez, 2011)

Gen	Temperatura de desnaturalización	Temperatura de alineamiento	Temperatura de síntesis	Conc. de Oligos	Ciclos
<i>TEF</i>	94°C	53°C	72°C	0.6 µM	26
<i>FUM8</i>	94°C	54°C	72°C	0.6 µM	28
<i>FUM1</i>	94°C	54°C	72°C	1.2 µM	38
<i>FUM21</i>	94°C	54°C	72°C	1.8 µM	30
<i>ZFR1</i>	94°C	62°C	72°C	0.6 µM	26

VII. RESULTADOS

1. Efecto del ácido ferúlico sobre la producción de FB1 y sobre la expresión de los genes *FUM* y genes reguladores en un modelo *in vitro*.

1.1 Establecimiento de condiciones de amplificación para los genes reguladores *PAC1*, *AREA*, *FUM21* y *ZFR1*.

De acuerdo a los ensayos realizados, las condiciones establecidas para evaluar los niveles de transcrito de los genes reguladores se resumen en la tabla 15.

Tabla 15. Condiciones de amplificación para genes reguladores. Condiciones finales de amplificación para los oligonucleótidos de los genes *β-tubulina*, *TEF*, *PAC1*, *AREA*, *FUM21* y *ZFR1*.

Gen	Conc. oligos	T. alineamiento	Ciclos	Producto (pb)
<i>Tubulina</i>	0.6 μM	54°C	*28	233
<i>TEF</i>	0.6 μM	53°C	26	148
<i>PAC1</i>	0.3 μM	62°C	26	332
<i>AREA</i>	0.3 μM	62°C	26	352
<i>FUM21</i>	1.8 μM	54°C	28	143
<i>ZFR1</i>	0.6 μM	62°C	26	211

1.2 Evaluación *in vitro* del efecto del ácido ferúlico sobre la expresión de los genes *FUM* y genes reguladores.

Se evaluó la integridad del RNA total del micelio incubado en medio GYAM, la figura R7 (anexo) muestra el gel de agarosa representativo de la electroforesis donde se observan definidas las bandas correspondientes a los RNA ribosomales (18S y 28S) indicadas con las flechas. A partir de estas muestras de RNA se sintetizó el cDNA y la reacción de PCR punto final. La figura 17 muestra los productos de RT-PCR para cada tratamiento de los genes estudiados y el gen de tubulina (*TUB*) como un gen constitutivo normalizador y el análisis densitométrico de las bandas.

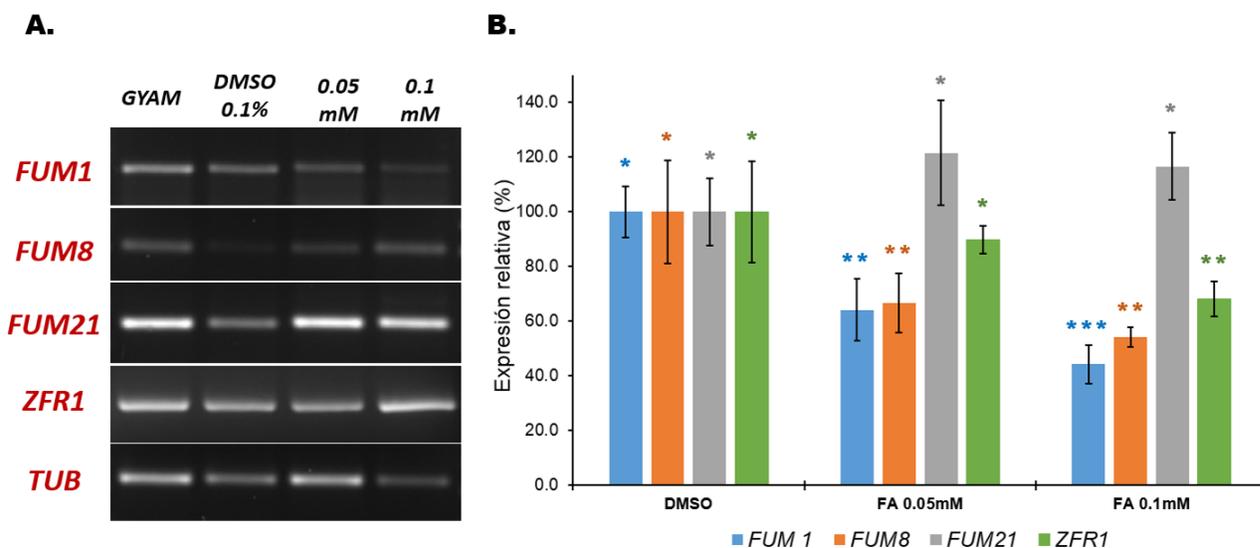


Figura 17. A. Niveles de transcritos de genes del locus *FUM* y reguladores en *F. verticillioides* cultivado con AF (0.05 mM y 0.1 mM). **B.** Análisis densitométrico del efecto del AF sobre los niveles de expresión de los transcritos del locus *FUM* y reguladores de la biosíntesis de FB1 en *F. verticillioides*. *.- Indica diferencias significativas en la expresión de los genes *FUM1* y *FUM8* a las dos concentraciones de AF respecto a los niveles de expresión en DMSO; la expresión del gen *ZFR1* muestra diferencia significativa hasta la concentración de AF 0.01 mM (ANOVA; seguida por prueba de $p < 0.05$); la expresión del gen *FUM21* no muestra diferencias significativas ($p > 0.05$; $n = 4$).

La presencia de AF en el medio de cultivo reprimió la expresión del gen *FUM1* pues se observa una disminución del 30 % en los niveles de transcrito a una concentración de 0.05 mM de AF y del 60 % a 0.1 mM con respecto al control con solvente. Por su parte el transcrito de *FUM8* mostró una disminución de 35 % a una concentración de 0.05 mM y de hasta 50 % a la concentración más alta. En contraste, los niveles de transcrito de *FUM21* se incrementaron un 20 % y 18 % con AF 0.05mM y 0.1 mM, respectivamente. La expresión de *ZFR* también se reprimió y se observa una reducción del 30 % a la concentración de 0.1mM de AF.

1.3 Efecto del ácido ferúlico sobre la producción de fumonisina B1 por *F. verticillioides* en un modelo *in vitro*

Se realizó la cuantificación de FB1 para asociar los resultados de la expresión génica con los niveles de micotoxina presentes. La figura 18 presenta los resultados de la

producción de FB1 donde se observa que el AF (0.05 mM) causó disminución del 35 % en la cantidad de FB1. Sin embargo, por la dispersión de los datos, este efecto no parece significativo ($p > 0.05$) en los tratamientos con GYAM, DMSO 0.1 % y AF 0.05 mM, mientras que el tratamiento con AF 0.1 mM si presenta diferencias significativas ($p < 0.05$). Pero el AF (0.1 mM) provocó una reducción significativa del 50 % en los niveles de FB1. Estos resultados son congruentes con la represión de los genes *FUM1* y *FUM8* los cuales participan en los primeros pasos de la biosíntesis de FB1. Los datos sugieren que el efecto represor del AF no actúa sobre *FUM21* por lo que puede estar actuando sobre otros genes reguladores.

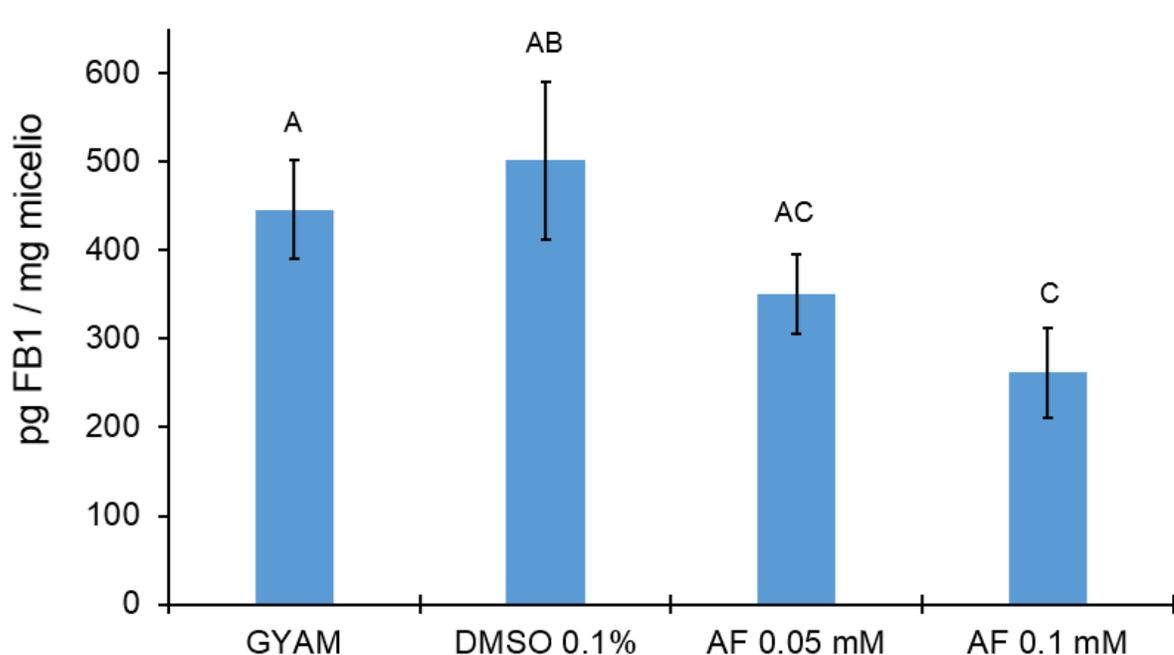


Figura 18. Efecto del AF sobre la producción de FB1 en *F. verticillioides*. La cepa MY3 de *F. verticillioides* se incubó en presencia de dos concentraciones de AF por 7 días en medio GYAM. Se incluyó un control de solvente (DMSO 0.1%). Letras distintas sobre las barras indican diferencias significativas (ANOVA; seguida por prueba de Tukey (GYAM, DMSO 0.1% y AF 0.05 mM: $p > 0.05$; AF 0.1 mM: $p < 0.05$; $n = 4$).

2. Efecto del ácido ferúlico sobre la producción de FB1 y sobre la expresión de los genes *FUM* y genes reguladores en un modelo *in planta*.

2.1 Determinación del contenido de ácido ferúlico libre y conjugado en los tres genotipos de maíz.

Se cuantificó el ácido ferúlico conjugado y libre en el pericarpio de semillas de tres distintos genotipos de maíz. Los datos se muestran en la Tabla 16, y se observa que solo del 0.06 al 0.3 % corresponde al ácido ferúlico libre y más del 99.7 % corresponde al que forma parte de la pared celular de manera conjugada al pericarpio. Estas relaciones concuerdan con lo reportado por López-Martínez et al. (2009) obteniendo que el AF libre representa una mínima cantidad en la semilla de maíz. Asimismo, estos datos son consistentes con los obtenidos previamente en el laboratorio (Figura 13) lo que nos permitió clasificar a una mezcla de semillas con bajo contenido de AF y una mezcla de alto contenido de AF. El contenido de AF en la raza Chalqueño fue un poco menor que en las semillas con alto contenido.

Tabla 16. Contenido de ácido ferúlico total, AF conjugado y AF libre en el pericarpio de semillas de tres genotipos de maíz (mg/g pericarpio). *.- En paréntesis se muestra el porcentaje (%) que representa el contenido de AF conjugado o libre con respecto al AF total presente en el pericarpio de la semilla de maíz de los distintos genotipos.

Genotipo	Contenido de Ácido ferúlico en pericarpio de maíz		
	AF total (mg/g pericarpio)	AF conjugado mg/g pericarpio	AF libre mg/g pericarpio
Semillas con bajo AF	6.14 ± 0.40 (100)*	6.12 ± 0.40 (99.70)*	0.0185 ± 0.0028 (0.30)*
Chalqueño	13.726 (100)*	13.718 (99.94)*	0.008 (0.06)*
Semillas con alto AF	15.49 ± 1.31 (100)*	15.46 ± 1.31 (99.87)*	0.0207 ± 0.0026 (0.13)*

2.2 Establecimiento del modelo de infección *in planta*.

Para establecer el método de inoculación y el modelo de infección *in planta*, utilizamos semillas de la raza Chalqueño, pues no era una limitante la cantidad de éstas. La

colonización de las semillas de maíz por *F. verticillioides* se siguió mediante la observación de los síntomas y por observación en microscopio estereoscópico del desarrollo del micelio sobre la superficie. Asimismo, se analizaron los niveles de ergosterol (ERG) como medida de la biomasa del micelio debido a que el ergosterol es un componente principal de sus membranas. La figura 19 muestra los síntomas de infección en las semillas a las 6, 12 y 24 horas. Solamente a las 24 h se observan síntomas en las semillas, como es un patrón estriado cerca del pedicelo. Bajo el microscopio estereoscópico se observa micelio desde las 6 h postinoculación (hpi), y es muy evidente y más abundante a las 12 y 24 hpi. A este tiempo algunas semillas muestran algunas regiones de necrosis.

