



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**PRODUCCIÓN DE GLICOHIDROLASAS EN CEPAS DE
FUSARIUM VERTICILLIOIDES Y SU ASOCIACIÓN CON LA
VIRULENCIA EN MAÍZ**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA DE ALIMENTOS
PRESENTA**

ARELY MARTÍNEZ TORRES



CD. MX.

2020



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: Profesor: AMELIA MARIA DE GUADALUPE FARRES
GONZALEZ SARABIA**

VOCAL: Profesor: CARMEN ADRIANA MENDOZA RODRIGUEZ

**SECRETARIO: Profesor: FRANCISCO JAVIER PLASENCIA DE LA
PARRA**

1ER SUPLENTE: Profesor: VERONICA DOMINGUEZ VALDEZ

2DO SUPLENTE: Profesor: FRANCISCA MORAYNA GUTIERREZ LUNA

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

LABORATORIO 101, CONJUNTO E, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

**CON EL APOYO DEL PROYECTO DGAPA-PAPIIT IN213517,
COMUNICACIÓN MOLECULAR EN LA INTERACCIÓN *FUSARIUM*
*VERTICILLIOIDES-MAÍZ***

ASESOR DEL TEMA:

FRANCISCO JAVIER PLASENCIA DE LA PARRA

SUSTENTANTE:

ARELY MARTINEZ TORRES

AGRADECIMIENTOS

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

Arely Martínez Torres recibió una beca (conclusión de estudios) y una beca (tesis) del proyecto DGAPA-PAPIIT IN213517 durante el desarrollo de este trabajo.

Se agradece el apoyo del Programa PAIP (5000-9121) de la Facultad de Química de la UNAM.

Se agradece el apoyo de la Q. Laurel Fabila Ibarra en la asesoría y manejo del equipo de liofilización.

ABREVIATURAS

ACN = acetonitrilo	FAO = organización de las naciones unidas para la alimentación y agricultura (Food and Agriculture Organization)
ANOVA = análisis de varianza	FB1 = fumonisina B1
AP = apiogalacturonano	F.D. = factor de dilución
AS = ácido salicílico	GalA = ácido galacturónico
BCL = bases esfingoides de cadena larga	GAX = glucuronoarabinosilano
BSA = albúmina sérica bovina	GFP = proteína verde fluorescente (green fluorescent protein)
Brx = blanco de reacción enzimática	GH = glicohidrolasas
CAZy = base de datos de enzimas activas de carbohidratos (carbohydrate-active enzymes)	GlcA = ácido glucurónico
CBM = modulador de unión a Carbohidratos	GYAM = glucosa extracto de levadura asparagina ácido málico
CCF = cromatografía en capa fina	HG = homogalacturonano
CE = carbohidrato esterasas	HPLC = cromatografía de líquidos de alta resolución
CLA = agar hojas de clavel (carnation leaf agar)	kbp = kilopares de bases
CTAB = bromuro de cetiltrimetilamonio (cetyl trimethyl ammonium bromide)	mg = miligramo
CWDE = enzimas degradadoras de pared celular (cell-wall degrading enzyme)	mL = mililitro
DCPA = agar peptona cloranfenicol dicloro (dichloran chloramphenicol peptone agar)	mM = milimolar
DE = desviación estándar	msnm = metros sobre el nivel del mar
DNS = ácido 3,5-dinitrosalicílico	ng = nanogramos
dpi = días post-inoculación	nm = nanómetros
EDTA = sal disódica del ácido etilendinitro tetraácético	OPA = o-ftaldialdehído
ESN = esfinganina	PDA = agar papa dextrosa
	PG = poligalacturonasa
	PL = polisacárido liasa
	PSN = fitoesfinganina
	PVP = polivinilpirrolidona

RBB-xilano= remazol azul brillante-xilano (remazol brilliant blue-xylan)

Rf= factor de retención

RG-I= ramnogalacturonano tipo I

RG-II= ramnogalacturonano tipo II

rpm= revoluciones por minuto

SAM= micotoxina análoga a esfinganina

TSP= tartrato de sodio y potasio

UV= ultravioleta

X= diámetro de crecimiento en fase exponencial

XGA= xilogalacturonano

μ = velocidad específica de crecimiento

μg = microgramo

μL = microlitro

λ = longitud de onda

	Página
I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCIÓN	2
A. <i>Fusarium verticillioides</i> como patógeno del maíz	2
1. Características generales de <i>Fusarium verticillioides</i>	4
a. Descubrimiento y descripción de la especie.	4
b. Morfología y características coloniales	5
2. Factores que permiten la penetración y colonización a los tejidos de maíz	9
a. En semillas y plántulas de maíz.	9
b. Durante el desarrollo de la plántula	10
c. El daño mecánico.	13
d. Factores ambientales	14
B. Fumonisina B1	15
1. Estructura de las Fumonisinias	15
2. Biosíntesis de Fumonisina B1	16
3. Blancos de la fumonisina B1 en los tejidos de maíz	19
a. Inhibición de la esfinganina <i>N</i> -acil transferasa	19
b. Inhibición de la ATPasa de H ⁺ de membrana plasmática	19
c. Inhibición de β-1,3-glucanasas	20
4. Función de la fumonisina B1 en la virulencia de <i>F. verticillioides</i>	21
C. Estructura de la pared celular vegetal y su degradación por glicohidrolasas.	22
1. Tipos de pared celular vegetal y composición	23
a. Celulosa	26
b. Hemicelulosa: GAXs (Glucuronoarabinosilanos)	27
c. Polisacáridos pécticos	28
2. Degradación enzimática de la pared celular como mecanismo de colonización	31
a. Patógenos biotrofos	33
b. Patógenos hemibiotrofos y necrótrofos.	33
3. Producción y características de glicohidrolasas por el género <i>Fusarium</i>	33
a. Identidad de glicohidrolasas producidas por <i>Fusarium</i>	33
b. Regulación de glicohidrolasas	36
c. Proceso de inducción y secreción.	39

d. Presencia y actividad de glicohidrolasas en tejido vegetal.	41
III. ANTECEDENTES	43
IV. HIPÓTESIS	46
V. OBJETIVOS GENERALES Y PARTICULARES	46
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	47
A. Material biológico: cepas de <i>Fusarium verticillioides</i> y <i>Fusarium oxysporum</i>	47
1. Preparación del medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (PDA) para las cepas de <i>Fusarium spp.</i>	47
2. Crecimiento de <i>Fusarium spp</i>	47
3. Preparación del inoculo y conteo de conidios.	47
B. Evaluación de la actividad de glicohidrolasas en cepas de <i>Fusarium spp</i>	48
1. Crecimiento de cepas de <i>Fusarium spp</i> en agar con diferentes fuentes de carbono.	48
2. Evaluación de la actividad de glicohidrolasas en cepas de <i>Fusarium spp</i> en medio sólido.	49
3. Ensayos de actividad de glicohidrolasas en proteína intracelular de cepas de <i>Fusarium spp</i> crecidas en medio líquido con glucosa como fuente de carbono.	49
a. Medio de cultivo	49
b. Condiciones de incubación	50
c. Extracción de proteína intracelular	50
d. Cuantificación de proteína por el método de Bradford	50
e. Determinación de la actividad enzimática específica de celulasas y pectinasas por el método de DNS	51
4. Ensayos de actividad de glicohidrolasas en cepas de <i>Fusarium spp</i> en medio líquido suplementado con distintas fuentes de carbono	51
a. Medios de cultivo	51
b. Condiciones de incubación	52
c. Obtención de enzimas extracelulares	52
d. Determinación de la actividad enzimática específica de celulasas, pectinasas y xilanasas	53
C. Relación de los factores de virulencia en <i>Fusarium verticillioides</i>	54
1. Efecto de la fuente de carbono en la producción de fumonisina B1 en <i>Fusarium verticillioides</i> , cepa MY3	54
a. Medios de Cultivo	54
b. Condiciones de incubación	55
c. Cuantificación de FB1 en medios suplementados con diferentes fuentes de carbono mediante HPLC	55

d. Preparación de la curva patrón y las muestras	56
e. Condiciones de análisis	57
2. Efecto de la fumonisina B1 en la producción de la actividad pectinolítica en <i>Fusarium verticillioides</i> , cepa MY3	57
a. Medio de cultivo	57
b. Condiciones de incubación y procesamiento de la muestra	58
VII. RESULTADOS	59
A. Evaluación de la actividad de glicohidrolasas en cepas de <i>Fusarium verticillioides</i>	59
1. Crecimiento de cepas de <i>Fusarium spp</i> en agar con diferentes fuentes de carbono.	59
2. Evaluación de la actividad de glicohidrolasas en cepas de <i>Fusarium spp</i> en medio sólido.	64
3. Ensayos de actividad de glicohidrolasas en proteína intracelular de cepas de <i>Fusarium spp</i> , en medio líquido con glucosa como fuente de carbono.	66
4. Ensayos de actividad de glicohidrolasas en cepas de <i>Fusarium spp</i> en medio líquido suplementado con distintas fuentes de carbono.	67
B. Relación de los factores de virulencia en <i>Fusarium verticillioides</i>	70
1. Efecto de la fuente de carbono en la producción de fumonisina B1 en <i>Fusarium verticillioides</i> , cepa MY3.	70
2. Efecto de la fumonisina B1 en la producción de la actividad pectinolítica en <i>Fusarium verticillioides</i> , cepa MY3.	71
VIII. DISCUSIÓN	73
A. Evaluación de la actividad de glicohidrolasas	73
1. Utilización de los polisacáridos en el medio de cultivo.	73
2. Actividad enzimática de glicohidrolasas en <i>Fusarium spp</i> .	77
B. Relación de los diferentes factores de virulencia en <i>Fusarium verticillioides</i>	79
1. Efecto de la fuente de carbono en la producción de fumonisina B1 en <i>Fusarium verticillioides</i> , cepa MY3.	79
2. Efecto de la fumonisina B1 en la producción de la actividad pectinolítica en <i>Fusarium verticillioides</i> , cepa MY3.	81
IX. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	83
X. BIBLIOGRAFÍA	84
XI. ANEXOS	92
A. Anexo Materiales y Métodos	92
B. Anexo Resultados	101