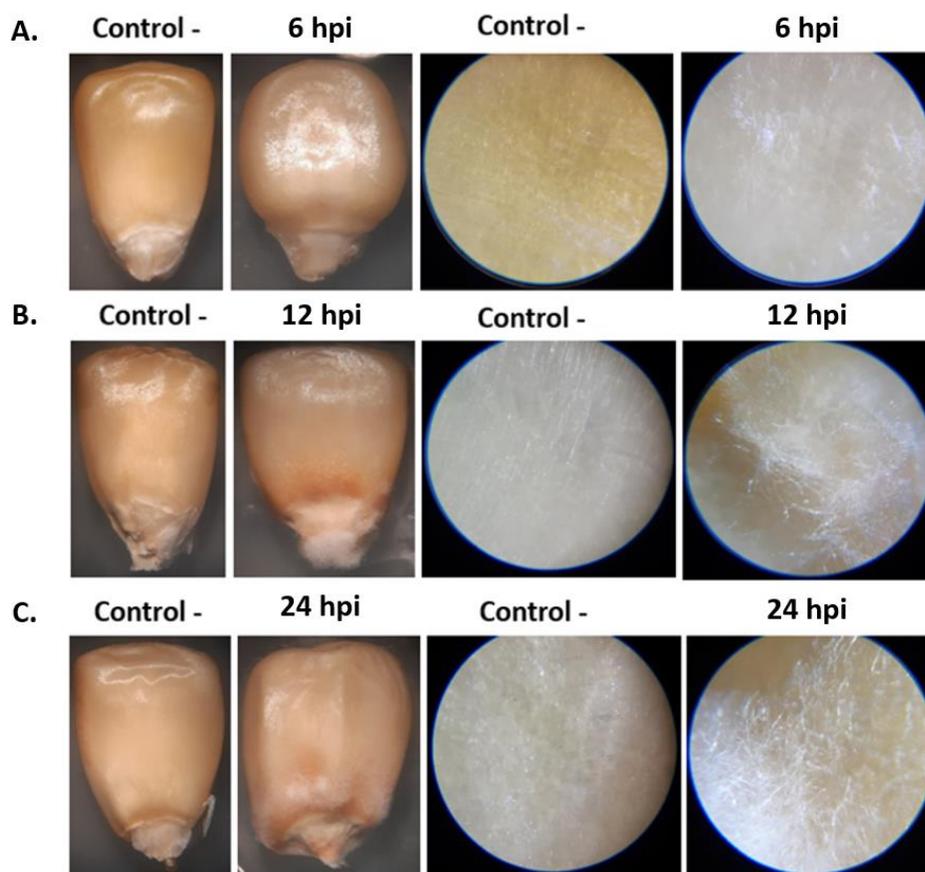


Figura 19. Infección de semillas de maíz “Chalqueño” por *Fusarium verticillioides* a 6 hpi (A), 12 hpi (B), y 24 hpi (C) documentadas fotográficamente y bajo el microscopio estereoscópico (60X) (Imágenes representativas; n= 15).

Los niveles de ergosterol constituyen un parámetro de biomasa fúngica pues es un componente lipídico de la membrana celular de los hongos filamentosos y aunque está presente también en plantas sus niveles son muy bajos en comparación con los hongos. La figura 20 muestra el incremento en los niveles de ergosterol durante el proceso de colonización pues los niveles de ergosterol a las 12 hpi son aproximadamente del 500 % más altos que a las 6 h.

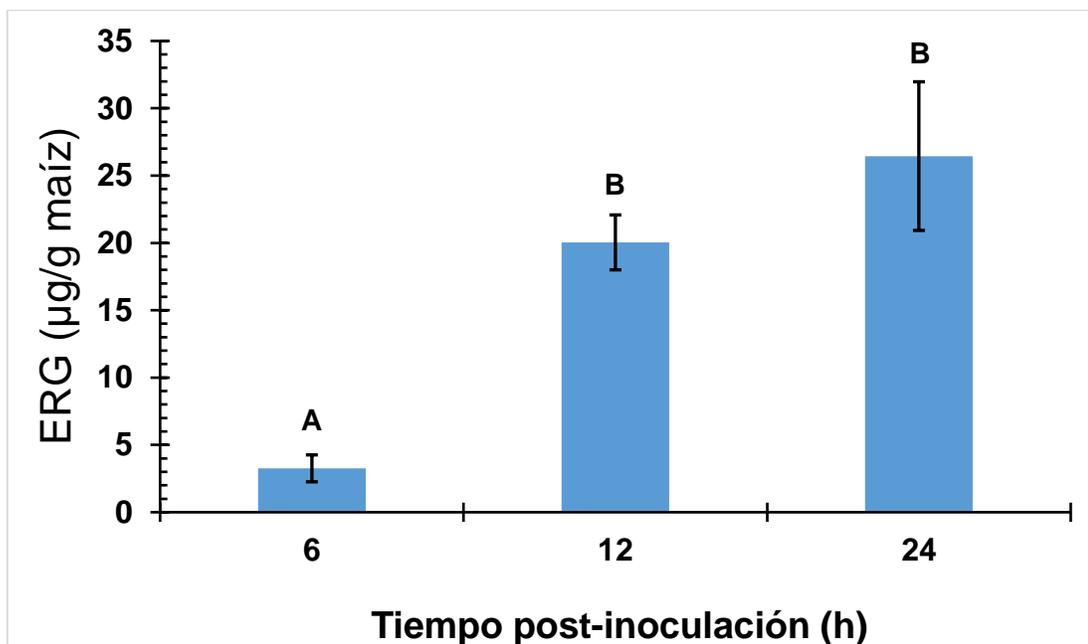


Figura 20. Contenido de ergosterol en semillas de maíz “Chalqueño” infectadas con *Fusarium verticillioides* a distintos tiempos de incubación (ERG: Ergosterol) Letras distintas sobre las barras indican diferencias significativas (ANOVA; seguida por prueba de Tukey ($p < 0.05$; $n = 3$)).

2.3 Expresión *in planta* de los genes *FUM* y genes reguladores

Se extrajo RNA total del micelio separado de las semillas a las 6, 12 y 24 hpi, y se evaluó su integridad mediante electroforesis horizontal (Fig. R7 Anexo). Para evaluar los niveles de expresión de los genes del locus *FUM* y reguladores se realizó la RT-PCR con los oligonucleótidos específicos para cada gen usando las condiciones establecidas para el estudio en el modelo *in vitro* (Fig. 21A). Para estos experimentos se utilizó el transcrito del gen del factor de elongación 1- α (*TEF*) como normalizador.

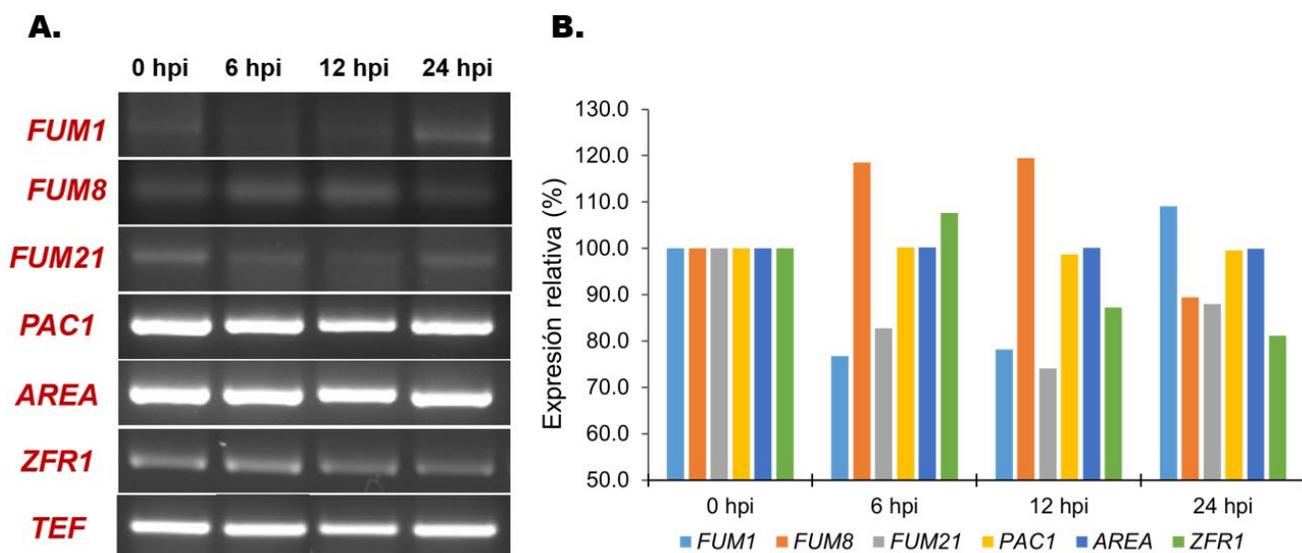


Figura 21. A. Productos de amplificación de PCR de genes del locus *FUM* y reguladores de *F. verticillioides* colonizando semillas de maíz “Chalqueño” a las 24 h, 48 h y 72 h post-inoculación. **B.** Análisis densitométrico de los transcritos de los genes *FUM* y reguladores durante la infección de *F. verticillioides* de semillas de maíz “Chalqueño”.

El análisis densitométrico (figura 21B) muestra la expresión relativa de los genes del locus *FUM* y reguladores a los distintos tiempos post-inoculación. La expresión del gen *FUM8* se indujo desde las 6 hpi y los niveles de transcrito se mantuvieron a las 12 hpi y disminuyeron un 45 % a las 24 hpi. En cambio, los niveles de transcrito del gen *FUM1* disminuyeron a las 6 hpi y 12 hpi y aumentaron a las 24 hpi. El gen regulador *FUM21* mostró un patrón de expresión similar a *FUM1*. El transcrito del gen *ZFR1* disminuyó a las 12 hpi y 24 hpi. Los transcritos de los genes *PAC1* y *AREA* no se modificaron durante la interacción *Fusarium*-maíz.

Se cuantificaron los niveles de FB1 producidos durante el proceso de infección de la semilla de maíz a las 6, 12 y 24 hpi. La figura 22 muestra que desde las 6 hpi hay FB1 detectable en las semillas y que estos niveles incrementan aproximadamente 600 % a las 12 hpi y se sigue acumulando hasta las 24 hpi.

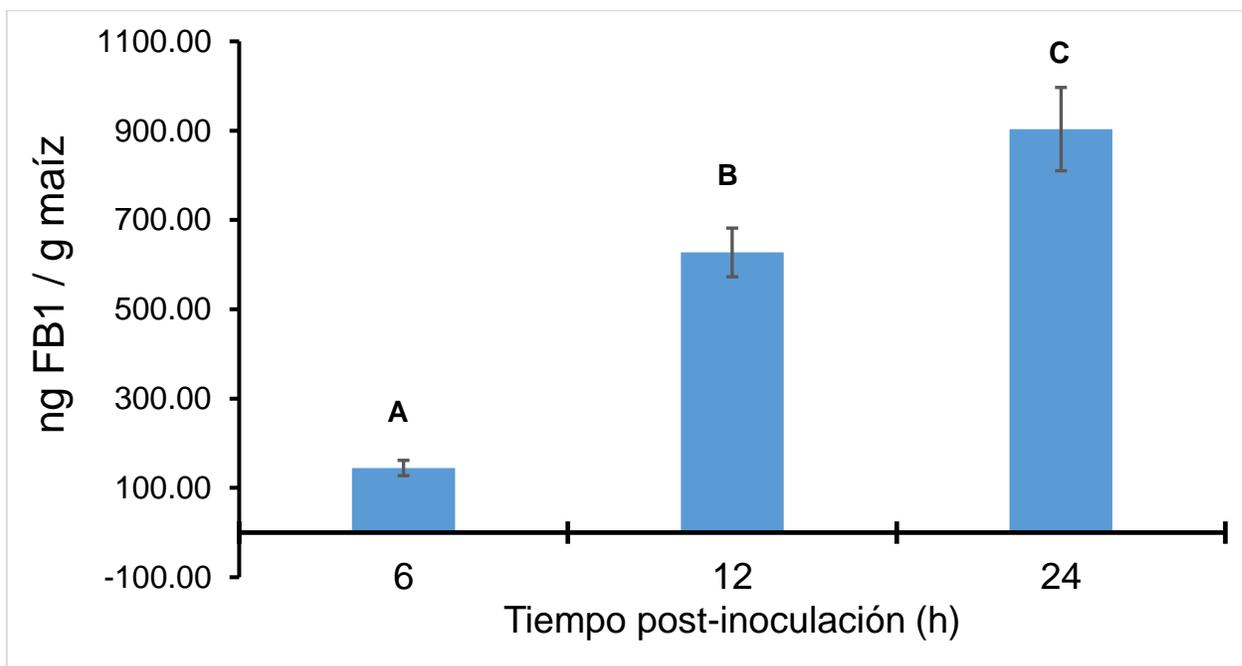


Figura 22. Niveles de Fumonisina B1 producida en semillas de maíz “Chalqueño” durante el proceso de infección por *F. verticillioides*. Letras distintas sobre las barras indican diferencias significativas (ANOVA; seguida por prueba de Tukey ($p < 0.05$; $n = 3$)).

3. Efecto del contenido de ácido ferúlico en el pericarpio de la semilla de maíz sobre la producción de FB1 y la expresión de los genes *FUM* y genes reguladores.

Para estudiar el efecto del contenido de AF sobre la expresión de los genes *FUM* y la biosíntesis de FB1 en el modelo *in planta*, empleamos los grupos de semillas caracterizados como alto y bajo contenido de AF.

3.1 Evaluación del desarrollo de *F. verticillioides* en semillas de maíz con distinto genotipo de contenido de ácido ferúlico en pericarpio.

Una vez establecidas las condiciones de estudio para el modelo *in planta*, se siguió el mismo protocolo de inoculación y análisis en los dos genotipos contrastantes. A simple vista, no se observaron síntomas de infección de las semillas (figura 23), pero bajo el

microscopio se observa el desarrollo de micelio a partir de las 6 hpi, y muy abundante a las 12 hpi y 24 hpi en ambos genotipos.

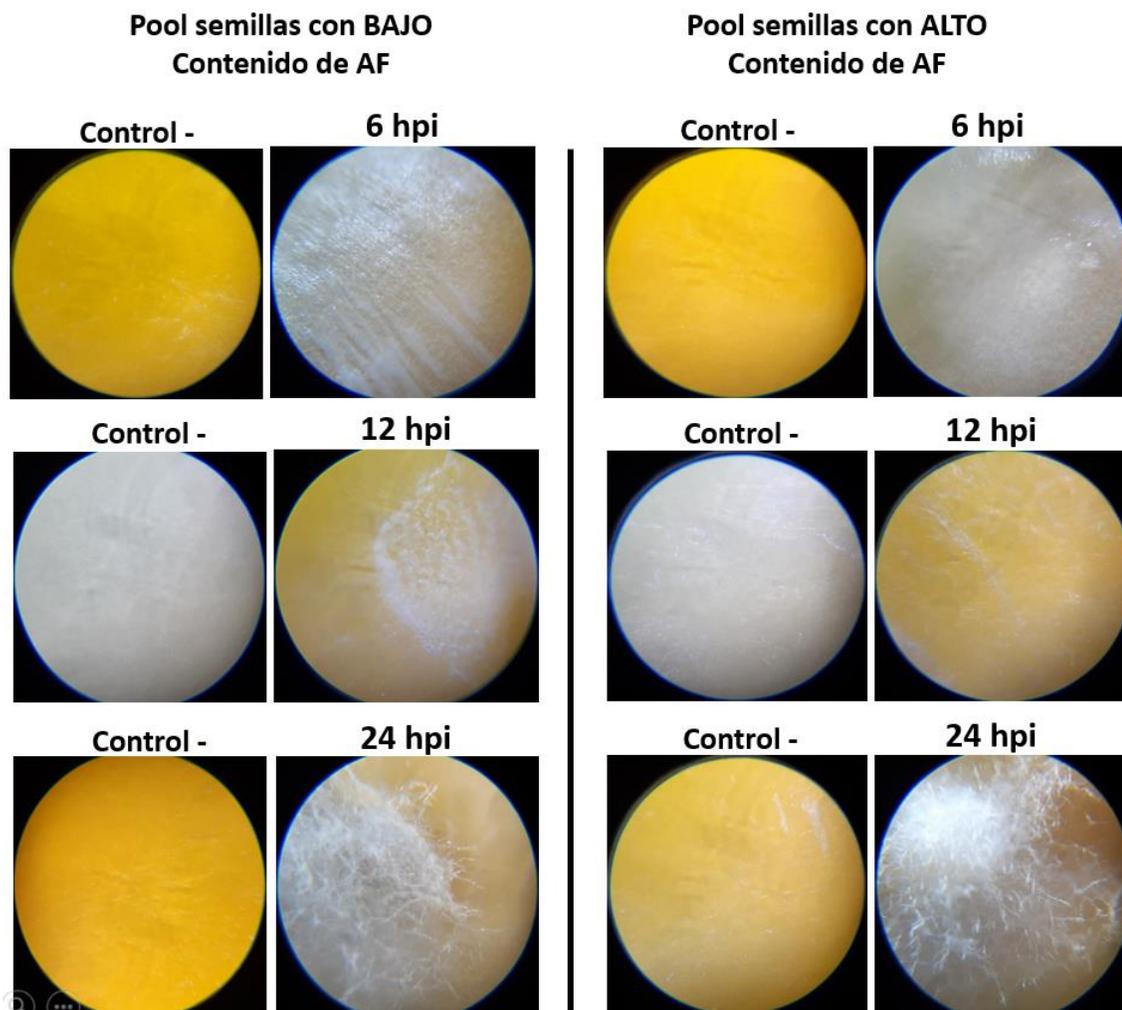


Figura 23. Infección de semillas de maíz de BAJO AF y ALTO AF por *Fusarium verticillioides* a 6 hpi, 12 hpi, y 24 hpi documentadas fotográficamente y bajo el microscopio estereoscópico (60X) (Imágenes representativas; n=15).

Se analizaron los niveles de ergosterol a lo largo del periodo de infección. La figura 23 muestra la acumulación de ergosterol durante el proceso de colonización en ambos grupos de semillas. En las semillas con bajo contenido de AF se observa que hubo un incremento significativo (300 %) en los niveles de ergosterol a partir de las 12 hpi con respecto a las 6 hpi (Figura 24). A las 12 hpi se observa que los niveles de ergosterol fueron aproximadamente 40 % menores en las semillas con alto AF con respecto las

semillas con bajo AF siendo estadísticamente significativa ($p < 0.05$) . A las 24 hpi la diferencia entre los dos genotipos fue del 20 %.

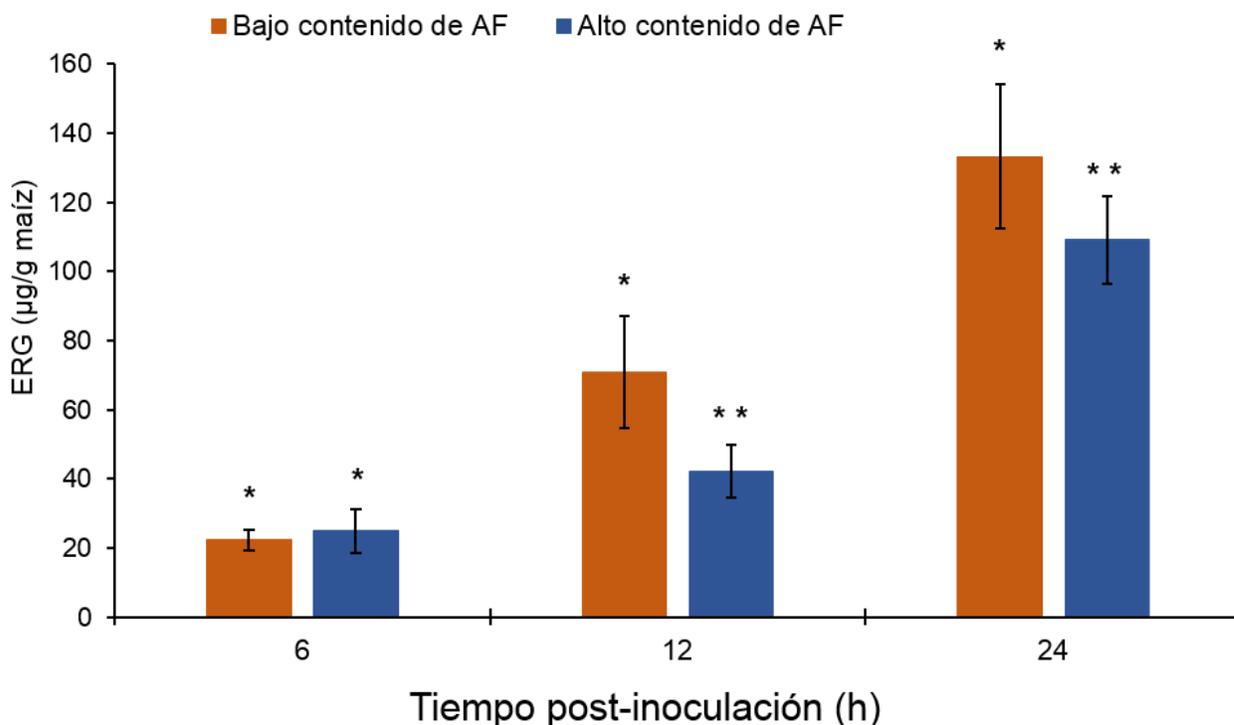


Figura 24. Contenido de ergosterol presente en las semillas de maíz con alto y bajo contenido de AF durante el proceso de colonización de *F. verticillioides*. (El número de asteriscos (*) en cada par de muestras indica diferencias significativas por la prueba de T-pareada; ($T < t$; $p < 0.05$; $n=3$).

3.2 Expresión de los genes *FUM* y el regulador *ZFR1* en los genotipos de maíz contrastantes en niveles de AF.

Se extrajo RNA total del micelio recolectado de cada grupo de semillas. Debido a la limitante en el número y tamaño de las semillas con respecto al maíz Chalqueño, se obtuvo menos RNA fúngico, por lo que se realizó la calibración para la síntesis de cDNA ajustando una concentración de 500 ng RNA/ μL . Se realizó la RT-PCR con los oligonucleótidos específicos para los genes *FUM* y para el gen regulador *ZFR1* utilizando las condiciones establecidas en la tabla 16 de la sección de materiales y métodos. Debido a las cantidades de RNA, se omitió el análisis de los genes *AREA* y *PAC1*, pues los niveles de transcrito no se modificaron durante la infección de maíz Chalqueño.

La figura 25A muestra los resultados de la RT-PCR de los amplicones y la figura 25B el análisis densitométrico de los genes *FUM* y *ZFR1* del patógeno desarrollado en el grupo de semillas con alto contenido de AF en el pericarpio. Se observa que la expresión del gen *FUM1* aumentó casi 3.5 veces durante las primeras 6 hpi y decayó a las 12 y 24 hpi. *FUM8* y *FUM21* presentaron un patrón similar al que muestra *FUM1* ya que su expresión incrementó hasta 3 veces aproximadamente durante las primeras 6 hpi y se redujo en un 20 y 30 % respectivamente a partir de las 12 y 24 hpi. La expresión del gen *ZRF1* aumentó casi 4 veces más durante las 6 hpi, esta se redujo en 80 % a las 12 hpi.

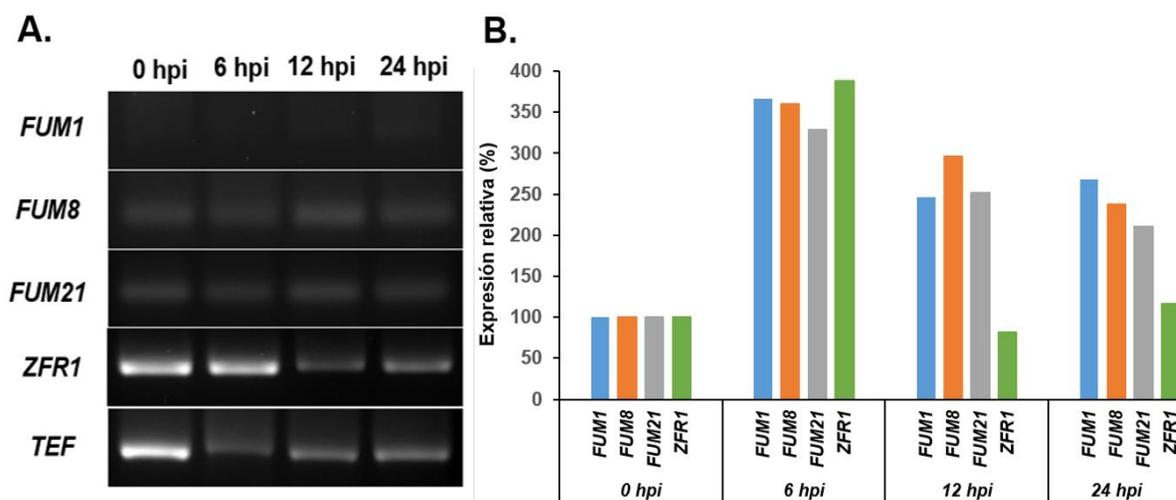


Figura 25. Niveles de transcritos de los genes *FUM* y reguladores en el genotipo de maíz con alto AF. **A.** Amplicones de PCR de los genes *FUM* y *ZFR1* de *F. verticillioides* en semillas de maíz con **bajo** contenido de ácido ferúlico en el pericarpio. **B.** Análisis densitométrico de la expresión de los genes evaluados.

La figura 26 muestra los resultados de la expresión génica del patógeno que se desarrolló en el grupo de semillas con bajo contenido de AF en el pericarpio. El análisis densitométrico muestra que la expresión del gen *FUM1* aumentó desde 200 hasta 230% a las 6 y 12 hpi, respectivamente. A las 24 hpi disminuyó 50 % con respecto a las 12 hpi. *FUM8* aumentó su expresión hasta 150 % durante las primeras 12 hpi y se reprimió a las 24 hpi. La expresión del gen *FUM21* mostró un patrón similar al que presentó *FUM8* durante las primeras 12 hpi y a las 24 hpi hubo una reducción en su expresión hasta del 70 %. *ZFR1* mostró un incremento hasta del 250 % a las 6 hpi, mientras que esta se reduce de un 30 a 50 % a las 12 y 24 respectivamente.

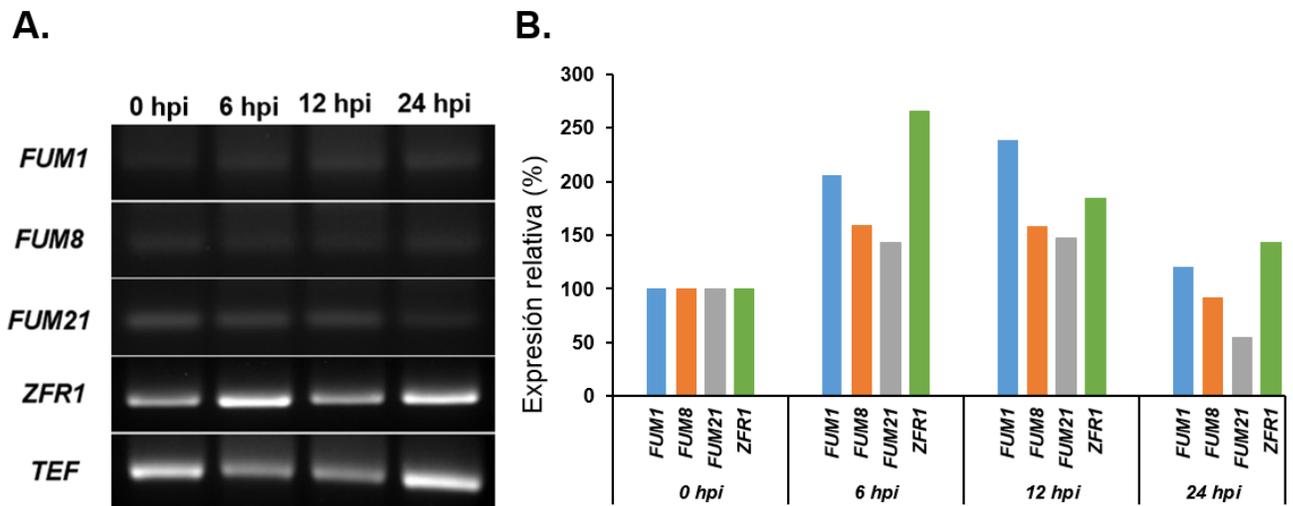


Figura 26. Niveles de transcritos de los genes *FUM* y reguladores en el genotipo de maíz con bajo AF. **A.** Amplicones de PCR de los genes *FUM* y *ZFR1* de *F. verticillioides* en semillas de maíz con **bajo** contenido de ácido ferúlico en el pericarpio. **B.** Análisis densitométrico de la expresión de los genes evaluados.