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Zonas productoras de maíz a nivel mundial.	2
Figura 2. Representación esquemática de la forma y tamaño de algunos patógenos en relación con la célula vegetal.	3
Figura 3. Forma teleomorfa de <i>Gibberella</i> .	6
Figura 4. Morfología de las esporas, caracteres usados en la identificación de especies de <i>Fusarium</i> . Formas macroconidiales.	6
Figura 5. Morfología de las esporas, caracteres usados en la identificación de especies de <i>Fusarium</i> . Forma de las microconidias.	6
Figura 6. Esporas asexuales de <i>F. verticillioides</i> .	8
Figura 7. Colonias de <i>Fusarium verticillioides</i> .	8
Figura 8. Proceso de infección por <i>Fusarium verticillioides</i> en tejidos de plántulas de maíz.	10
Figura 9. Eventos tempranos durante la colonización de plantas por <i>F. verticillioides</i> .	12
Figura 10. Ciclo de la enfermedad causado por <i>F. verticillioides</i> .	14
Figura 11. Estructura química y pesos moleculares de las diferentes series de fumonisinas.	16
Figura 12. Biosíntesis de FB1. Ruta biosintética de las fumonisina, en el que se indica el producto de los genes del locus FUM.	18
Figura 13. Blancos moleculares de la fumonisina, se ejerce una acción inhibitoria en tres de ellos: la ATPasa de H ⁺ , la esfinganina N-acil transferasa y las β-1,3-glucanasas básicas.	20
Figura 14. Plántulas de maíz (genotipo: Silver Queen) después de 14 días de crecimiento a partir de semillas inoculadas con diferentes tipos de cepas de <i>F. verticillioides</i> .	21
Figura 15. Heterogeneidad en la estructura de los polisacáridos de la pared celular vegetal.	22
Figura 16. Representación esquemática de la organización de la pared en la célula vegetal.	23
Figura 17. Un fragmento de celulosa (β-1,4-glucano) y una unidad de celobiosa.	27
Figura 18. Representación esquemática de la estructura del xilano y algunas de las ramificaciones que presenta.	28
Figura 19. Estructura esquemática de la pectina.	29
Figura 20. Estructura del homogalacturonano.	30
Figura 21. Estructura del Ramnogalacturonano II.	31
Figura 22. Control de la transcripción de glicohidrolasas en modelos de hongos filamentosos.	36
Figura 23. Modelo para la regulación de celulasas en <i>T. reesei</i> .	41
Figura 24. Síntomas de la infección de tallos de maíz por cuatro cepas de <i>F. verticillioides</i> .	44
Figura 25. Colonización fúngica de embriones de maíz por cuatro cepas de <i>F. verticillioides</i> .	45
Figura 26. Crecimiento de las cinco cepas de <i>Fusarium spp</i> en agar suplementado con pectina de manzana (1%) como fuente de carbono.	59
Figura 27. Crecimiento de las cinco cepas de <i>Fusarium spp</i> en agar suplementado con acetil celulosa (1%) como fuente de carbono.	60

Figura 28. Crecimiento de las cinco cepas de <i>Fusarium spp</i> en agar suplementado con D-(+)-xilosa (1%) como fuente de carbono.	60
Figura 29. Curvas de crecimiento de las cinco cepas de <i>Fusarium spp</i> en presencia de pectina de manzana (1%) en medio sólido.	62
Figura 30. Curva de crecimiento de las cinco cepas de <i>Fusarium spp.</i> en presencia de acetil celulosa (1%) en medio sólido, determinado por el diámetro de la colonia.	63
Figura 31. Degradación de pectina por cinco cepas de <i>Fusarium spp.</i> , en medio solidificado con agarosa.	65
Figura 32. Actividad específica de celulasas de <i>Fusarium spp.</i> en extractos proteicos de micelio crecido en medio líquido suplementado con glucosa (0.12 M).	66
Figura 33. Actividad específica de pectinasa de <i>Fusarium spp.</i> en extractos proteicos de micelio crecido en medio líquido suplementado con glucosa (0.12 M).	67
Figura 34. Actividad específica de celulasas excretadas al medio en cepas de <i>Fusarium spp.</i> cultivadas en medio líquido con acetil celulosa como fuente de carbono.	68
Figura 35. Actividad específica de pectinasas excretadas al medio en cepas de <i>Fusarium spp.</i> cultivadas en medio líquido con pectina de manzana como fuente de carbono.	68
Figura 36. Actividad específica de xilanasas excretadas al medio en cepas de <i>Fusarium spp.</i> cultivadas en medio líquido con salvado de trigo como fuente de carbono.	69
Figura 37. Niveles de producción de FB1 por la cepa <i>F. verticillioides</i> MY3, en medios de cultivo suplementados con distintas fuentes de carbono.	70
Figura 38. Crecimiento de <i>F. verticillioides</i> MY3 en medios suplementados con distintas fuentes de carbono y valores promedio de pH para los medios antes y después de la incubación.	71
Figura 39. Efecto de la FB1 sobre la actividad pectinolítica de la cepa de <i>F. verticillioides</i> MY3.	72
Figura A1. Curva patrón de proteínas. Método de Bradford.	96
Figura A2. Estructuras de la reacción de un azúcar reductor (glucosa) y el ácido 3,5-dinitrosalicílico.	97
Figura A3. Curva patrón de glucosa por el método de DNS.	98
Figura A4. Cromatografía en capa fina de los productos de hidrólisis de la incubación de pectina con las fracciones extracelulares de cultivos de las cinco cepas de <i>F. verticillioides</i> .	102
Figura A5. Producción de biomasa de <i>F. verticillioides</i> en presencia de pectina de manzana en medio líquido	103
Figura A6. Actividad enzimática de <i>F. verticillioides</i> cepa MY3 en presencia de pectina de manzana como sustrato en medio líquido.	103

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Incidencia de fumonisinas en muestras de granos de maíz a nivel mundial.	4
Tabla 2. Características de las esporas asexuales de <i>F. verticillioides</i> , en agar CLA	7
Tabla 3. Descripción los productos de los genes del locus FUM en <i>F. verticillioides</i> .	17
Tabla 4. Composición de la pared celular de plantas dicotiledóneas y monocotiledóneas.	24
Tabla 5. Composición aproximada* (% peso seco) de la pared celular de gramíneas (monocotiledóneas) y dicotiledóneas.	25
Tabla 6. Enzimas degradadoras de pared celular en el secretoma de <i>F. verticillioides</i> crecido en salvado de trigo sometido a autoclave.	34
Tabla 7. Producción de diferentes CWDE por <i>Fusarium verticillioides</i> en tejido infectado de tomate y coliflor	42
Tabla 8. Parámetro de la cinética de crecimiento de <i>Fusarium spp</i> en medio de cultivo solido suplementada con diferentes fuentes de carbono.	64
Tabla 9. Dimensión del halo de degradación de pectina en placa de agarosa por las cinco cepas de <i>Fusarium spp</i> .	65
Tabla A1. Composición medios de cultivo con diferentes fuentes de carbono	92
Tabla A2. Composición solución Stock Szécsi	92
Tabla A3. Composición medio de cultivo GYAM	93
Tabla A4. Composición solución sales Stock GYAM	93
Tabla A5. Amortiguador de extracción de proteínas	93
Tabla A6. Componentes de la cuantificación de proteína por el método de Bradford.	94
Tabla A7. Composición solución Stock Vogel	95
Tabla A8. Solución de elementos traza Vogel	95
Tabla A9. Composición de la curva patrón de glucosa.	97
Tabla A10. Mezclas de reacción de ensayos de actividad enzimática.	98
Tabla A11. Composición de medio liquido basal para el análisis de producción de FB1 en <i>Fusarium verticillioides</i> .	98
Tabla A12. Preparación de la curva patrón de FB1.	99
Tabla A13. Parámetros en el detector de fluorescencia marca Shimadzu, Modelo: RF-10AXL para el análisis de fumonisina.	99
Tabla A14. Parámetros del Integrador Shimadzu C-R5A para el análisis de fumonisina.	100
Tabla A15. Volúmenes ocupados para cinética de actividad de pectinasas	100
Tabla A16. Rf en CCF promedios de diferentes carbohidratos	101

I. RESUMEN

El maíz es un cultivo de importancia mundial con múltiples usos. En México gran parte del territorio se destina a su producción, sin embargo, ésta se ve limitada por la presencia de patógenos. Entre estos se encuentra *Fusarium verticillioides*, hongo ascomiceto que tiene una elevada incidencia en maíz y es capaz de producir las micotoxinas fumonisinas. Una de éstas, la fumonisina B1 (FB1), es un factor de virulencia que tiene varios blancos moleculares en los tejidos de maíz. La producción de la toxina facilita la colonización de *F. verticillioides* en tejidos de maíz. En nuestro equipo de trabajo se identificaron cuatro cepas catalogadas como de alta (MY3), moderada (H-135) y baja (MY5 y PAL-1) producción de FB1. Aunque presentan esta diferencia, las cuatro son capaces de colonizar diversos tejidos de maíz. Una de las defensas ante el ataque de microorganismos lo constituye la pared celular vegetal, por ello la presencia de enzimas encargadas de degradar esta barrera física contribuiría a la colonización del tejido. En este estudio fue posible establecer las condiciones que condujeran a la inducción y posterior evaluación de la producción de enzimas glicohidrolíticas en las cuatro cepas de *F. verticillioides*. Se encontró que las cepas bajas productoras de fumonisina B1 tuvieron la capacidad de producir diferentes glicohidrolasas (xilanasas, celulasas y pectinasas) de manera *in vitro*, con lo cual se sugiere que la capacidad de penetrar e invadir al tejido de maíz se encuentra facilitada por la presencia de dichas enzimas, resultando con ello, otro posible factor de virulencia de las cepas.

II. INTRODUCCIÓN

A. *Fusarium verticillioides* como patógeno del maíz

El maíz (*Zea mays* L.) es uno de los cultivos más importantes a nivel mundial con múltiples usos (alimento, forraje, material industrial y bioenergético) y que, desde el punto de vista económico, es el cereal con mayor producción en toneladas (Weng-Zeng et al., 2012). Constituye la base de la seguridad alimentaria mundial, especialmente en países en desarrollo donde su consumo representa aproximadamente el 42.5% del suministro de calorías (FAO, 2016, p. 3).

El maíz se produce en todos los continentes (Figura 1), y en México se destinan aproximadamente 7,541 mil hectáreas de superficie para su siembra, con características geográficas muy variadas (SAGARPA, 2018, p.102).

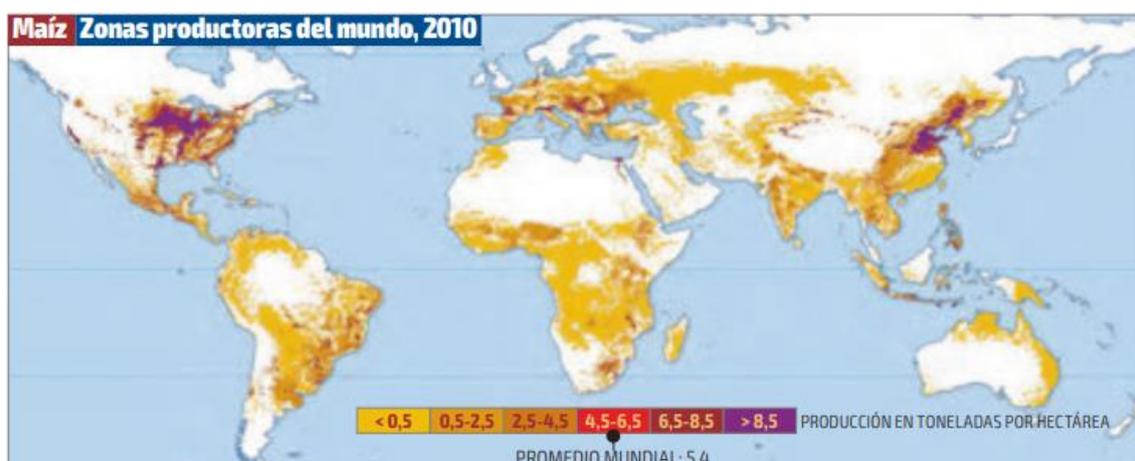


Figura 1. Zonas productoras de maíz a nivel mundial. Fuente: FAO, 2016

La diversidad genética en maíz ha permitido que las variedades se adapten a las diferentes condiciones edafoclimáticas del territorio, cuyos valores como la altitud (0 a 3,000 msnm), la lluvia (700 a 1,300 mm), pH del suelo (5.5 a 7.5) y la temperatura (18 a 24°C) son las óptimas para este cultivo (SAGARPA, 2018, p.103). La productividad de maíz es afectada por factores abióticos (temperatura, disponibilidad de agua y nutrientes, pH y minerales del suelo) y bióticos (enfermedades causadas por bacterias, hongos, virus, nemátodos) (Agrios, 2004).

La microbiota de maíz es muy diversa e incluye, por ejemplo, bacterias endófitas como *Enterobacter spp* y *Burkholderia spp.*, que pueden llegar a promover el crecimiento de la planta y hasta servir de protección contra patógenos (Seghers et al., 2004). Sin embargo, también hay microorganismos patógenos que causan enfermedades a través de la perturbación del metabolismo de la planta por medio de enzimas, toxinas, reguladores de crecimiento y otras sustancias secretadas o bien, absorbiendo los nutrientes del hospedero (Agrios, 2004; Fig. 2).

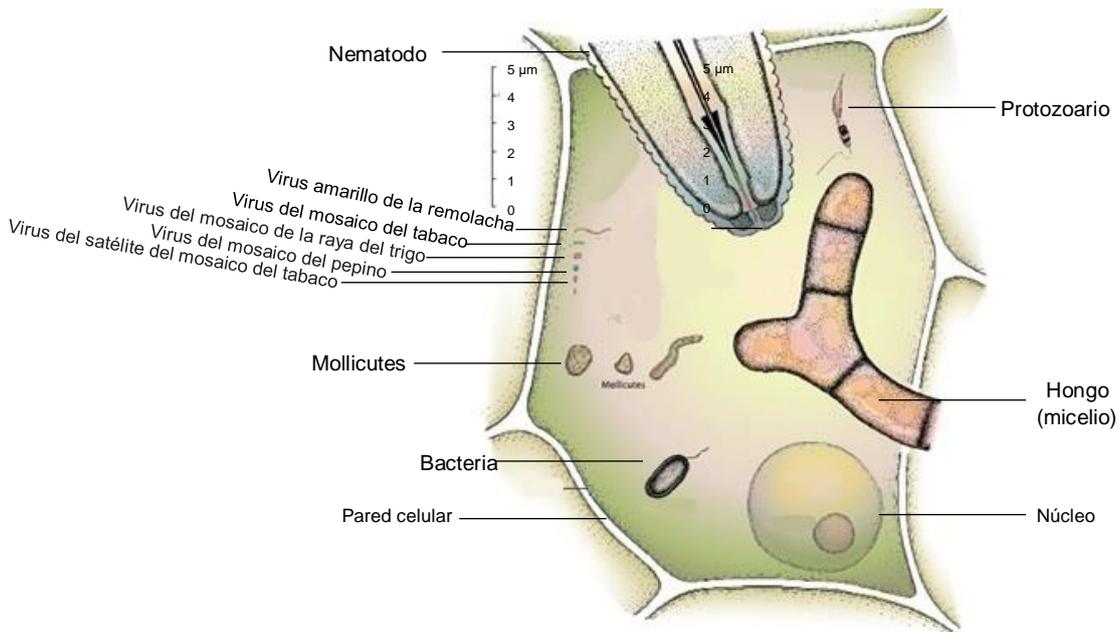


Figura 2. Representación esquemática de la forma y tamaño de algunos patógenos en relación con la célula vegetal. Tomado de Agrios, 2004

Debido a su capacidad de asociarse con una amplia variedad de plantas y productos derivados de éstas, los hongos fitopatógenos se consideran los más importantes a nivel económico. Los hongos fitopatógenos como *Fusarium*, *Aspergillus*, *Puccinia*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Curvalaria* y *Cladosporium* atacan cereales como el arroz, el trigo, el maíz, la cebada y los granos de sorgo que son de importancia mundial en el campo agrícola (Singh & Singh, 2019).

Además, varios de estos géneros de hongos, como *Fusarium* y *Aspergillus*, son capaces de producir metabolitos tóxicos como las micotoxinas. El maíz puede estar contaminado con fumonisinas (FBs), deoxinivalenol (DON), zearalenona (ZEN), aflotoxinas (AFs) y otras micotoxinas, pero son las aflatoxinas y

fumonisinias las de mayor incidencia en el cultivo (Neme & Mohammed, 2017). La tabla 1 presenta datos de incidencia de fumonisinias en tres continentes.

Tabla 1. Incidencia de fumonisinias en muestras de granos de maíz a nivel mundial. Tomado y modificado de Lee & Ruy, 2017

	América	Asia	Europa
Incidencia (%)	220/231 (95%)	457/626 (73%)	72/148 (49%)
Rango (µg/kg)	15 - 34 700	0 - 71 121	25 - 4 438

En México, *F. verticillioides*, es la especie que se aísla con mayor frecuencia en maíz (Gallardo-Reyes et al., 2006; Sánchez-Rangel et al., 2005). Asimismo, es la especie predominante en muchas partes del mundo (Munkvold, 2003; de la Torre-Hernández et al., 2014). Es considerado el principal patógeno del cultivo y es el agente causal de enfermedades que afectan varios órganos de la planta; tizón de las plántulas, pudrición de raíz, tallo y mazorca. Las fumonisinias B1, además de ser un contaminante de los granos, tiene actividad fitotóxica y es un factor de virulencia del hongo (Blacutt et al., 2018).

1. Características generales de *Fusarium verticillioides*

a. Descubrimiento y descripción de la especie.

Fusarium verticillioides (Saccardo) Nirenberg (= *F. moniliforme* (Sheldon)), fue descrito por primera vez en 1877 por Saccardo como *Oospora verticillioides*, presente en maíz de Italia. Más tarde, en 1904 John Sheldon lo describió como *Fusarium moniliforme* cuya fuente era el maíz y a éste se le asociaba con toxicosis en animales en los Estados Unidos. Durante la mayor parte del siglo XX, el calificativo *Fusarium moniliforme* fue usado para este hongo. A partir de un extenso estudio en un grupo de especies de *Fusarium*, al cual incluía a *Fusarium moniliforme*, Nirenberg concluyó en 1976 que esta especie debería ser llamada *F. verticillioides*, hecho que se aceptó por la Sociedad Internacional de

Patología Vegetal y el Comité Internacional sobre Taxonomía de Hongos (Seifert et al, 2003).

F. verticillioides es un miembro del complejo de especies filogenéticamente definidas de *F. fujikuroi* (FFSC, por sus siglas en inglés), que es un grupo monofilético que se superpone en gran medida a la sección reconocida históricamente como *Liseola* (Leslie & Summerell, 2006). El complejo comprende más de 50 especies de *Fusarium*, muchas de ellas representan importantes patógenos de plantas, otras son importantes productoras de metabolitos secundarios los cuales son tóxicos y contaminan alimentos y forrajes globalmente (De Vos et al., 2014).

b. Morfología y características coloniales

F. verticillioides presenta una fase sexual llamada *Gibberella moniliformis* cuya forma se presenta en condiciones especiales (de la Torre-Hernández et al., 2014) y sólo cuando se cruzan cepas del tipo opuesto.

Las formas teleomorfas no son comúnmente observadas bajo condiciones de campo, pero bajo las condiciones de laboratorio son más fáciles de generar. Los peritecios de *Gibberella* son de color negro púrpura oscuro con forma ovoide y un exterior verrugoso. Las ascas son relativamente estrechas y por lo general carecen de un mecanismo de descarga apical. Las ascosporas son fusoides, de 1 a 3 septos, rectos o ligeramente curvados (Leslie & Summerell, 2006; Fig. 3).

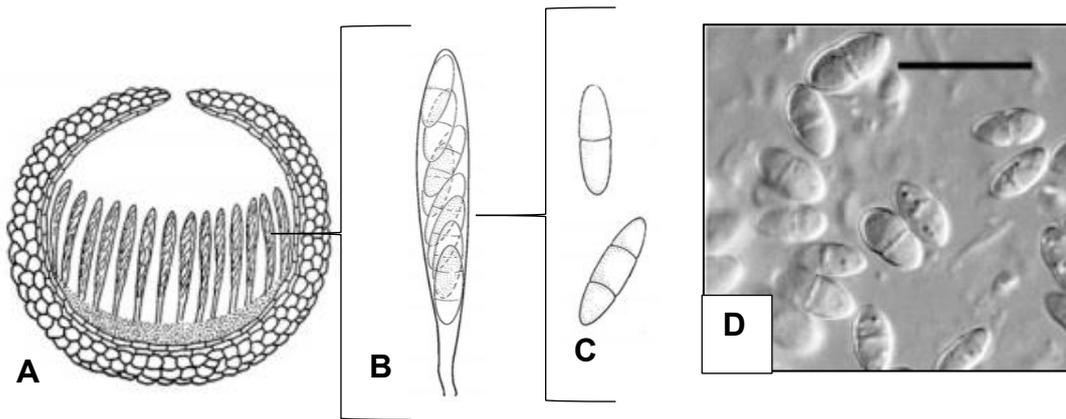


Figura 3. Forma teleomorfa de *Gibberella*. **A.** Corte transversal de un peritecio que muestra en su interior los sacos de esporangios. **B.** Estructura de un esporangio donde se desarrollan las ascosporas. **C.** Estructura de las esporas sexuales. **D.** Ascosporas de *G. moniliformis*, se observa 1 septo, barra indica 10 µm. Tomado y modificado (Martínez, 2017; Leslie & Summerell, 2006)

La forma anamórfica o de reproducción asexual consta de una escasa producción de macroconidias (Fig. 4) y abundantes microconidias (Fig. 5), cuyas características para *F. verticillioides* se describen en la Tabla 2.