3.3 Efecto del ácido ferúlico sobre la producción de FB1 en genotipos de maíz con alto y bajo contenido de AF

Para asociar los resultados de la expresión relativa de los genes evaluados con los niveles de FB1 producida, ésta se analizó por HPLC. La figura 27 presenta los niveles de FB1 producida a los distintos tiempos post-inoculación en ambos grupos de semillas. Las diferencias entre los genotipos se observaron desde las 6 hpi; los niveles de FB1 producida en las semillas con bajo contenido de AF fueron hasta un 60 % mayor respecto a los niveles producidos en las semillas con alto contenido de AF. A las 12 hpi la cantidad de micotoxina producida en las semillas con alto AF aumenta respecto a los a las 6 hpi, pero siguió siendo inferior que en las semillas de bajo AF. A las 24 hpi, los niveles de FB1 no aumentaron significativamente en alto AF y fueron aproximadamente la mitad del contenido con bajo AF.

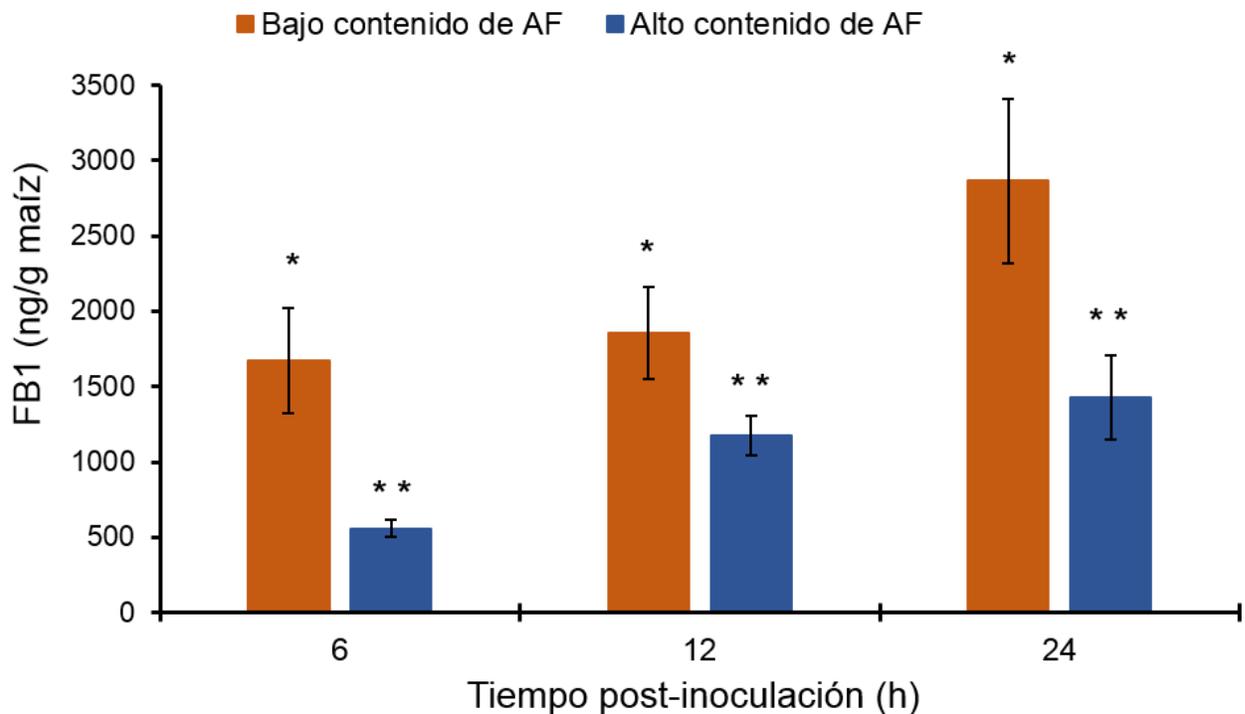


Figura 27. Niveles de FB1 producida por *F. verticillioides* en los genotipos de semillas de maíz con alto y bajo contenido de AF presente en pericarpio. (El número de asteriscos (*) en cada par de muestras indica diferencias significativas por la prueba de T-pareada; ($T < t$; $p < 0.05$; $n=3$).

De acuerdo a los resultados obtenidos de la cuantificación de FB1 producida por *F. verticillioides* y a la expresión de los genes *FUM* no es posible afirmar si el AF presente en el pericarpio de la semilla de maíz tiene un efecto sobre la expresión de estos genes a los tiempos evaluados. Sin embargo sí se observa una disminución en la expresión del gen *ZRF1* sobre las semillas con alto contenido de AF en su pericarpio hasta de un 50% respecto al expresado en las semillas con bajo contenido de AF a las 12 hpi (ANEXO R9), lo cual puede reflejar una menor acumulación de la toxina en las semillas con alto contenido de AF.

VIII. DISCUSIÓN

En este trabajo encontramos que el ácido ferúlico inhibió la producción de FB1 *in vitro* y que esta inhibición se asoció con la represión de los genes *FUM*, probablemente a través de las vías en las que participan *FUM21* y *ZFR1*. En la interacción *F. verticillioides* – maíz, encontramos que los genes *FUM* se expresaron desde las primeras horas de infección y que la FB1 se detectó desde las 6 hpi, lo que es consistente con su función como factor de virulencia del fitopatógeno. En el genotipo de maíz con niveles altos de ácido ferúlico, la colonización de *F. verticillioides* y la producción de FB1 fue menor que en el genotipo con menores niveles de ácido ferúlico. Aunque no se pueden descartar otros componentes estructurales del pericarpio, los niveles de ácido ferúlico conjugado pueden constituir un factor determinante en la interacción, aunque a los tiempos evaluados no se puede determinar que el ácido ferúlico actúe sobre la expresión de los genes *FUM*. Con base en los resultados obtenidos de los niveles de FB1 producida y a la expresión génica en ambos genotipos de maíz, se puede inferir que la expresión del gen *ZFR1* es determinante durante la biosíntesis de FB1. El ácido ferúlico tuvo un efecto inhibitorio sobre su expresión, siendo mayor el efecto inhibitorio en el genotipo con alto contenido de ácido ferúlico, lo cual repercutió en un menor nivel de FB1 acumulada.

Regulación de la producción de fumonisina.

La regulación de la producción de fumonisinas es muy compleja y se han identificado varios reguladores fuera del locus *FUM* que responden a cambios ambientales y nutricionales, por ejemplo, *PAC1* que responde a cambios en el pH, actúa como un regulador negativo al reprimir la síntesis de FB1 en un pH ácido (Flaherty et al., 2003). El metabolismo de fuentes de nitrógeno está regulado por la presencia del gen *AREA* cuya expresión favorece la síntesis de FB1 (Kim et al. 2008). Asimismo en el metabolismo de carbohidratos participa el gen *FST1* como un transportador de fuentes de carbono, la expresión de este gen se encuentra regulada por el factor de transcripción *ZFR1*. La expresión de ambos genes es requerida para la biosíntesis de FB1, incluso se ha sugerido que dentro de los blancos moleculares del factor *ZFR1* están algunos genes del locus *FUM* (Flaherty et al. 2004). Dentro de los genes que participan en el desarrollo sexual y en el metabolismo secundario de *F. verticillioides* se encuentra el gen *FvVE1*

cuya expresión es esencial para la producción de toxinas como la FB1, ya que la presencia de este gen es necesaria para la expresión de *FUM21*, el cual a su vez participa como un factor de transcripción que regula al locus *FUM* (Myung et al. 2008).

Efecto del AF en la expresión génica y en la biosíntesis de FB1

En este trabajo encontramos que el AF, a concentraciones subletales, inhibe la producción de FB1 y la expresión de los genes *FUM* y que posiblemente este mecanismo implique una regulación transcripcional de los reguladores de su biosíntesis. Entre estos reguladores, la expresión de los genes *PAC1* y *AREA* no parece estar afectada y posiblemente sean los reguladores *ZFR1* y *FUM21* los componentes de la cascada de señalización que responde a la presencia del AF.

Los resultados obtenidos en la evaluación en un modelo *in vitro* del efecto del ácido ferúlico sobre la expresión de los genes *FUM1*, *FUM8* y genes reguladores sugieren que la expresión del gen *FUM21* se indujo por la presencia de AF, mientras que los genes *FUM1* y *FUM8* sí presentaron una disminución en su expresión, lo cual puede indicar que el efecto inhibitorio de AF podría ser sobre los genes que codifican enzimas que participan en la ruta biosintética de FB1 y no sobre *FUM21*, que codifica el factor de transcripción que regula la transcripción del locus *FUM*. Esto también puede estar sustentado por el efecto inhibitorio que presenta *ZFR1*, ya que se ha propuesto que su expresión es necesaria para la expresión de los genes *FUM*. Sin embargo, no se ha esclarecido esta idea (Flaherty et al. 2004). El producto de *ZFR1* regula la expresión del gen *FST1*, el cual codifica para transportador de carbohidratos (Niu et al., 2016), pero otros de sus genes blanco podrían ser algunos del locus *FUM*. Los genes *PAC1* y *AREA* son reguladores generales que participan en el control de la expresión de otros genes, además de los del locus *FUM*, en respuesta a condiciones ambientales y en la presencia del AF no provocó un cambio significativo en su expresión.

En este trabajo se estableció un modelo para estudiar la colonización de semillas de maíz por *F. verticillioides*, lo que nos permitió evaluar el efecto de la composición del

pericarpio en la expresión de los genes *FUM* y la producción de FB1. Los resultados de los experimentos *in vitro* se trasladaron a un modelo *in planta* donde observamos que los genes del locus *FUM* se expresan a tiempos muy tempranos después de la inoculación (6 h y 12 h), y que la FB1 se detecta a esos tiempos también. Al usar genotipos de maíz contrastantes en niveles de AF en el pericarpio de la semilla nos permitió evaluar sus efectos sobre la producción de FB1 pues es el compuesto más abundante en este tejido. Encontramos que la producción de FB1 fue significativamente menor en el genotipo de alto AF (15.486 ± 1.311 mg/g pericarpio) que en el de bajo AF (6.140 ± 0.403 mg/g pericarpio). Los resultados en este modelo también indican que los reguladores *FUM21* y *ZFR1* están involucrados en la respuesta al AF y que este componente, a pesar de estar conjugado con la pared celular, afecta el desarrollo del hongo y la producción de fumonisina en la semilla durante las etapas tempranas de infección. El efecto inhibitorio sobre la expresión de estos genes puede reflejarse en una disminución en los niveles de FB1 producida. De acuerdo a lo observado en la expresión de los genes *FUM21* y *ZFR1* en el modelo *in planta*, se ha sugerido que el mecanismo por el que el ácido ferúlico participa en la inhibición de la biosíntesis de FB1, es disminuyendo la expresión del gen *ZFR1*, ya que en ambos grupos de semillas de maíz con genotipos alto y bajo contenido de AF se presentó una disminución significativa en la expresión de este gen y en el genotipo de maíz con altos niveles de AF hubo una mayor represión de este gen.

En el genotipo con bajo AF la expresión del gen *FUM8* y *FUM21* parece estar más activa en las primeras horas post-inoculación ya que la expresión de este gen disminuye conforme pasa el periodo de incubación. *FUM1* se encuentra en menor proporción durante el tiempo evaluado en el genotipo con bajo contenido de AF. En el genotipo de bajo AF esta expresión es menor sobre estos genes por lo que se puede sugerir que esto se debe a que a una mayor concentración de AF, la expresión de estos genes es mayor como una respuesta del patógeno para propiciar su colonización durante las primeras horas de interacción con la planta siendo que a las 12 hpi es cuando el efecto represor del AF repercute en la disminución en los niveles de FB1 producida debido probablemente a la represión del gen regulador *ZFR1*.

Efectos del estado REDOX en la producción de micotoxinas.

Una actividad bioquímica caracterizada del ácido ferúlico es su actividad antioxidante, por lo que es posible que afecte el estado REDOX en el micelio del hongo y esto tenga efecto en la producción de fumonisina. Esto se ha estudiado con más detalle en una especie relacionada, *F. graminearum* y la producción del tricoteceno deoxinivalenol (Ponts et al., 2007). Se tiene evidencia que el estrés oxidativo por H₂O₂ es importante durante la biosíntesis del DON y 15ADON, ya que la expresión de los genes del locus *Tri* responsable de la síntesis de estas toxinas se induce, repercutiendo en un aumento en los niveles de tricotecenos producidos, lo cual sugiere que el H₂O₂ podría actuar desencadenando una respuesta de señalización en alguna vía que conduzca a la producción de toxinas, en contraste en presencia de catalasa la expresión los genes *Tri* y los niveles de DON y 15ADON se reducen.