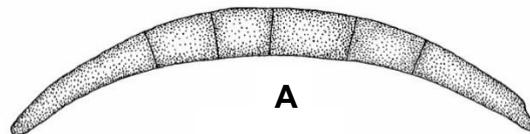


Figura 4. Morfología de las esporas, caracteres usados en la identificación de especies de *Fusarium*. Formas macroconidiales. **A.** Típica macroconidia de *Fusarium*, de lado izquierdo se aprecia la forma apical y en la derecha la basal. Tomado y modificado de Leslie & Summerell (2006).



1

Figura 5. Morfología de las esporas, caracteres usados en la identificación de especies de *Fusarium*. Forma de las microconidias. **1.** De forma ovalada a forma de manzana y tiene una base aplanada. Tomado y modificado de Leslie & Summerell (2006).

Tabla 2. Características de las esporas asexuales de *F. verticillioides*, en agar CLA (Leslie & Summerell, 2006).

Macroconidios	
Morfología general	Relativamente larga y alargada, ligeramente rectas y de paredes delgadas.
Morfología de células apicales	Curvada y con frecuencia estrecha hacia un punto
Morfología de células basales	En forma de pie
Numero de septos	3 a 5
Abundancia	Varía según la cepa, pero las macroconidias suelen ser difíciles de encontrar.
Microconidios	
Forma/Septación	De forma ovalada a una forma aplanada y por lo general carece de septos
Apariencia del micelio aéreo	Las largas cadenas son comunes, pero en ocasiones aparecen pequeños agregados de algunas esporas.
Abundancia	Abundante en los micelios aéreos

La producción de microconidias en cadenas largas a partir de fiálides relativamente largas como se muestra en la Figura 6E y 6F, distingue a *F. verticillioides* de la mayoría de otras especies comunes de *Fusarium* (Pitt & Hocking, 2009).

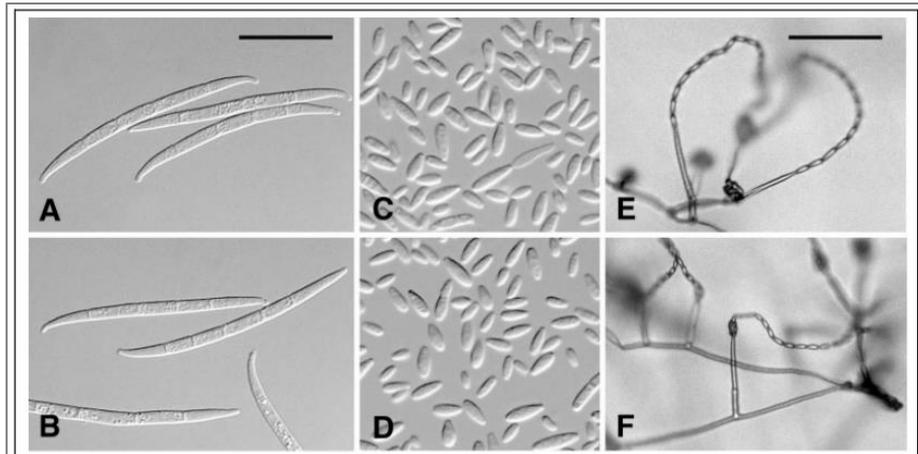


Figura 6. Esporas asexuales de *F. verticillioides*. **A-B:** Macroconidias; **C-D:** Microconidios; **E-F:** Microconidios in situ en agar hoja de clavel. **A-D,** barra de escala= 25 μm ; **E-F,** barra de escala= 50 μm (Leslie & Summerell, 2006).

Las características en medio de cultivo son únicas y permiten distinguir de otras especies a *F. verticillioides*. En el medio Papa-Dextrosa Agar (PDA) presenta colonias de color salmón blanco a pálido, micelio denso y floculoso, generalmente con aspecto polvoso con cadenas de microconidia; el reverso de color salmón pálido, violeta grisáceo, violeta pardusco o violeta intenso (Figura 7).



Figura 7. Colonias de *Fusarium verticillioides*, izquierda medio PDA y derecha medio DCPA, 7 días de crecimiento a 25°C. Tomado de Pitt & Hocking, (2009).

2. Factores que permiten la penetración y colonización a los tejidos de maíz

F. verticillioides es capaz de ingresar y colonizar varios tejidos del maíz, causando varias enfermedades.

a. En semillas y plántulas de maíz.

Durante la germinación de las semillas y el establecimiento de las plántulas, puede ocurrir la infección si en el suelo hay altos niveles de inóculo o bien el patógeno se encuentra en la semilla como endófito. Si los campos donde se cultiva maíz contienen aún restos de cosechas pasadas que muestran ser un potencial reservorio para el inóculo de *F. verticillioides* (Blacutt et al., 2018) puesto que el hongo puede sobrevivir produciendo estructuras de supervivencia como hifas engrosadas que le ayudan a sobrevivir en ausencia de un hospedero (Munkvold, 2003).

Bajo condiciones de laboratorio se ha observado que la forma en que ingresa *F. verticillioides* en la semilla en germinación es por medio de la penetración a través del pericarpio de ésta (Figura 8A a C). En los embriones, la entrada del hongo en el escutelo es principalmente intercelular, aunque también se produce una penetración directa en las células del parénquima (Figura 8D). Y en la radícula, el hongo penetra directamente a través de las capas de las células epidérmicas (Figura 8E) (Murillo et al., 1999).

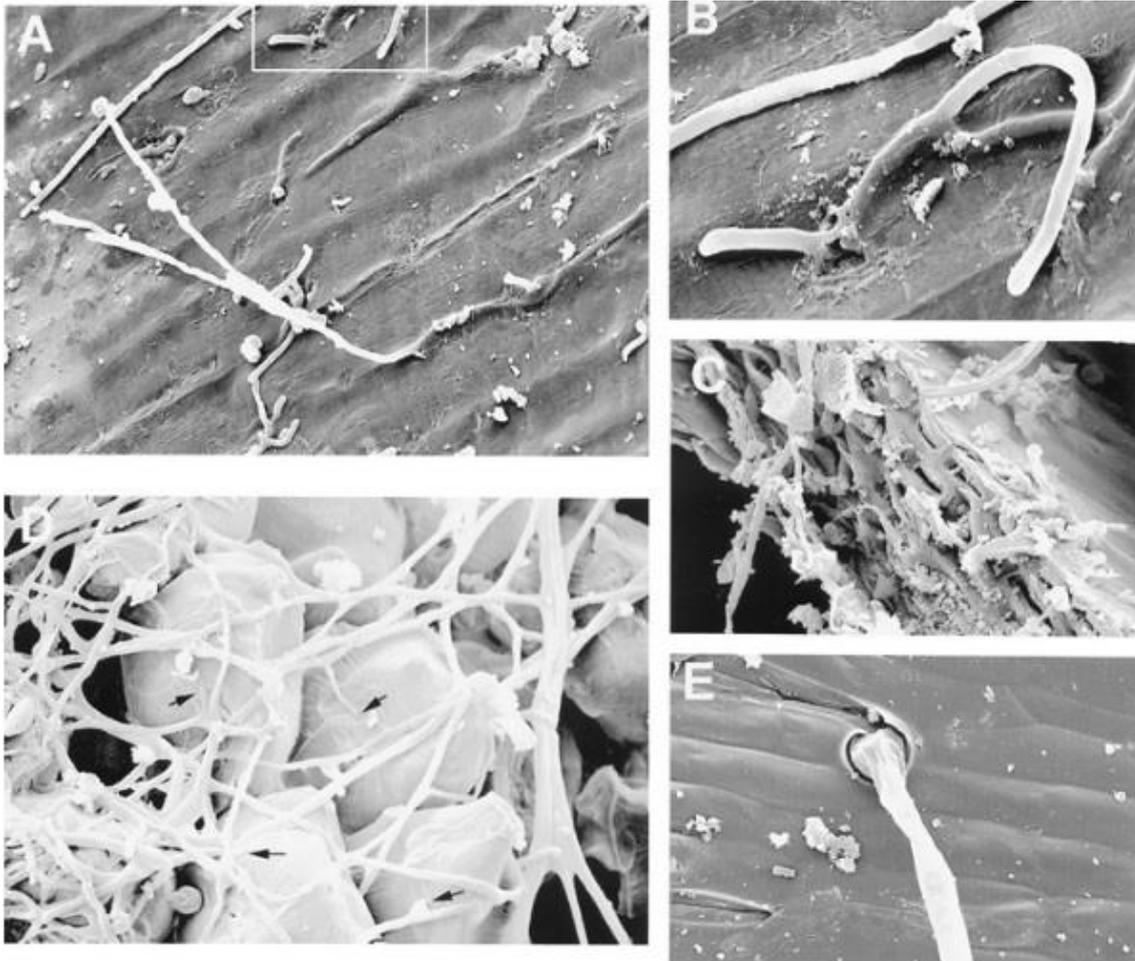


Figura 8. Proceso de infección por *Fusarium verticillioides* en tejidos de plántulas de maíz. **A.** Semillas en germinación muestran crecimiento de hifas en la superficie del pericarpio (x1000). **B.** Magnificación de área en recuadro en A, muestra el crecimiento de la hifa en la superficie del pericarpio (x4000). **C.** Hifa pasando a través del pericarpio de la semilla. **D.** Colonización de las células del parénquima del escutelo de embriones en germinación por *F. verticillioides*. El hongo crece de manera intercelular. Las flechas indican los sitios donde penetran las hifas dentro de las células del hospedero. **E.** Penetración de una hifa a través de las células de la epidermis de la radícula (Murillo et al., 1999).

b. Durante el desarrollo de la plántula

El proceso de infección por parte de *F. verticillioides* fue caracterizado por Oren et al. (2003), usando una cepa que expresa la proteína verde fluorescente (GFP, por sus siglas en inglés), lo que permitió observar en varios estadios del desarrollo de la planta. Los principales sitios de penetración son las raíces laterales y el mesocótilo, tejido que conecta la raíz emergente con el brote emergente.

A los 3 días post-inoculación (dpi) el hongo se detecta en la superficie de los órganos subterráneos, como las semillas, las raíces y el hipocótilo. En raíces y mesocótilo, el crecimiento de *F. verticillioides* es además de tipo intercelular, esto es, que las hifas se desarrollaron en los espacios entre células epidérmicas de la planta (Figura 9A -9D). A los 7 dpi el crecimiento del hongo progresa, pero se limita al tejido del mesocótilo. El patrón de desarrollo es muy organizado, la mayoría de las células en el mesocótilo no son afectadas, pero unas pocas presentan fluorescencia verde-amarillo por la presencia del micelio (Figura 9E, F).

14 dpi. - Las células del mesocótilo acumulan “orgánulos redondeados indefinidos” y, las hifas endofíticas desarrollaron estructuras parecidas a conidióforos (Figura 9G). Hay más micelio en los espacios de la pared celular, además este micelio contenía orgánulos gruesos parecidos a conidióforos o ramificaciones aéreas (Figura 9H).