Sin embargo, este efecto no es tan claro para el caso de *F. verticillioides* y la síntesis de FB1, pues se ha reportado (Ferrigo et al., 2015) que la respuesta frente a la presencia de H₂O₂ varía de cepa a cepa dentro de la misma especie y se ve reflejado en los niveles de FB1 y en la expresión génica de algunos genes del locus *FUM*; en la cepa Fv8 se promovió la transcripción de los genes implicados en la biosíntesis de FB1 en presencia de H₂O₂. En la suplementación con H₂O₂ la expresión de los genes *FUM* incrementó, particularmente dos genes, *FUM6* y *FUM10* (Ferrigo et al. 2015). En presencia de catalasa la expresión de los genes se ve reprimida. En caso contrario en la cepa Fv1 la expresión de estos genes se ve reprimida lo cual se refleja en una disminución de los niveles de FB1 acumulada.

Actividad antioxidante del ácido ferúlico.

El mecanismo de acción del ácido ferúlico sobre el crecimiento y la producción de fumonisinas aún no está bien claro, pero se sabe que los ácidos fenólicos actúan en respuesta de defensa frente la infección contra *Fusarium spp*, actuando como una barrera química y física, lo cual es un indicativo de susceptibilidad a la infección frente a este patógeno. Por ejemplo, los compuestos antioxidantes juegan un papel crítico frente a la

lipoperoxidación ya que se conoce que el AF inhibe la actividad de las lipooxigenasas (LOX), proporcionando resistencia frente a la acumulación de fumonisinas (Picot et al., 2013). Se ha sugerido que el ácido ferúlico libre en la semilla de maíz es el que tiene el efecto sobre la expresión de los genes *FUM* y reguladores, repercuten en la disminución en la producción de FB1 a pesar de que este se encuentra en una pequeña proporción (0.13 % al 0.30 %) respecto al total del ácido ferúlico presente en el pericarpio. Sin embargo, se ha reportado que el ácido ferúlico que se encuentra de manera conjugada conforma ≈ 99.8 % del total de AF, presenta una alta capacidad antioxidante, lo cual puede ser importante en la interacción planta-patógeno (Das et al., 2015), demostrando que la contribución de la capacidad antioxidante del ácido ferúlico conjugado representa del 85 al 95 % de total.

La pared celular de las plantas presenta diversos componentes formando enlaces covalentes y no covalentes entre las cadenas de arabinosilanos, lignina, celulosa, proteínas y otros componentes entre ellos los compuestos fenólicos como el ácido ferúlico, los cuales forman enlaces ésteres con los polisacáridos de la pared celular proporcionándole rigidez a esta debido al entrecruzamiento entre las estructuras. Se ha estudiado cómo esta reticulación de los compuestos fenólicos, y por lo tanto la presencia de ácido ferúlico y sus derivados como el ácido deshidroferúlico, se han asociado fuertemente a la capacidad de la planta para protegerse contra patógenos como una de sus principales barreras físicas (Bento-Silva et al., 2018). El ácido ferúlico en su forma libre es fungistático frente a *F. graminearum* y los niveles de DON presentes son más bajos en los genotipos de maíz más resistentes, por su alto contenido de deshidrodímeros de ácido ferúlico (DFA), componentes de la pared celular cuya función principal es la de proporcionar integridad física, al proporcionar protección frente a las hidrolasas fúngicas (Bily et al., 2003).

Se ha señalado también como antecedentes sobre el efecto del estrés ambiental, principalmente por presencia de las especies reactivas de oxígeno como el H_2O_2 , el cual se ha reportado que en *F. graminearum* induce la producción de DON y 15ADON, en estudios sobre *F. verticillioides* se ha reportado que la respuesta a un estado oxidativo

puede variar entre cepas. Se tienen propuestas que sugieren que la capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos como el ácido ferúlico puede alterar el estado redox de la célula del hongo, el cual puede afectar las vías de señalización que eventualmente participen en la inducción o represión de la producción de FB1 (Kim et al., 2007).

Con estos resultados y con los antecedentes en *F. graminearum* sobre la inducción en la biosíntesis de tricotecenos en presencia de EROs, se puede sugerir que en la cepa MY3 de *F. verticillioides* debido a la actividad antioxidante del AF, la presencia de EROs se ve disminuida a una alta concentración de este ácido, repercutiendo en una disminución en la biosíntesis de FB1, posiblemente alterando una vía de señalización que involucra la expresión del gen *ZFR1* y visceversa, a una baja concentración de AF es mayor la presencia de EROs ocasionando un aumento en los niveles de FB1.

IX. CONCLUSIONES

En un modelo *in vitro* el AF inhibe la producción de FB1 y reprime la expresión de *FUM1* y *FUM8* y del regulador *ZFR1*, pero no afecta la expresión de los reguladores transcripcionales *FUM21*, *AREA* y *PAC1*.

Al trasladar el estudio a un modelo *in planta*, encontramos que en la mezcla de semillas con alto contenido de AF los niveles de FB1 producidos son menores a los de la mezcla de semillas con bajo AF. Este efecto no se asoció con los niveles de expresión de los genes *FUM*, pero sí con los niveles de expresión del regulador *ZFR1*. La expresión de los genes reguladores *AREA* y *PAC1* no se modificó durante la infección de semillas de maíz.

X. PERSPECTIVAS

Para confirmar si el efecto del AF sobre la síntesis de FB1 está asociado con su actividad antioxidante, se pueden determinar los niveles de la micotoxina producida y la expresión de los genes *FUM* y *ZFR1* en presencia de H₂O₂ y evaluar cómo el AF lo afecta. Asimismo, se puede estudiar la actividad antioxidante de los extractos de pericarpio de semillas de los genotipos de maíz estudiados.

XI. BIBLIOGRAFÍA

- Achyuthan, KE., Achyuthan, AM., Adams, PD., Dirk, SM., Harper, JC., Simmons, BA. & Singh, AK. 2010. Supramolecular self-assembled chaos: polyphenolic lignin's barrier to cost-effective lignocellulosic biofuels. *Molecules*. 15: 8641-8688.
- Bacon, CW., Bennett, RM., Hinton, DM. & Voss, KA. 1992. Scanning electron microscopy of *Fusarium moniliforme* within asymptomatic corn kernels and kernels associated with equine leukoencephalomalacia. *Plant Dis*. 76: 144-148.
- Beekrum, S., Govinden, R., Padayachee, T. & Odhav, B. 2003. Naturally occurring phenols: a detoxification strategy for fumonisin B1. *Food Addit Contam*, 20: 490-493.
- Bento-Silva, A., Vaz-Patto, MC. & do Rosário-Bronze, M. 2018. Relevance, structure and analysis of ferulic acid in maize cell walls. *Food Chem*. 246: 360-378.
- Bily, AC., Reid, LM., Taylor, JH., Johnston, D., Malouin, C., Burt, AJ., Bakan, B., Regnault-Roger, C., Pauls, KP., Arnason, JT. & Philogéne, BJ. 2003. Dehydrodimers of Ferulic Acid in Maize Grain Pericarp and Aleurone: Resistance Factors to *Fusarium graminearum*. *Phytopathology*. 93(6): 712-719.
- Blacutt, AA., Gold, SE., Voss KA., Gao, M. & Glenn AE. 2018. *Fusarium verticillioides*: Advancements in understanding the toxicity, virulence, and niche adaptations of a model mycotoxigenic pathogen of maize. *Phytopathology*. 108:312-326
- Bluhm, B.H., Kim, H., Butchko, R.A. & Woloshuk, C.P. 2008. Involvement of ZFR1 of *Fusarium verticillioides* in kernel colonization and the regulation of *FST1*, a putative sugar transporter gene required for fumonisin biosynthesis on maize kernels. *Mol. Plant Pathol*. 9: 203–211.
- Bluhm, BH. & Woloshuk, CP. 2005. Amylopectin induces fumonisin b1 production by *Fusarium verticillioides* during colonization of maize kernels. *Mol Plant Microbe Interact*. 18 (12): 1333.
- Bojja, RS., Cerby, RL., Proctor, RH. & Du, L. 2004. Determining the biosynthetic sequence in the early steps of the fumonisin pathway by use of three gene-disruption mutants of *Fusarium verticillioides*. *J. Agric. Food Chem*. 52: 2855-2860.

- Buranov, A. U., & Mazza, G. 2009. Extraction and purification of ferulic acid from flax shives, wheat and corn bran by alkaline hydrolysis and pressurized solvents. *Food Chem.*, 115(4), 1542-1548.
- Calcagno-Pizarelli, AM., Negrete-Urtasun, SH., Denison, JD., Rudnicka, HJ., Bussink, T., Munera-Huertas, L., Stanton, A., Hervás-Aguilar, EA., Espeso, J., Tilburn, HN., Arst, Jr., & M. A. Peñalva. 2007. Establishment of the ambient pH signaling complex in *Aspergillus nidulans*: PalH assists plasma membrane localization of PalH. *Eukar. Cell* 6:2365–2375.
- Chomczynski, P. & Sacchi, N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162, 156-159.
- Covarelli, L., Stifano, S., Beccari, G., Raggi, L., Lattanzio, VMT. & Albertini, E. 2012. Characterization of *Fusarium verticillioides* strains isolated from maize in Italy: Fumonisin production, pathogenicity and genetic variability. *Food Microbiol.* 31:17-24.
- Das, AK. & Singh, V. 2015. Antioxidative free and bound phenolic constituents in pericarp, germ and endosperm of Indian dent (*Zea mays* var. *indentata*) and flint (*Zea mays* var. *indurata*) maize. *J Funct. Foods.* 13: 363-374.
- de la Torre Hernández, ME., Vicente, MR., Greaves-Fernández, N., Cruz-Ortega, R. & Plasencia, J. 2010. Fumonisin B1 induces nuclease activation and salicylic acid accumulation through long-chain sphingoid base build-up in germinating maize. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 74: 337-345.
- de la Torre-Hernández, ME., Sánchez-Rangel, D., Galeana-Sánchez, E. & Plasencia de la Parra, J. 2014. Fumonisin -Síntesis y función en la interacción *Fusarium verticillioides*-maíz. *TIP. Revista especializada en ciencias químico- biológicas*, 17: 77-91.
- Fanelli, F., Schmidt-Heydt, M., Haidukowski, M., Susca, A., Geisen, R., Logrieco, A. & Mule, G. 2011. Influence of light on growth, conidiation and fumonisin production by *Fusarium verticillioides*. *Fungal Biol.* 116: 241-248.
- FAO. 1993. El maíz en la nutrición humana. Colección FAO: Alimentación y nutrición. Vol. 25.
- Ferreira, RB., Monteiro, S., Freitas, R., Santos, CN., Chen, Z., Batista, LM., Duarte, J., Borges, A. & Teixeira, AR. 2007. The role of plant defence proteins in fungal pathogenesis. *Mol. Plant Pathol.* 8: 677-700.

- Ferrigo, D., Raiola, A., Bogialli, S., Bortolini, C., Tapparò, A. & Causin, R. 2015. *In Vitro* Production of Fumonisins by *Fusarium verticillioides* under oxidative stress induced by H₂O₂. *J. Agric. Food Chem.* 63: 4879–4885
- Flaherty, JE. & Woloshuk CP. 2004. Regulation of Fumoinisin Biosynthesis in *Fusarium verticillioides* by a Zinc Binuclear Cluster-Type Gene, *ZFR1*. *Appl Environ Microbiol.* 70 (5): 2653-2659.
- Flaherty, JE., Pirttitlâ, A., Bluhm, H. & Woloshuk, P. 2003. *PAC1*, a pH regulatory gene from *Fusarium verticillioides*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 5222-5227.
- Franelli, F., Schmidt-Heydt, M., Haidukowski, M., Susca, A., Geisen, R., Logrieco, A. & Mule, .G. 2011. Influence of light on growth, conidiation and fumoinisin production by *Fusarium verticillioides*. *Fungal Biol.* 116: 241-248.
- Galeana Sánchez, EA. 2014. Asociación entre la producción de fumoinisina B1 y la virulencia de *Fusarium verticillioides* en plántulas de maíz. Tesis de licenciatura Q.F.B. Facultad de Química.
- Galeana-Sánchez, E., Sánchez-Rangel, D., de la Torre-Hernández, M.E., Nájera-Martínez, M. & Plasencia, J. 2017. Fumoinisin B1 produced in planta by *Fusarium verticillioides* is associated with inhibition of maize b-1,3-glucanase activity and increased aggressiveness. *Physiol Mol Plant Pathol.* 100: 75-83.
- Gao, X., Shim, WB., Göbel, C., Kunze, S., Feussner, I., Meeleer, R., Balint-Kurt,i P. & Kolomiets, M. 2007. Disruption of a maize 9-lipoxygenase result in increased resistance to fungal pathogens and reduced levels of contamination with mycotoxin fumoinisin. *Mol Plant Microbe Interact.* 20:922-933.
- Geiser, DM., Jiménez-Gasco, MM., Kang, S., Makalowska, I., Veeraraghavan, N., Ward, TJ., Zhang, N., Kuldau, GA. & O'Donnell, K. 2004. FUSARIUM-ID v. 1.0: A DNA sequence database for identifying *Fusarium*. *Eur J Plant Pathol.* 110: 473-479.
- Gessner, MO., Bauchrowitz, MA. & Escaulier, M. 1991. Extraction and quantification of ergosterol as a measure of fungal biomass in leaf litter. *Microb Ecol.* 22: 285-291.