21 dpi.- Las células del mesocótilo están invadidas por conidios de *F. verticillioides* (Figura 9I). A lo largo del eje de la raíz se desarrollan un gran número de hifas (Figura 9J) y las macroconidias se detectan en la raíz radicular (Figura 9K).

30 dpi.- Las zonas en las que el hongo prolifera (mesocótilo y raíz principal) se producen grandes cantidades de biomasa, causando la descomposición de estos órganos (Figura 9 L y M).

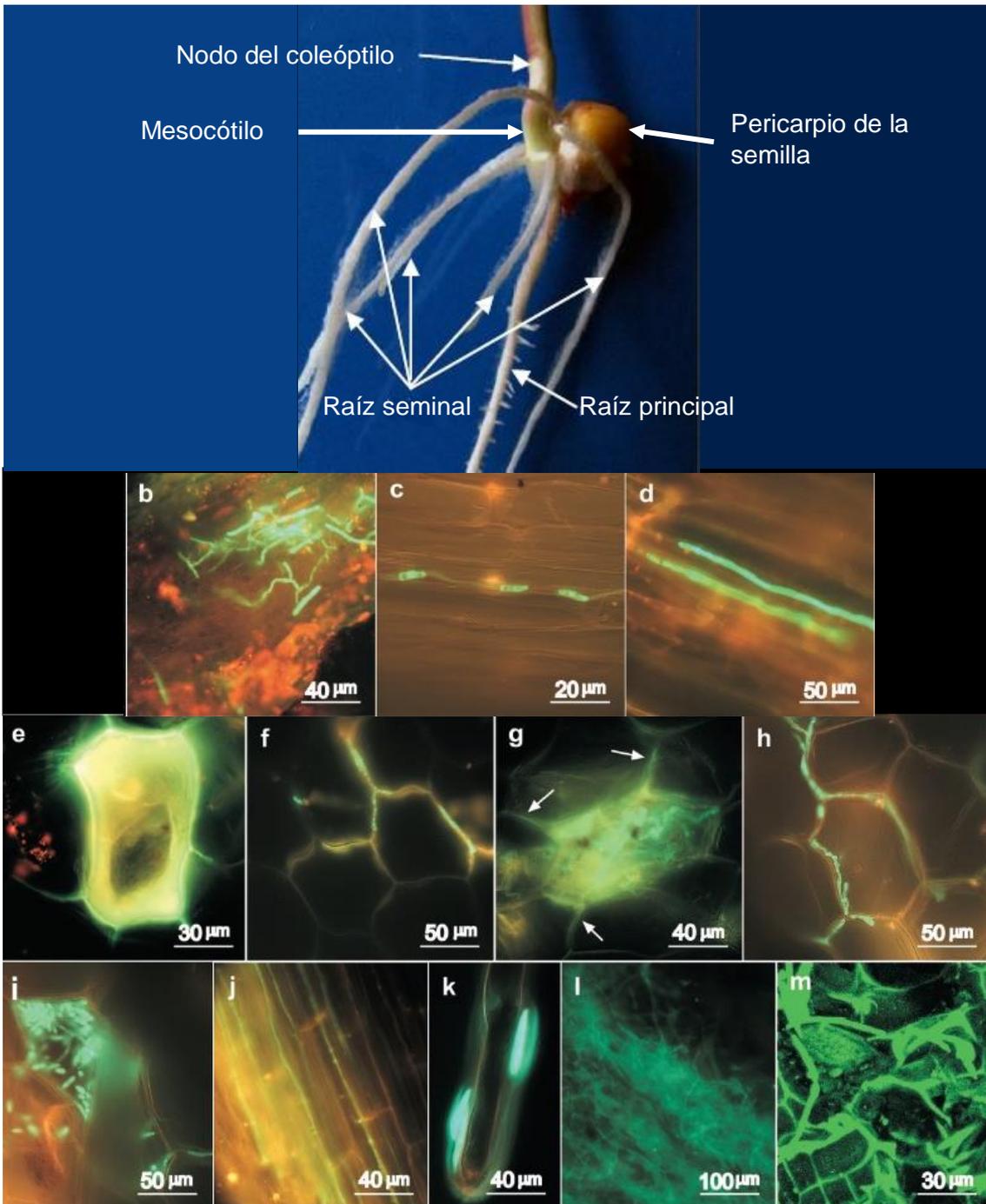


Figura 9. Eventos tempranos durante la colonización de plantas por *F. verticillioides*. **A.** Los órganos y tejidos examinados que incluyen la raíz principal, raíces seminales, mesocótilo y pericarpio **B.** Adherencia y penetración directa del micelio en el mesocótilo. **C y D.** Crecimiento de la hifa en la superficie de las raíces laterales y dentro de éstas. **E.** Colonización y reproducción del hongo en las células del mesocótilo. **F.** Diferenciación de las conidias. **G.** Desarrollo de micelio en los espacios de la pared intercelular. **H.** Germinación de las conidias para formar las hifas. **I.** Maduración de las conidias. **J.** Crecimiento de las hifas en los espacios intercelulares. **K.** Macroconidias adheridas a la capa del mucilago de la raíz principal. **L y M.** Micelio en la raíz principal. Tomado y modificado de Oren et al. (2003) & Singh et al. (2010)

Los síntomas de pudrición en las raíces y en el mesocótilo, que ya se hallan colonizados (entre 25 y 30 días después de la siembra), va en función de la cantidad de inóculo y los factores ambientales. Además, se puede presentar tallos asintomáticos, esto debido a la baja cantidad de hifas, por ello la infección puede seguir su curso sin evidencia observable que muestre la presencia del patógeno en dicho tejido (de la Torre-Hernández et al., 2014).

Una vez desarrollada la planta de maíz y alcanzado los estadios de reproducción y fertilización por polinización, la mazorca y los granos se encuentran propensos ahora a infecciones por *F. verticillioides*, mediante vías diferentes que permiten la inoculación del hongo sobre el tejido, ya sea por medio de la actividad de algún insecto como vector, o por agua de lluvia o irrigación que permitan la dispersión del patógeno en la superficie de dichos tejidos.

c. El daño mecánico.

La relación *F. verticillioides-Zea mays* en la naturaleza no ocurre de manera aislada. La asociación de insectos al maíz juega un papel importante en el ciclo de la enfermedad ya que provocan daños mecánicos en el tallo y la mazorca, generando vías de entrada para las conidias de *F. verticillioides* (de la Torre-Hernández et al., 2014).

Un ejemplo es la polilla barrenadora Europea que deposita sus huevos en la superficie abaxial de las hojas y las larvas emergentes se alimentan de los tejidos y, antes de llegar a los tallos, las larvas se convierten en pupas, se aparean y depositan la segunda generación de huevos en los tejidos de la planta. Esta segunda generación de larvas se alimenta en los tallos, en las mazorcas y los tejidos circundantes, con ello se proporcionan entradas amplias para la infección de *F. verticillioides* o bien las larvas pueden adquirir esporas del hongo y transportarlas hasta los granos (Blacutt et al., 2018; Munkvold, 2003).

A manera de resumen se presenta un esquema de la interacción que existe entre el ciclo de vida del maíz con *F. verticillioides*, (Figura 10).

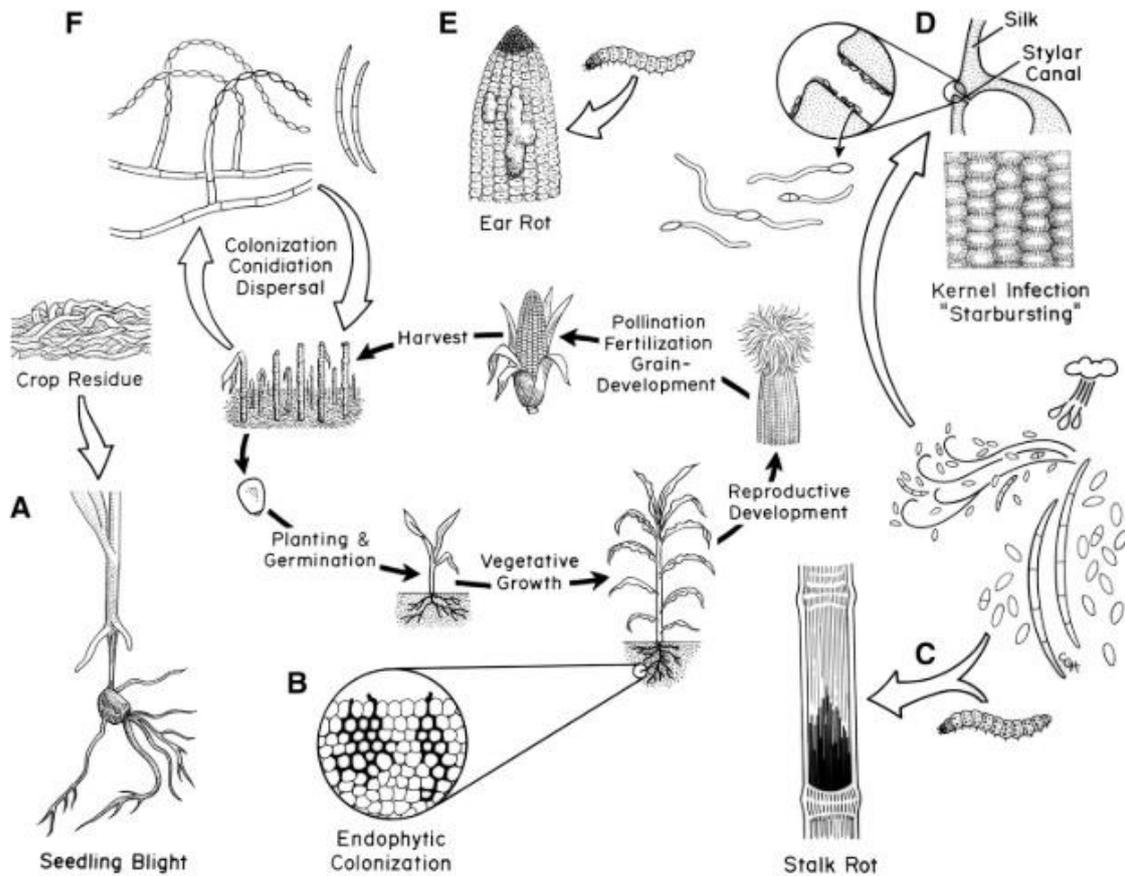


Figura 10. Ciclo de la enfermedad causado por *F. verticillioides*, alrededor del ciclo de vida del maíz. **A.** Germinación de semillas en suelos infestados por *Fusarium*, daría como resultado una podredumbre agresiva y tizón de la plántula. **B.** Colonización endofítica bajo condiciones que no promuevan la enfermedad. **C.** Las heridas del tallo por daño mecánico o alimentación de insectos facilitan la entrada de *F. verticillioides*, provocando así, pudrición de tallo. **D.** Colonización de los granos de maíz a través del canal estilar. **E.** Daño mecánico por herbívoros permiten la colonización de *F. verticillioides*. **F.** Supervivencia del hongo en el rastrojo que constituye el inóculo para infecciones posteriores. Tomado de (Blacutt et al., 2018)

d. Factores ambientales

Las condiciones ambientales influyen en el desarrollo de esta enfermedad. Por ejemplo, las condiciones húmedas propician la pudrición de la mazorca y, el estrés por sequía favorece la colonización e incrementa la severidad de la enfermedad (Munkvold, 2003).