- Gutiérrez-Nájera, N., Muñoz-Clares, RA., Palacios-Bahena, S., Ramírez, J., Sánchez Nieto, S., Plasencia, J. & Gavilanes-Ruiz M. 2005. Fumonisin B1, a sphingoid toxin, is a potent inhibitor of the plasma membrane H⁺-ATPase. *Planta*. 221:589-596.
- Harrison, LR., Colvin, BM., Greene, JT., Newman, LE. & Cole, JR. Jr. 1990. Pulmonary edema and hydrothorax in swine produced by fumonisin B1, a toxic metabolite of *Fusarium moniliforme*. *J. Vet Diagn Invest* 2:217-221.
- Hempel, J. & Bohm, H. 1996. Quality and quantity of prevailing flavonoid glycosides of yellow and green french beans (*Phaseolus vulgaris* L). *J Agric. Food Chem.* 44(8):2114-2116.
- Herrmann, KM. 1995. The shikimate pathway: Early steps in the biosynthesis of aromatic compounds. *Plant Cell* 7: 907-919.
- Hopwood, DA. 2004. Cracking the polyketide code. *PLoS biology*, 2(2), E35. doi:10.1371/journal.pbio.0020035
- Howard, PC., Eppley, RM., Stack, ME., Warbritton, A., Voss, KA., Lorentzen, RJ., Kovach, RM. & Bucci, TJ. 2001. Fumonisin B1 carcinogenicity in a two-year feeding study using F344 rats and B6C3F1 mice. *Environ Health Perspec.* 109 (Suppl. 2): 277- 282.
- Hu, LB., Zhang, T., Yang, ZM., Zhou, W. & Shi, ZQ. 2008. Inhibition of fengycins on the production of fumonisin B1 from *Fusarium verticillioides*. *Lett Appl Microbiol* 48: 84-89.
- Huffman, J., Gerber, R. & Du, L. 2010. Recent Advancements in the biosynthetic mechanisms for polyketide-derived mycotoxins. *Biopolymers* 93:764-776. *J. Agric. Food Chem.* 51: 2866-2887.
- Jiménez, M., Mateo, JJ., Hinojo, MJ. & Mateo, R. 2003. Sugars and amino acids as factors affecting the synthesis of fumonisins in liquid cultures by isolates of the *Gibberella fujikuroi* complex. *Int J Food Microbiol.* 89:185–93.
- Jouany, JP. 2007. Methods for preventing, decontaminating and minimizing the toxicity of mycotoxins in feeds. *Animal Feed Sci. Technol.* 137: 342-362.
- Jurado, M., Marín, P., Magan, N. & González-Jaén, MT. 2008. Relationship between solute, matric potential stress, temperature, growth, and FUM1 gene expression in two *Fusarium verticillioides* strains from Spain. *Appl Environ Microbiol.* 74: 2032–36.

- Kâhkönen, MP., Hopia, AI., Vuorela, HJ., Rauha, JP., Pihlaja, K., Kujala, TS. & Heinonen, M. 1999. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem.* 47: 3954-3962.
- Kedera, CJ., Leslie, JF. & Claflin, LE. 1994. Genetic diversity of *Fusarium* Section *Liseola* (*Gibberella fujikuroi*) in individual maize stalks. *Phytopathology* 84: 603-607
- Keller, NP. & Hohn, TM. 1997. Metabolic pathway gene clusters in filamentous fungi. *Fung. Genet. Biol.* 21: 17–29.
- Keller, SE., Sullivan, TM. & Chirtel, S. 1997. Factors affecting the growth of *Fusarium proliferatum* and the production of fumonisin B1: oxygen and pH. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 19: 305–09.
- Kim, JH. & Woloshuk, CP. 2008. Role of AREA, a regulator of nitrogen metabolism, during colonization of maize kernels and fumonisin biosynthesis in *Fusarium verticillioides*. *Fungal Genet. Biol.* 45: 947-953.
- Kim, JH., Yu, J., Mahoney, N., Chan, KL., Molyneux, RJ., Varga, J., Bhatnagar, D., Cleveland, TE., Nierman, WC. & Campbell, BC. 2007. Elucidation of the functional genomics of antioxidant-based inhibition of aflatoxin biosynthesis. *Int J Food Microbiol.* 122: 49–60.
- Leslie, JF., Summerell, BA. & Bullock S. 2006. *The Fusarium Laboratory Manual*. Blackwell Publishing.
- López-Martínez, L., Oliart-Ros, RM., Valerio-Alfaro, G. & Lee, CH. 2009. Antioxidant activity, phenolic compounds and anthocyanins content of eighteen strains of Mexican maize. *Food Sci. Technol.* 42: 1187-1192.
- Magan N & Aldred D. 2007. Post-harvest control strategies: Minimizing mycotoxins in the food chain. *Int J Food Microbiol.* 119: 131-139.
- Marín S, Magan N, Bell N, Ramos AJ, Canela R, Sanchis V. 1999. Two-dimensional profiles of fumonisin B1 production by *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* in relation to environmental factors and potential for modeling toxin formation in maize grain. *Int J Food Microbiol.* 51: 159-67.

- Martínez Fraca, F.J. 2017. Efecto del ácido ferúlico sobre la biosíntesis de fumonisina B1 y la expresión de los genes del locus FUM de *Fusarium verticillioides*. Tesis de licenciatura Q.F.B. Facultad de Química. UNAM.
- Marzluf, G.A., 1997. Genetic regulation of nitrogen metabolism in the fungi. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61, 17–32.
- Merrill, AH., Liotta, DC. & Riley, RT. 1996. Fumonisin: fungal toxins that shed light on sphingolipid function. *Trends Cell Biol.* 6:218–223.
- Mihlan, M., Homann, V., Liu, TW. & Tudzynski, B. 2003. AREA directly mediates nitrogen regulation of gibberellin biosynthesis in *Gibberella fujikuroi*, but its activity is not affected by NMR. *Mol. Microbiol.* 47, 975–991.
- Montis, V., Pasqualo, M., Visentin, I., Karlovsky, P. & Cardinale, F. 2013. Identification of a cis-acting factor modulating the transcription of *FUM1*, a key fumonisina- biosynthetic gene in the fungal maize pathogen *Fusarium verticillioides*. *Fungal Genet. Biol.* 51: 42-49.
- Munkvold, GP., McGee, DC. & Cariton, WM. 1997. Importance of different pathways for maize kernel infection by *Fusarium moniliforme*. *Phytopathology* 87: 209-217.
- Murillo, I., Cavallarin, L. & San Segundo, B. 1999. Cytology of infection of maize seedlings by *Fusarium verticillioides* and immunolocalization of the pathogenesis-related PRms protein. *Phytopathology.* 89, 737-747.
- Myung, K., Li, S., Butchko, R., Busman, M., Proctor, RH., Abbas, HK. & Calvo, AM. 2009. FvVE1 regulates biosynthesis of the mycotoxins fumonisins and fusarins in *Fusarium verticillioides*. *J. Agric. Food Chem.* 57, 5087–5094.
- Nelson PE 1992. Taxonomy and biology of *Fusarium moniliforme*. *Mycopathologia* 117: 29-36
- Nelson, PE., Dignani, MC. & Anaissie, E.1994. Taxonomy, Biology and Clinical aspects of *Fusarium* species. *Plant Pathol.* 7:479-501.
- Nelson, PE., Toussoun, TA. & Marasas WOF. 1983. *Fusarium* species, an illustrated manual for identification. The Pennsylvania State. University Press: University Park. PA.

- Niu, C., Payne, GA. & Woloshuk. 2017. Involvement of FST1 from *Fusarium verticillioides* in virulence and transport of inositol. *Molecular Plant Pathology*. 18(5), 695–707
- Ochoa-Alejo, N, & Gómez-Peralta, J. 1993. Activity of enzymes involved in capsaicin biosynthesis in callus tissue and fruits of chili pepper (*Capsicum annum L.*). *J. Plant Physiol*. 141:147-152.
- Peñalva, MA. & Arst, HN Jr. 2002. Regulation of gene expression by ambient pH in filamentous fungi and yeasts. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66:426–446.
- Peñalva, MA., Tilburn, J., Bignell, E. & Arst, HN Jr. 2008. Ambient pH gene regulation in fungi: making connections. *Trends Microbiol.* 16:298–300.
- Picot, A., Atanasova-Pénichon, V., Pons, S., Marchegay, G., Barreau, C., Pinson-Gadais, L., Roucolle, J., Daveau, F., Caron, D. & Richard-Forget, F. 2013. Maize kernel antioxidants and their potential involvement in fusarium ear rot resistance. *J. Agric. Food Chem.* 61: 3389–3395.
- Picot, A., Barreau, C., Pinson-Gadais, L., Caron, D., Lannou, C. & Richard-Forget, F. 2010. Factors of the *Fusarium verticillioides* maize environment modulating fumonisin production. *Crit. Rev. Microbiol*; 36(3): 221–231
- Ponts, N., Pinson-Gadais, L., Barreau, C., Richard-Forget, F. & Ouellet T. 2007. Exogenous H₂O₂ and catalase treatments interfere with Tri genes expression in liquid cultures of *Fusarium graminearum*. *FEBS Letters*. 581: 443-447.
- Ponts, N., Pinson-Gadais, L., Verdal-Bonnin, MN., Barreau, C. & Richard-Forget, F. 2006. Accumulation of deoxynivalenol and its 15-acetylated form is significantly modulated by oxidative stress in liquid cultures of *Fusarium graminearum*. *FEMS Microbiol. Lett.* 258: 102–107.
- Proctor, RH., Brown, DW., Plattner, RD. & Desjardins, AE. 2003. Co-expression of 15 contiguous genes delineates a fumonisin biosynthetic gene cluster in *Gibberella moniliformis*. *Fungal Genet. Biol.* 38: 237-249.
- Proctor, RH., Desjardins, AE., Plattner, RD. & Hohn TM. 1999. A poliketide synthase gene required for biosynthesis of fumonisin mycotoxins in *Gibberella fujikuroi* mating population A. *Fungal Genet. Biol.* 27: 100-112.

- Proctor, RH., Van Hove, F., Susca, A., Stea, G., Busman, M., Van der Lee, T., Waalwijk, C., Moretti, A. & Ward, TJ. 2013. Birth, death and horizontal transfer of the fumonisin biosynthetic gene cluster during the evolutionary diversification of *Fusarium*. *Mol Microbiol* 90(2):290–306.
- Reynoso, MM., Torres, AM., Ramirez, ML., Ramirez, ML. & Rodríguez, M. 2002. Efficacy of antioxidant mixtures on growth, fumonisin production and hydrolytic enzyme production by *Fusarium verticillioides* and *F. proliferatum* in vitro on maize-based media. *Mycol Res.* 106: 1093–99.
- Rheeder, JP., Marasas, WFO. & Vismer, HF. 2002. Production of Fumonisin Analogs by *Fusarium* Species. *Appl Environ Microbiol.* 68 (5): 2101-2105.
- Robbins, R.J. 2003. Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. *J Agric Food Chem*, 51 10, 2866-87.
- Rösler, SM., Sieber, CM. & Humpf, HU. 2016. Interplay between pathway-specific and global regulation of the fumonisin gene cluster in the rice pathogen *Fusarium fujikuroi*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 100: 5869-5882.
- Sampietro, DA., Vattuone, MA., Presello, DA., Fauguel, CM. & Catalán, CAN. 2009. The pericarp and its surface wax layer in maize kernels as resistance factors to fumonisin accumulation by *Fusarium verticillioides*. *Crop Protect.* 28:196- 200.
- Sánchez-Rangel, D., Sánchez-Nieto, S. & Plasencia, J. 2012. Fumonisin B1, a toxin produced by *Fusarium verticillioides*, modulates maize β -1,3-glucanase activities involved in defense response. *Planta.* 235: 965-978.
- Sánchez-Rangel, D., SanJuan-Badillo, A. & Plasencia, J. 2005. Fumonisin production by *Fusarium verticillioides* strains isolated from maize in México and development of a polymerase chain reaction to detect potential toxigenic strains in grains. *J. Agric. Food Chem.* 53, 8565-8571.
- Seigler, DS. 1997. *Plant Secondary Metabolism.* Kluwer Academic Publishers.
- Seo, J., Proctor, RH. & Plattner, RD. 2001. Characterization of four clustered and coregulated genes associated with fumonisin biosynthesis in *Fusarium verticillioides*. *Fungal Genet Biol.* 34: 155-165.

- Shim, WB, & Woloshuk, CP. 1999. Nitrogen repression of fumonisin B1 biosynthesis in *Gibberella fujikuroi*. FEMS Microbiol Lett. 177:109–16.
- Shim, WB. & Woloshuk, CP. 2001. Regulation of Fumonisin B1 Biosynthesis and Conidiation in *Fusarium verticillioides* by a Cyclin-Like (C-Type) Gene, FCC1. Appl Environ Microbiol. 67 (4): 1607-1612.
- Shim, WB., Flaherty, JE. & Woloshuk, CP. 2003. Comparison of fumonisin b1 biosynthesis in maize germ and degermed kernels by *Fusarium verticillioides*. J. Food Prot. 66 (11): 2116-2122.
- Sydenham, EW., Shepard, GS., Thiel, PG., Stockenstrom, S., Snijman, PW. & Van Schalkwyk, DJ. 1992. Liquid chromatographic determination of fumonisins B1, B2 and B3 in foods and feeds. J. AOAC Int. 75, 313-316.
- Sydenham, EW., Thiel, PG., Marasas, WF., Shephard, GS., Van Shalkwyk, DJ. & Koch, KR. 1992. Natural occurrence of some *Fusarium* mycotoxins in corn from low and high esophageal cancer prevalence areas of the Transkei, Southern Africa. J. Agric. Food Chem. 38: 1900-1903.
- Todd, RB. & Andrianopoulos, A. 1997. Evolution of a fungal regulatory gene family: the Zn(ii)₂Cys₆ binuclear cluster DNA binding motif. Fungal Genet Biol. 21: 388-405.
- Tudzynski, B., Mende, K., Weltring, KM., Kinghorn, JR. & Unkles, SE. 1996. The *Gibberella fujikuroi* *niaD* gene encoding nitrate reductase: isolation, sequence, homologous transformation and electrophoretic karyotype location. Microbiology 142, 533–539.
- Uhlig, S., Busman, M., Shane, DS., Ronning, H., Rise, F. & Proctor, RH. 2012. Identification of early fumonisin biosynthetic intermediates by inactivation of the *FUM6* gene in *Fusarium verticillioides*. J Agric. Food Chem. 60: 10293-10301.
- Vinsentin, I., Montis, V., Doll, K., Alabouvette, C., Tamietti, G., Karlovsky, P. & Cardinale, F. 2012. Transcription of genes in the biosynthetic pathway of fumonisin mycotoxins is epigenetically and differentially regulated in the fungal maize pathogen *Fusarium verticillioides*. Eukar. Cell. 11 (3): 252-259.