La temperatura influye en la producción de esporas bajo condiciones de campo, además de la disponibilidad de agua, humedad y la alternación de luz y oscuridad. Así, la producción de conidios de *F. verticillioides* se da en un amplio

rango de condiciones ambientales, desde entornos cálidos y secos hasta condiciones de mucha humedad. La abundancia del inóculo presente en residuos de maíz se ven particularmente propiciadas a temperaturas de entre 17 y 27 °C (Rossi et al., 2009).

B. Fumonisina B1

1. Estructura de las Fumonisinas

Las fumonisinas fueron descritas en 1988 por investigadores sudafricanos como moléculas promotoras de cáncer hepático en ratas, ese mismo año se obtuvo la estructura química de estas toxinas (Gelderblom et al., 1988). Se han descrito más de 60 moléculas relacionadas estructuralmente con la fumonisina. La familia de fumonisina consiste en las series A, B, C y P, esto en función de los grupos estructurales que se encuentran dentro de la molécula. En general las fumonisinas consisten en una cadena lineal de 19 a 20 carbonos, de un esqueleto derivado de policétido con un nitrógeno, 3-4 hidroxilos, 2 metilos y dos ésteres de ácido carboxílico posicionados a lo largo del esqueleto de carbonos (Figura 11)

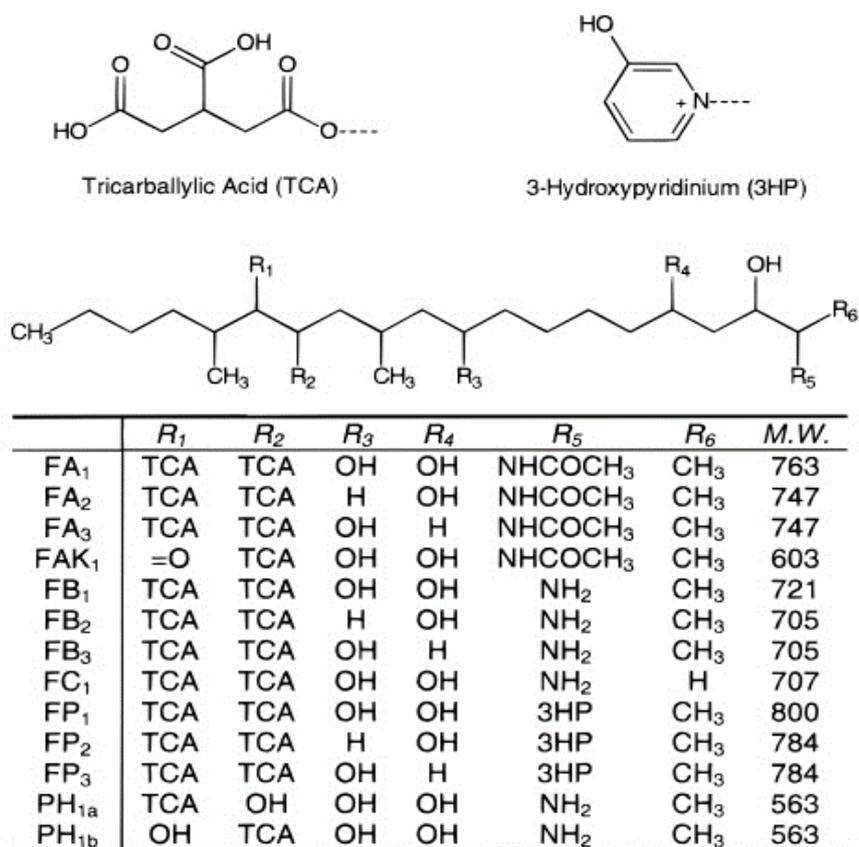


Figura 11. Estructura química y pesos moleculares de las diferentes series de fumonisinas. Tomado y modificado de Musser & Plattner (1997).

Dentro de esta familia las de la serie B son las más abundantes de incidencia natural. Las fumonisinas B1, B2 y B3 difieren por la presencia o la ausencia de grupos hidroxilo en los C-5 y C-10, siendo la fumonisina B1 (FB1) la de mayor abundancia entre ellas con un 75% del total de fumonisinas, éstas contienen un esqueleto lineal de 20 carbonos, con un amino en el C-2 y residuos de ácido tricarbóxico esterificados en C-14 y C-15 (de la Torre-Hernández et al., 2014; Moretti & Susca, 2017).

2. Biosíntesis de Fumonisina B1

La capacidad de producir fumonisinas depende de la presencia del locus *FUM*, que es una región de 46 kpb en el cromosoma 1 de *F. verticillioides* que contiene los genes responsables de su biosíntesis y secreción (Proctor et al, 2003 & Brown et al. 2012)

Cada uno de estos genes participa en un paso biosintético o en la regulación, metabolismo o secreción de la fumonisina (Figura 12). La Tabla 3 muestra un listado de las funciones de los genes del locus *FUM* (Picot et al., 2010).

Tabla 3. Descripción los productos de los genes del locus *FUM* en *F. verticillioides*. Tomado y modificado de Montis et al (2013).

Gene	Función
<i>FUM21</i>	Factor de transcripción Zn ₂ Cys ₆
<i>FUM1 (FUM5)</i>	Policétido sintasa
<i>FUM6</i>	Citocromo P450 monooxigenasa
<i>FUM7</i>	Deshidrogenasa
<i>FUM8</i>	Oxoamino sintasa
<i>FUM3 (FUM9)</i>	Dioxigenasa
<i>FUM10</i>	Acil-CoA sintetasa de ácidos grasos
<i>FUM11</i>	Transportador de tricarboxilatos
<i>FUM2 (FUM12)</i>	Citocromo P450 monooxigenasa
<i>FUM13</i>	Deshidrogenasa/Reductasa
<i>FUM14</i>	Péptido sintasa/Dominio de condensación
<i>FUM15</i>	P450 monooxigenasa
<i>FUM16</i>	Sintetasa de ácidos grasos
<i>FUM17</i>	Ceramida sintasa
<i>FUM18</i>	Ceramida sintasa
<i>FUM19</i>	Transportador tipo ABC

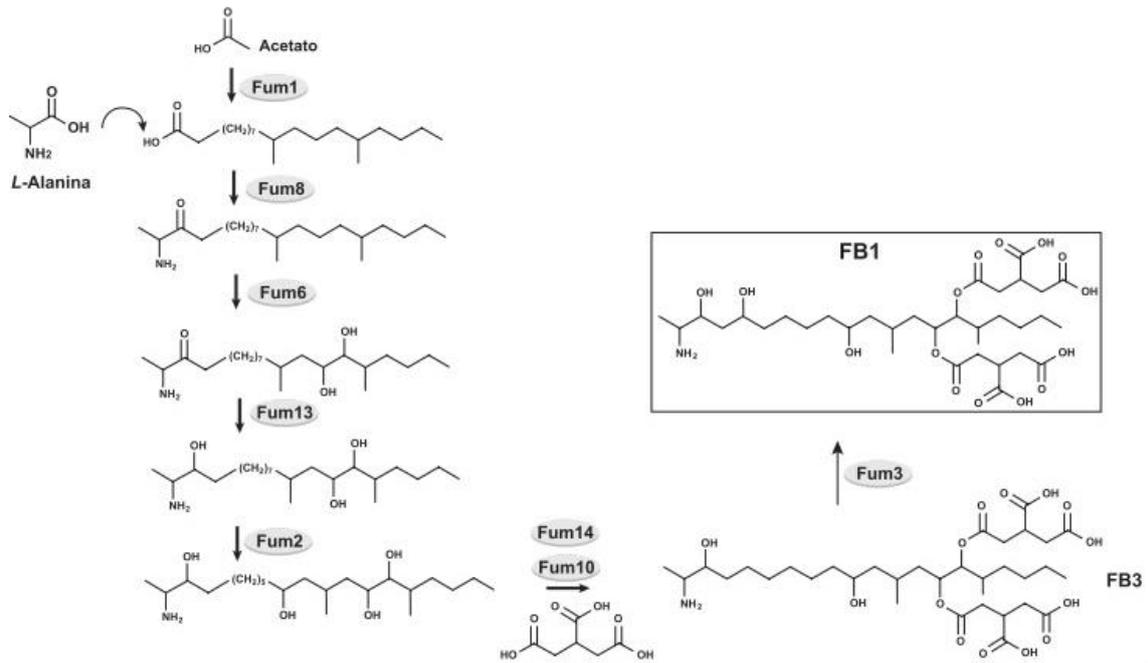


Figura 12. Biosíntesis de FB1. Ruta biosintética de las fumonisina, en el que se indica el producto de los genes del locus FUM. (Tomado de la Torre-Hernández et al., 2014).

Otros genes del locus *FUM* tienen participación en la regulación de la biosíntesis y en la secreción de la toxina; *FUM21* codifica para un factor de transcripción del tipo Zn(II)-2Cys6, que controla la expresión de otros genes del locus, y *FUM19*, que codifica para un transportador tipo ABC que puede estar implicado en la excreción de la toxina. Además, *F. verticillioides* tiene genes relacionados con la resistencia a la micotoxina que le permiten llevar a cabo con éxito la síntesis de sus propios esfingolípidos y son *FUM17* y *FUM18*, los codifican para ceramidas sintasas resistentes a la inhibición de la toxina (Montis et al., 2013).

Además de *FUM21*, otros genes, fuera del locus *FUM* participan en la regulación de la síntesis de fumonisinas pues cepas mutantes en alguno de estos genes están afectados en la producción de la toxina. Por lo general, estos son reguladores globales o factores de transcripción que regulan diversas funciones celulares en respuesta a señales externas. Por ejemplo, el gen *PAC1* codifica un factor transcripcional que responde a cambios de pH (Flaherty et al., 2003) y el gen *AREA* es un regulador del metabolismo del nitrógeno (Kim & Woloshuk, 2008).