- Wang, E., Norred, WP., Tocino, CW., Riley, RT. & Merrill, AH Jr. 1991. Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins—implications for diseases associated with *Fusarium moniliforme*. J. Biol. Chem. 266:14486– 14490.
- Yang Y., Shah, J. & Klessig, DF. 1997. Signal perception and transduction in plant defense responses. Genes Dev. 11: 1621-1639.
- Yu, JH. & Keller, N. 2005. Regulation of secondary metabolism in filamentous fungi. Annu Rev Phytopathol. 43: 437–58.

Referencias electrónicas

- SAGARPA. <https://www.gob.mx/sagarpa/prensa/fortalece-mexico-autosuficiencia-en-la-produccion-de-maiz-blanco> visto última vez 19/11/2018
- INEGI. 2019. Datos. Agricultura, ganadería y pesca. Agricultura. (inegi.org.mx)

XII. ANEXO DE MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de solución de sales 10X para medio GYAM

Para preparar 100 mL de la solución de sales 10X se pesaron 1.3 g de cloruro de calcio (CaCl_2) y se disolvieron en 60 mL de agua. Se pesaron 766 mg de fosfato dibásico de potasio (K_2HPO_4) y se disuelven en 30 mL de agua. Una vez disueltas ambas soluciones se mezclaron bajo agitación constante. Se añadieron 493 mg de sulfato de magnesio (MgSO_4), y se agitó hasta disolver. A esta solución se añadieron 99 mg de cloruro de sodio (NaCl) y 10 mL de agua. Se mezclaron bien todos los componentes y se esterilizaron por 20 min a 1.2 kg/cm^2 y 120°C . La composición de esta solución de sales se muestra en la tabla TM1 (Bojja et al. 2004).

TM1. Composición de sales en Stock y en medio GYAM.

Compuesto	Concentración en Stock	Concentración en medio GYAM
CaCl_2	88 mM	8.8 mM
K_2HPO_4	44 mM	4.4 mM
MgSO_4	20 mM	2.0 mM
NaCl	17 mM	1.7 mM

Preparación de la solución de L-asparagina (40 mM)

Para preparar 100 mL de solución de L-asparagina se pesaron 0.6 g de asparagina y se disolvieron en 100 mL de agua desionizada estéril, se mezcló bien. La solución se filtró a través de una membrana Millipore $0.22 \mu\text{m}$ estéril, y se almacenó en un frasco estéril.

Preparación del amortiguador de fosfatos 50 mM de fase móvil de HPLC.

Para preparar 1 litro de amortiguador se pesaron 6.9 g de fosfato monobásico de sodio monohidratado ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \bullet \text{H}_2\text{O}$) y se disolvieron en 1 litro de agua. Se ajustó el pH a 3 con 1 mL de ácido fosfórico

Preparación de la fase móvil metanol – amortiguador de fosfatos 50mM (70:30)

Se mezclaron 300 mL de buffer de fosfatos y 700 mL de metanol grado HPLC, con agitación constante y se añadieron 3 mL de ácido fosfórico, y se verificó el pH = 3. La fase móvil se filtró a través de una membrana de nitrocelulosa de 0.22 μm y se sonicó por 20 min antes de usar.

Preparación de amortiguador de boratos 50 mM, pH 9.7

Se pesó 1.9 g de tetraborato de sodio ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \bullet 10\text{H}_2\text{O}$) y se disolvió en 89 mL de agua. Se ajustó a pH a 9.7 con NaOH 1M y se aforó a 100 mL.

Preparación del solución de OPA 7.45 mM (o-ftaldialdehído)

Se pesaron 2 mg de OPA y se disolvieron en 400 μL de metanol grado HPLC. Se diluyó con 2 mL de amortiguador de boratos (50 mM pH 9.7) y se añadieron 3 μL de β -mercaptoetanol. Se mezcló bien la solución en vórtex y se almacena a 4°C o en baño de hielo para utilizar únicamente el día de la preparación.

Preparación de los estándares de FB1 con OPA

TM2. Preparación de los estándares de FB1 para la curva de calibración

Estándar	Muestra (μL)	OPA (μL)	ACN:H ₂ O (1:1) (μL)	Picogramos de FB1 en 20 μL
Blanco	10 ACN:H ₂ O	25	465	0
9 $\mu\text{g/mL}$	10	25	465	18
18 $\mu\text{g/mL}$	10	25	465	36
36 $\mu\text{g/mL}$	10	25	465	72
54 $\mu\text{g/mL}$	10	25	465	108

Preparación del buffer TAE (Tris-Ácido acético-EDTA) 50x

Para preparar 100 mL de TAE 50X se pesaron 24.2 g de TRIS SIGMA BASE y 3.7 g de ácido etilendiaminotetraacético dihidratado de sodio ($\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$). Se disolvieron en 50 mL de agua. Se añadieron 5.7 mL de ácido acético glacial y 5.5 mL de HCl concentrado hasta tener un pH final de 8.0. Se aforó a 100 mL con agua.

Preparación de los estándares de ácido ferúlico (AF)

A partir de una solución inicial de AF (1 mg/mL), se prepararon diluciones como indica la tabla TM3.

TM3. Preparación de los estándares de AF para la curva de calibración

Estándar	Muestra (μL)	MetOH-H ₂ O (1:1) μL	Nanogramos de AF en 20 μL
Blanco	0	20	0
10 $\mu\text{g/mL}$	100 (stock 1mg/mL)	9.9 mL	200
5 $\mu\text{g/mL}$	500	500	100
2.5 $\mu\text{g/mL}$	500	500	50
1.25 $\mu\text{g/mL}$	500	500	25
0.625 $\mu\text{g/mL}$	500	500	12.5

XIII. ANEXO DE RESULTADOS

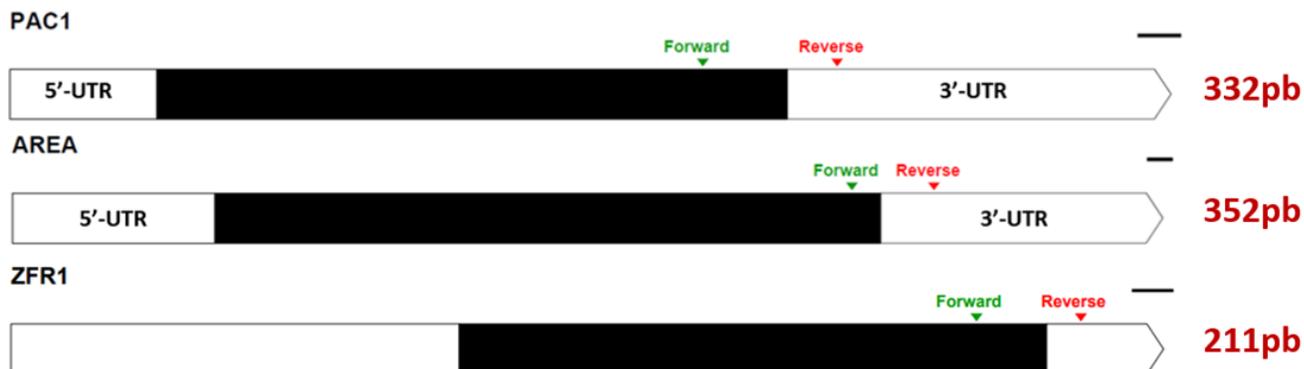


Figura R1. Esquema de las regiones seleccionadas para el diseño de los oligonucleótidos de los genes reguladores y su producto de amplificación. Se tomó parte de la región codificadora y UTR del extremo 3' en los genes *PAC1*, *AREA* y *ZFR1*. (Esquemas realizados con wormweb.com)

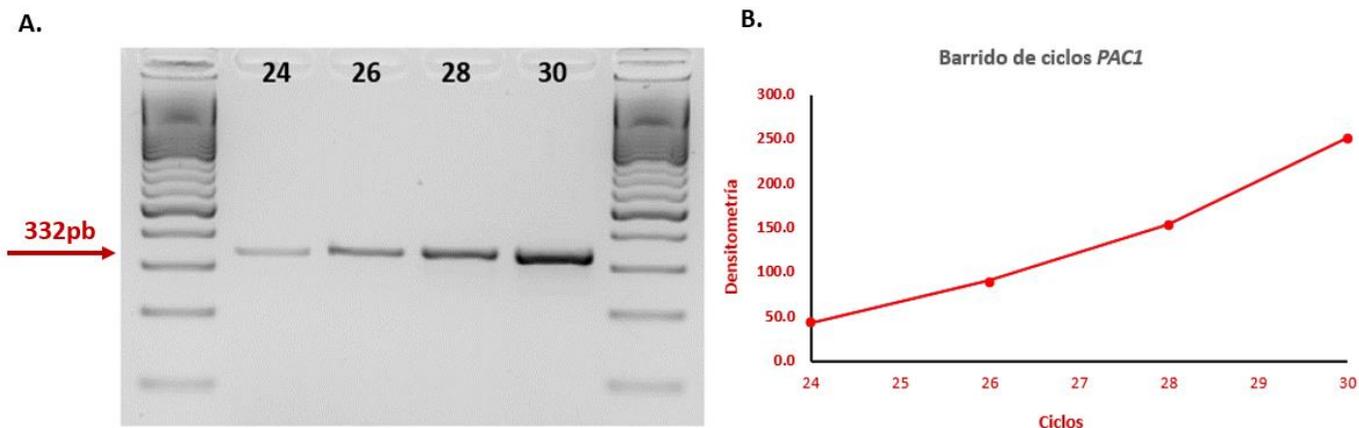


Figura R2. Barrido de ciclos para amplificar el gen *PAC1*. A. Electroforesis horizontal. Condiciones de amplificación: concentración oligonucleótidos, 0.3 μ M; Temperatura de alineamiento, 60°C; número de ciclos, 24, 26, 28 y 30; producto, 332pb. B. Gráfica de densitometría del barrido de ciclos. Se seleccionó el punto de 26 ciclos de la parte exponencial de la gráfica como el número de ciclos adecuado para el análisis de la expresión de este gen.

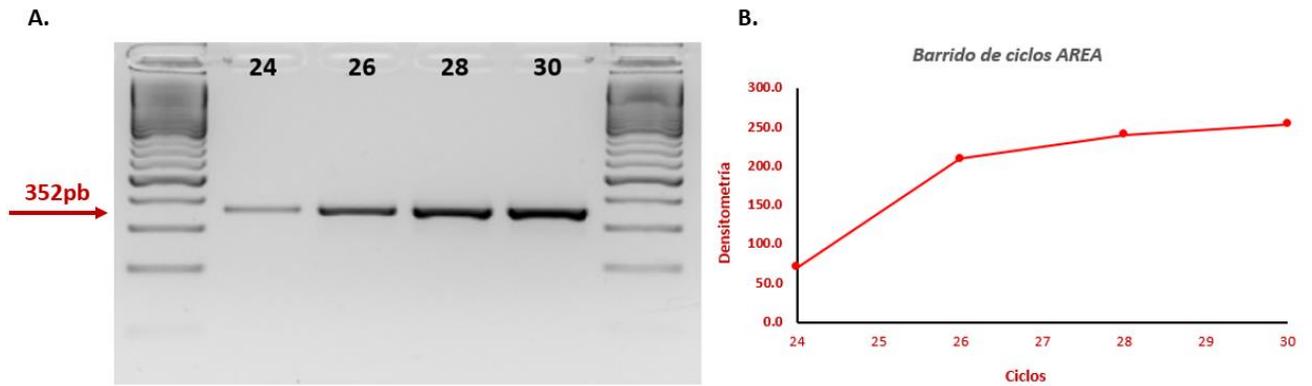


Figura R3. Barrido de ciclos para amplificar el gen *AREA*. **A. Electroforesis horizontal.** Condiciones de amplificación: concentración oligonucleótidos, 0.3 μ M; Temperatura de alineamiento, 60°C; número de ciclos, 24, 26, 28 y 30; producto, 352pb. **B. Gráfica de densitometría del barrido de ciclos.** Se seleccionó el punto de 26 ciclos de la parte exponencial de la gráfica como el número de ciclos adecuado para el análisis de la expresión de este gen.

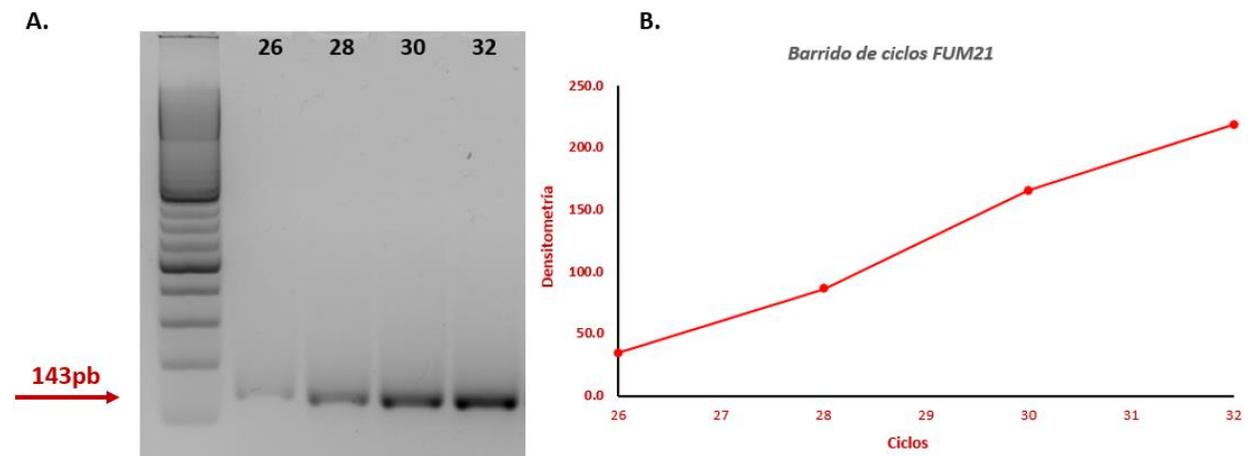


Figura R4. Barrido de ciclos para amplificar el gen *FUM21*. **A. Electroforesis horizontal.** Condiciones de amplificación: concentración oligonucleótidos, 1.8 μ M; Temperatura de alineamiento, 55°C; número de ciclos, 26, 28, 30 y 32; producto, 143pb. **B. Gráfica de densitometría del barrido de ciclos.** Se seleccionó el punto de 28 ciclos para el análisis.

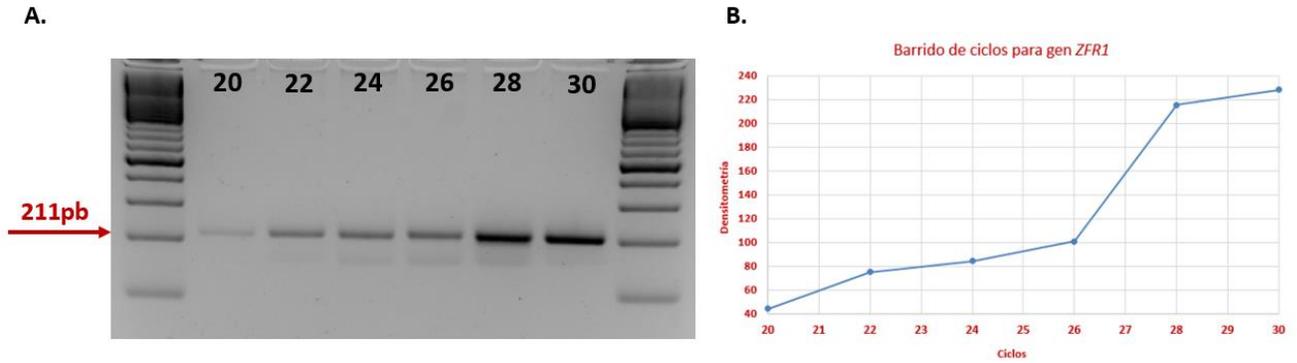


Figura R5. Barrido de ciclos para amplificar el gen *ZFR1*. **A. Electroforesis horizontal.** Condiciones de amplificación: concentración oligonucleótidos, 0.6 μ M; Temperatura de alineamiento, 60°C; número de ciclos, 32, 34, 36 y 38; producto, 365pb. Se observa una ligera banda de amplificación a los 32 ciclos, a los 34 ciclos se observa una banda del posible producto de amplificación correspondiente a *ZFR1* pero se presenta una banda de un subproducto, a los ciclos 36 y 38 no se observan subproductos. **B. Gráfica de densitometría del barrido de ciclos.** Se seleccionó el punto de 36 ciclos de la parte exponencial de la gráfica como el posible número de ciclos adecuado para el análisis de la expresión de este gen sin embargo aún se ajustarán las condiciones para eliminar los subproductos de la amplificación.

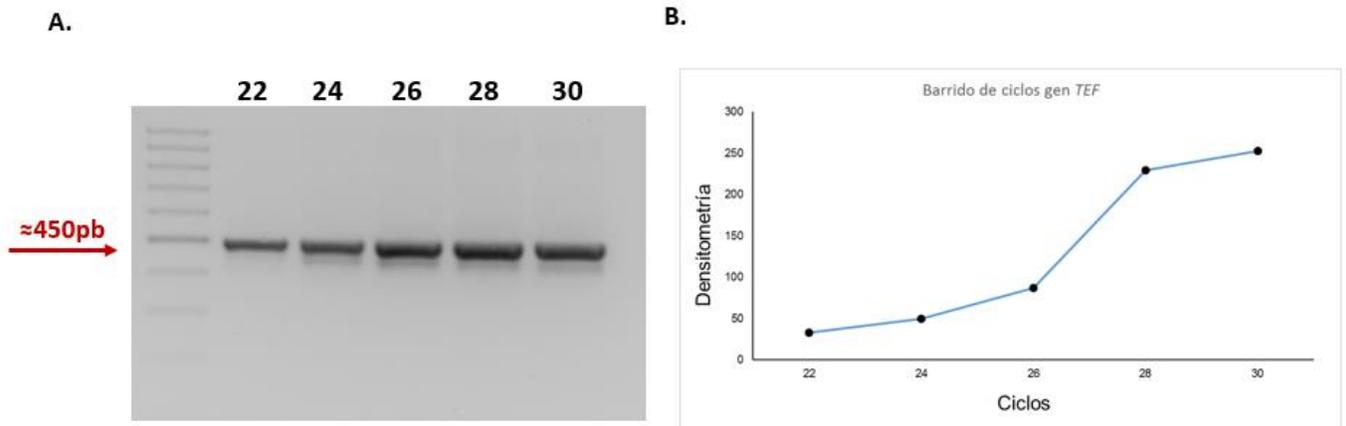


Figura R6. Barrido de ciclos para amplificar el gen *TEF*. **A. Electroforesis horizontal.** Condiciones de amplificación: concentración oligonucleótidos, 1.8 μ M; Temperatura de alineamiento, 55°C; número de ciclos, 26, 28, 30 y 32; producto, 143pb. **B. Gráfica de densitometría del barrido de ciclos.** Se seleccionó el punto de 28 ciclos de la parte exponencial de la gráfica como el número de ciclos adecuado para el análisis de la expresión de este gen.

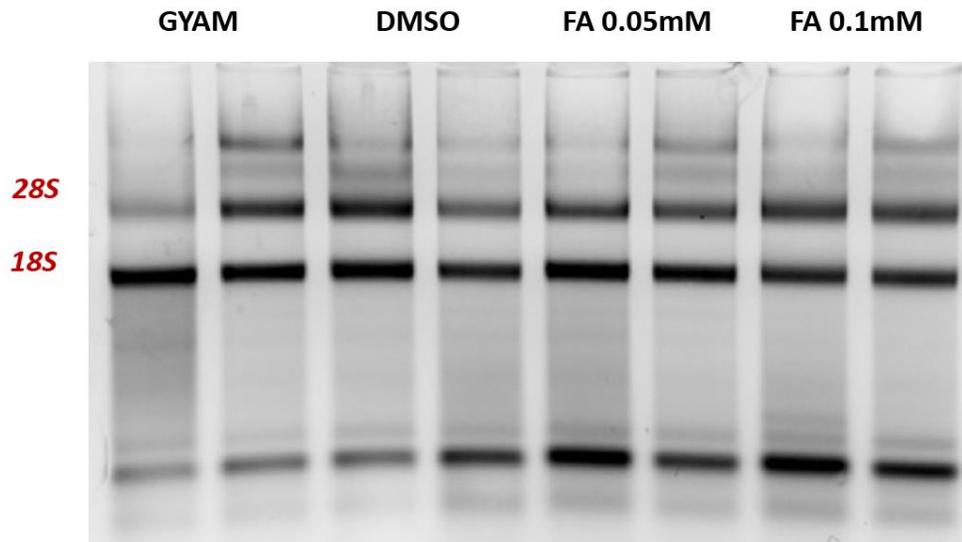


Figura R7. Electroforesis horizontal de RNA total obtenido de micelio de *F. verticillioides* cultivado en medio GYAM suplementado con ácido ferúlico a concentraciones de 0.05mM y 0.1mM. Las flechas indican las bandas correspondientes a los RNAr 18S y 28S.

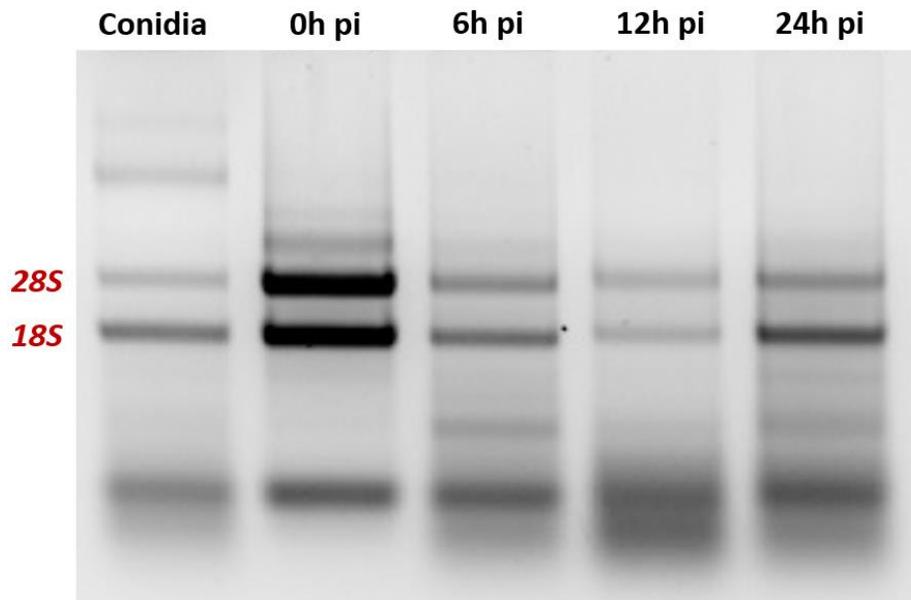


Figura R8. Electroforesis horizontal de la extracción de RNA total de *F. verticillioides* que colonizó semillas de maíz Chalqueño. Se muestran muestras por duplicado de 24 h, 48 h y 72 h postinoculación.

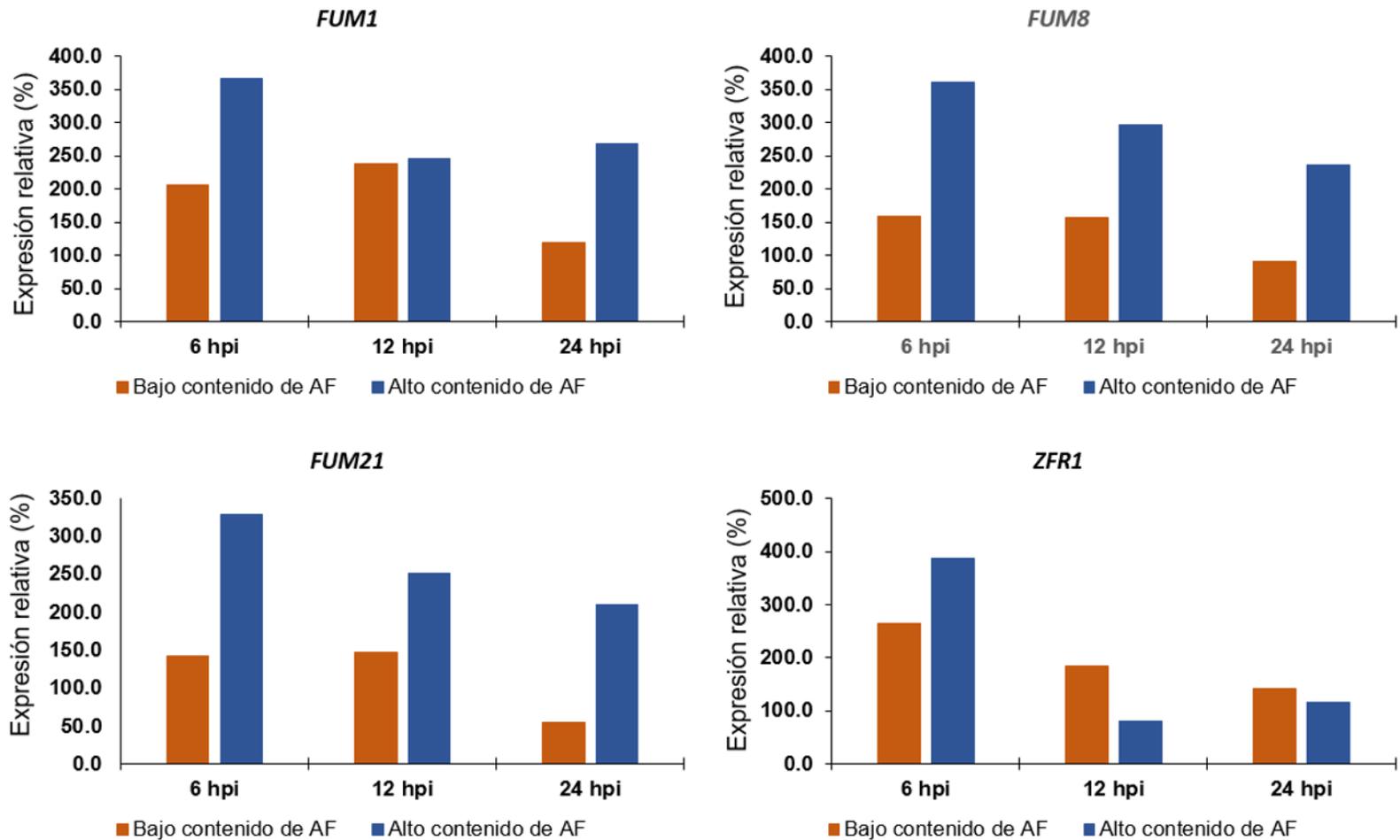


Figura R9. Niveles de trascritos de los genes *FUM* y *ZFR1* expresados en los genotipos de maíz con alto y bajo contenido de AF. Se muestra los niveles de expresión relativa de cada gen en los distintos genotipos de maíz a las 6 ,12 y 24 hpi.