3. Blancos de la fumonisina B1 en los tejidos de maíz

Un factor de virulencia es una molécula que incrementa la capacidad de un patógeno para causar enfermedad al interferir con funciones específicas del hospedero. Hay evidencias genéticas y bioquímicas de que la FB1 es un factor de virulencia que le facilita a *F. verticillioides* la agresiva colonización del tejido vegetal. Se han descrito tres blancos moleculares sobre los que actúan la FB1, estos comprenden la inhibición de enzimas, tales como la esfinganina *N*-acil transferasa, la ATPasa de H⁺ y las β-1,3-glucanasas. A continuación, se describe el modo de acción sobre estas enzimas.

a. Inhibición de la esfinganina *N*-acil transferasa

La esfinganina *N*-acil transferasa (ceramida sintasa) cataliza la reacción de acilación entre el grupo amino en el C-2 de la esfinganina con un ácido graso activado por coenzima A (CoA), para así generar una ceramida. La fumonisina es una micotoxina análoga de esfinganina (SAM, “Sphinganine-Analogue Mycotoxin”, por sus siglas en inglés) y actúa como un potente inhibidor competitivo de esta enzima. Como consecuencia de la inhibición de esta enzima, ocurre la acumulación de bases esfingoideas de cadena larga (BCL), principalmente esfinganina (ESN) y fitoesfinganina (PSN), esto representa para la célula la activación de vías de señalización relacionadas con la muerte celular a través de la activación de la vía del ácido salicílico (AS) (de la Torre-Hernández, et al., 2010).

b. Inhibición de la ATPasa de H⁺ de membrana plasmática

La ATPasa de H⁺ es una enzima de 100 kDa de membrana plasmática que tiene entre diez a doce cruces transmembranales, ésta transporta protones del citoplasma al apoplasto; hidroliza ATP para energizar el transporte y su principal función es mantener un potencial membranar negativo y un gradiente transmembranar de pH, estos procesos son necesarios para la elongación, apertura de estomas y otros procesos fisiológicos del tejido. La FB1 inhibe de manera no competitiva a la ATPasa, al intercalarse entre la enzima y los fosfolípidos o esteroides reduciendo la actividad de la enzima (Gutiérrez-Nájera et al., 2005).

c. Inhibición de β -1,3-glucanasas

Las β -1,3-glucanasas son un grupo de proteínas relacionadas con la patogénesis (PR, por sus siglas en inglés), con actividad hidrolítica que se induce como respuesta de defensa de las plantas ante el ataque de hongos filamentosos. El β -1,3-glucano y la quitina son los polisacáridos más abundantes de la pared celular fúngica. La acción de las β -1,3-glucanasas sobre la pared celular inhibe el crecimiento del hongo y genera oligosacáridos que son percibidos por la célula vegetal y amplifican la respuesta de defensa (de la Torre-Hernández, 2014).

La FB1 inhibe la actividad de al menos dos β -1,3-glucanasas básicas, pero también induce la expresión de otras isoformas de β -1,3-glucanasas, probablemente a través de la vía de AS (Sánchez-Rangel et al., 2012).

La figura 13 ilustra la actividad de la FB1 sobre los distintos blancos moleculares en la célula de maíz.

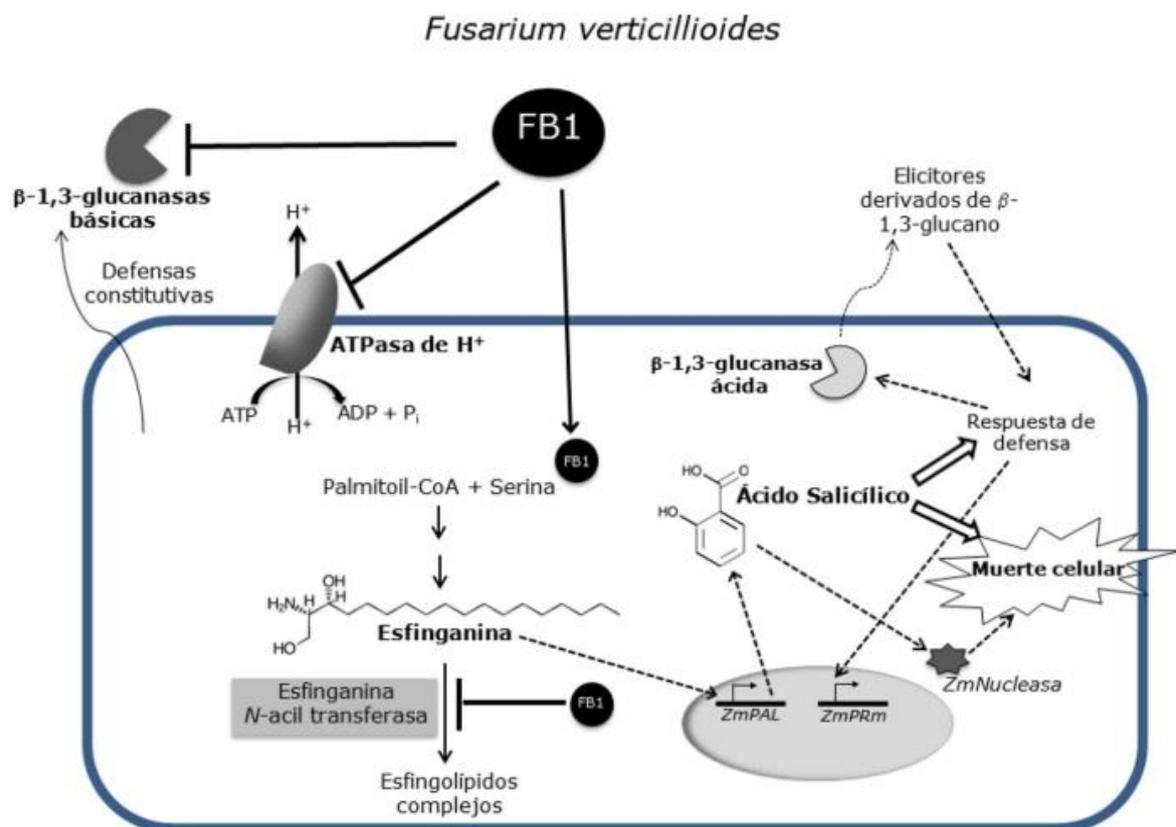


Figura 13. Blancos moleculares de la fumonisina, se ejerce una acción inhibitoria en tres de ellos: la ATPasa de H⁺, la esfinganina N-acil transferasa y las β -1,3-glucanasas básicas. Tomado de la Torre-Hernández, (2014).

4. Función de la fumonisina B1 en la virulencia de *F. verticillioides*

La FB1 es fitotóxica para el maíz y otras especies de plantas; inhibe el crecimiento de raíces y de los brotes de las semillas, y además causan marchitamiento, clorosis y necrosis en los tejidos. La producción de fumonisina no parece ser esencial para la pudrición de la mazorca y grano; en un estudio en el que se usaron cepas isogénicas productoras y no productoras de fumonisina se demostró que la incapacidad de producir la micotoxina no influye en el grado de pudrición del maíz (Desjardins et al., 2002).

Sin embargo, la síntesis de FB1 sí se requiere para infectar plántulas de maíz y causar tizón en éstas. Se demostró que al transformar una cepa de *Fusarium musae*, incapaz de producir fumonisina y de colonizar maíz, con el locus *FUM* completo, adquiere estas dos capacidades y causa los síntomas característicos de tizón de la plántula (Fig. 14; Glenn et al. 2008).

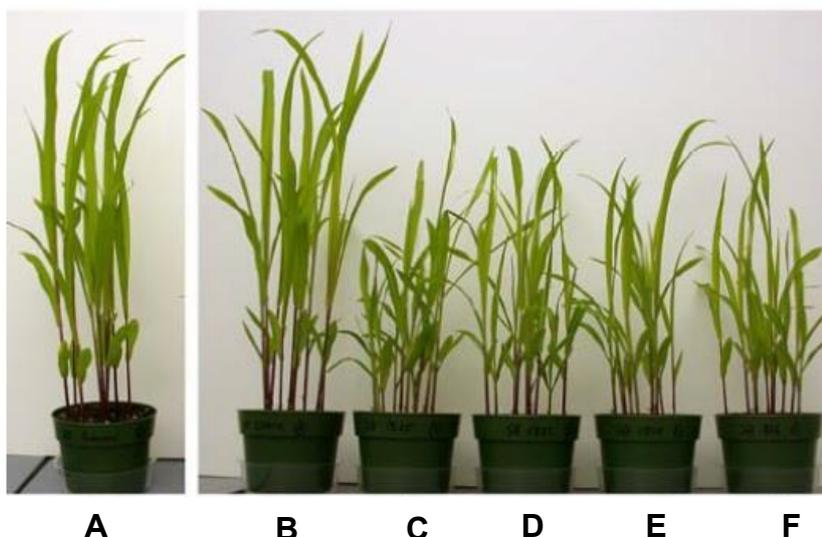


Figura 14. Plántulas de maíz (genotipo: Silver Queen) después de 14 días de crecimiento a partir de semillas inoculadas con diferentes tipos de cepas de *F. verticillioides*. **A.** Control sin inocular. **B.** Cepa de *F. musae* no productora de fumonisina. **C-E.** Cepas de *F. musae* no productoras transformadas con el locus *FUM*. **F.** Cepa productora de fumonisina. Tomado y modificado de Glenn et al. (2008).

C. Estructura de la pared celular vegetal y su degradación por glicohidrolasas.

La pared celular vegetal es una estructura compleja formada por polisacáridos, que incluyen celulosa y hemicelulosa, así como proteínas y compuestos fenólicos. La complejidad y heterogeneidad de la estructura de la pared celular recae en los compuestos de carácter no celulósicos, pues en éstos existe una gran diversidad de azúcares que conforman estas macromoléculas, además, la manera en que se enlazan para formar las cadenas permite arreglos que propician las interacciones entre diferentes polisacáridos (Polizeli & Rai, 2014). La Figura 15 presenta la variedad estructural de estos polisacáridos y de las unidades monoméricas que lo conforman.

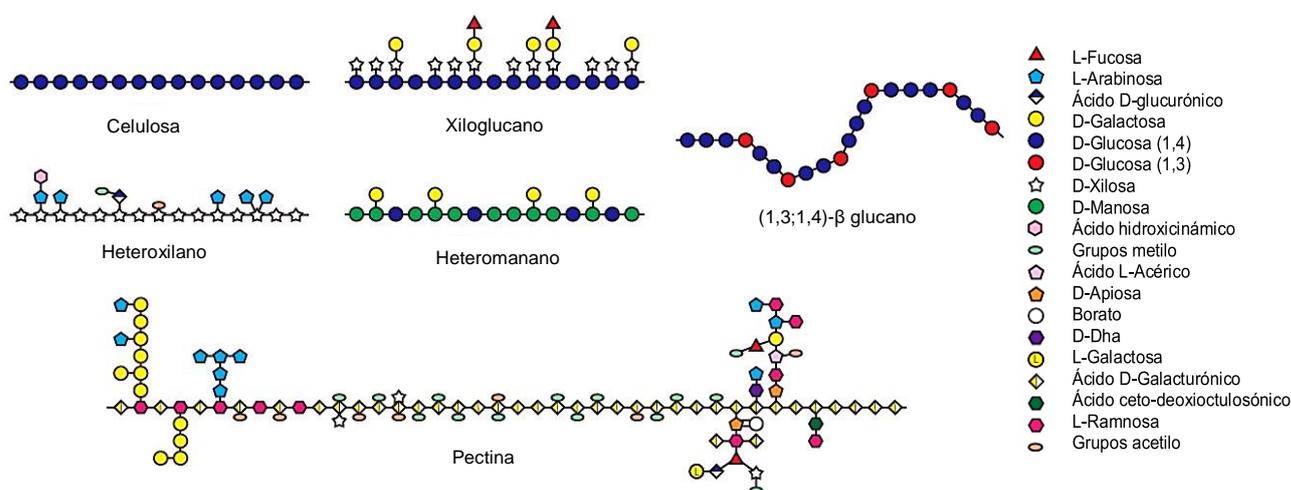


Figura 15. Heterogeneidad en la estructura de los polisacáridos de la pared celular vegetal. Tomado y modificado de Burton et al. (2010).

El esqueleto de la estructura de la celulosa está basado en monómeros de glucosa unidos por enlaces β -1,4. Este tipo de enlace también está presente en los polímeros de xiloglucano, heteroxilano y heteromanano, aunque algunos glucanos también tienen enlaces en posición β -1,3. En el esqueleto de los galacturonanos, el principal constituyente de los polisacáridos pécticos, los monómeros se unen por enlaces α -1,4 (Burton et al., 2010). Estos polímeros se encuentran íntimamente asociados uno con otro, a través de interacciones covalentes y no covalente, y en los que se entrecruzan proteínas y lignina (Doblin et al., 2010).

La composición de la pared celular varía entre especies, así como el tipo de tejido y estadio de desarrollo (Doblin et al., 2010). Además, la conformación de esta barrera física va en función de la organización, pues las tres distintas regiones que comprenden la pared celular presentan diferente contenido de estos polisacáridos y se dividen como sigue (Polizeli & Rai, 2014):

- Lamela media, la cual es rica en polisacáridos pécticos.
- Pared primaria, cuya composición está formada por microfibras de celulosa (~30%), hemicelulosa (~30%), pectina (~30%) y proteínas (~10%).
- Pared secundaria, compuesta de tres capas (S_1 , S_2 y S_3). Cada una difiere en grosor, composición y orientación de las microfibras de celulosa

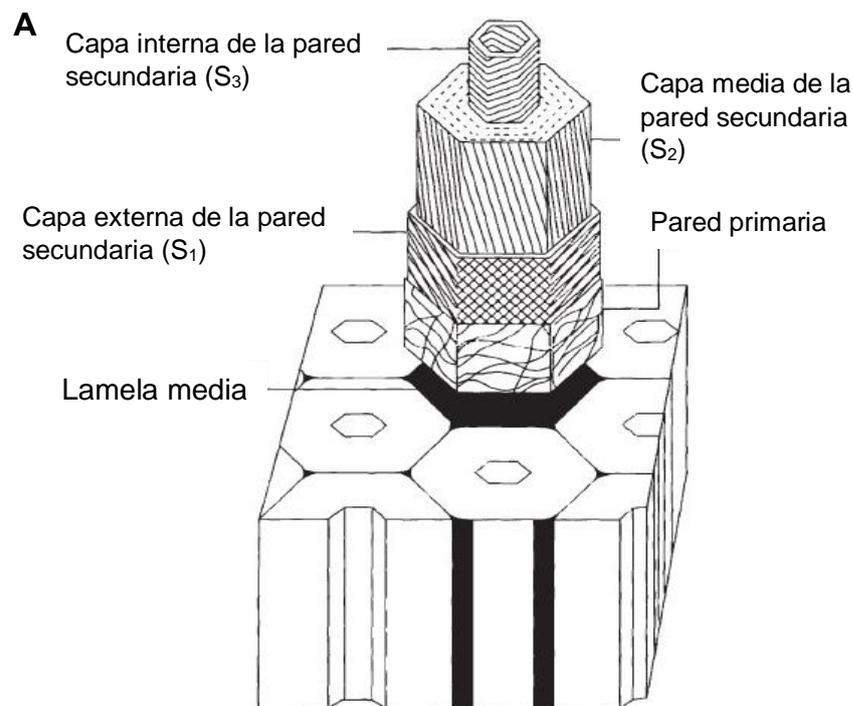


Figura 16. Representación esquemática de la organización de la pared en la célula vegetal. Se indican las tres regiones que componen la pared celular. Tomado y modificado de Doblin et al. (2010).

1. Tipos de pared celular vegetal y composición

Para el estudio de la pared celular vegetal se han propuesto dos modelos distintos de pared celular primaria que van en función de su composición. La pared primaria de las dicotiledóneas, gimnospermas y monocotiledóneas no

comelínidas, corresponden a la pared tipo I, cuya composición consiste en una red de celulosa embebida dentro de una matriz de polisacáridos, de los cuales el xiloglucano (XG) y los polisacáridos pécticos son los más abundantes. En cuanto a la pared primaria de las *Poáceas* y monocotiledóneas comelínidas, son del tipo II, cuya organización es igual a las de tipo I, siendo la principal diferencia que la matriz que envuelve a la celulosa se trata de glucuronoarabinosilanos (GAXs) y (1,3;1,4)- β -glucanos, y que, los niveles de polisacáridos pécticos y el XGs, están en niveles relativamente bajos (Doblin et al., 2010).

La Tabla 4 presenta los diferentes componentes dentro de la pared celular en plantas dicotiledóneas y monocotiledóneas. La Tabla 5 muestra los valores aproximados que presenta cada tipo de planta con respecto a los polisacáridos presentes

Tabla 4. Composición de la pared celular de plantas dicotiledóneas y monocotiledóneas. Tomado y modificado de Himmel et al (2008).

Grupo de plantas	Tipo de pared	
	Pared primaria	Pared secundaria
DICOTILEDÓNEAS (ej.: Sauce, Eucalipto)	Fase fibrilar	
	Celulosa	Celulosa
	Matriz	
	1. Polisacáridos pécticos 2. Xiloglucanos 3. Heterosilanos y (galacto)mananos (en menor cantidad)	1. 4-O-metil-glucuronosilanos 2. Glucomanos
	Compuestos fenólicos	
	Ferúlico esterificado y pequeñas proporciones de ácido <i>p</i> -cumárico	Siringil y guaiacil; pequeñas proporciones de unidades de <i>p</i> -hidroxifenil
MONOCOTILEDÓNEAS		

• No comelinidas (ej.: <i>Agave sisana</i>)	Fase fibrilar	
	Celulosa	Celulosa
	Matriz	
	Como las eudicotiledóneas	Como las eudicotiledóneas
• Comelinidas (ej.: Gramíneas y cereales (<i>Poáceas</i>) ej.: maíz)	Fase fibrilar	
	Celulosa	Celulosa
	Matriz	
	1. Glucuronoarabinosilanos (GAXs) 2. Polisacáridos pécticos 3. Xiloglucanos [(1,3;1,4)- β -glucanos en algunas familias de <i>Poales</i> , incluyendo <i>Poaceae</i>]	1. Glucuronoarabinosilanos (GAXs) 2. (Galacto)glucomananos
	Compuestos fenólicos	
	Ferúlico, pequeñas proporciones de ácido <i>p</i> -cumárico y en algunas ocasiones ácido sinápico, esterificado a GAXs	Como las eudicotiledóneas. Acilado con ácido <i>p</i> -cumárico en <i>Poaceae</i> y <i>Musaceae</i> y ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico en <i>Arecales</i>

Tabla 5. Composición aproximada* (% peso seco) de la pared celular de gramíneas (monocotiledóneas) y dicotiledóneas. Tomado y modificado de Vogel (2008).

Polisacáridos	Pared primaria		Pared secundaria	
	Gramíneas	Dicotiledóneas	Gramíneas	Dicotiledóneas
Celulosa	20-30	15-30	35-45	45-50
Hemicelulosa				
• Xilanos	20-40	5	40-50	20-30
• β -glucanos	10-30	Ausente	>0.1	Ausente

• Xiloglucanos	1-5	20-25	>0.1	>0.1
• Mananos y glucomananos	>0.1	5-10	>0.1	3-5
Pectina	5	20-35	>0.1	>0.1
Compuestos fenólicos				
• Ácido ferúlico y ácido p-cumárico	1-5	0.1	0.5-1.5	>0.1
• Lignina	0.1	0.1	20	7-10

La función que desempeña cada uno de los polisacáridos va en función de la estructura química que presenta, a continuación, se desglosa la naturaleza química de dichos polímeros en relación con la pared celular.

a. Celulosa

La celulosa corresponde al componente más común de pared celular de muchas plantas. Esta macromolécula está constituida de cadenas lineales de D-glucosa unidas mediante enlaces β -1,4, no presenta ramificaciones ni sustituyentes con otros monosacáridos, dando como resultado la formación de complejos microfibrilares no covalentes, a través de extensas interacciones de tipo puente de hidrógeno e hidrofóbicas, tanto inter como intramoleculares (Burton et al., 2010). Los monosacáridos de glucosa son sucesivamente invertidos 180° , formando una cinta plana en la cual las unidades repetitivas se conocen con el nombre de celobiosa (Figura 17) (Taylor, 2008).

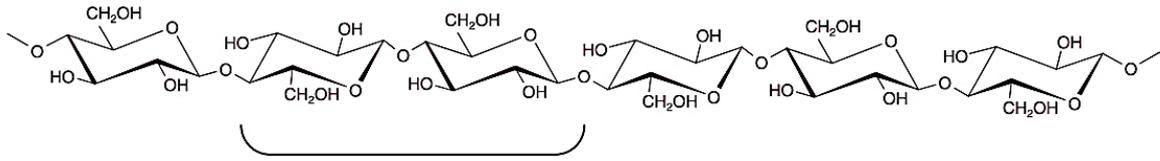


Figura 17. Un fragmento de celulosa (β -1,4-glucano) y se señala una unidad de celobiosa. Tomado y modificado de Taylor (2008).

El grado de cristalinidad y la longitud de las cadenas de celulosa varía, sin embargo, la identidad de la estructura química es la misma en los diferentes tejidos y órganos de las plantas; cada cadena puede tener al menos varios miles de unidades de largo (Burton et al., 2010).

b. Hemicelulosa: GAXs (Glucuronoarabinoxilanos)

Este polisacárido está formado por cadenas lineales de D-xilosa unidas por enlaces β (1,4), con algunas unidades de arabinosa unidas por enlaces glicosídicos en la posición 3 (O-3) y con menos frecuencia, algunas unidades de ácido glucurónico (GlcA), enlazadas O-2 a la cadena principal de xilano (Figura 18). El número de grupos de arabinosa y GlcA a lo largo de la cadena principal varía notablemente, desde estar casi totalmente ramificada hasta solo presentar menos del 10% de sustituciones. Además, algunas unidades de arabinosa están esterificadas con ácidos fenólicos (principalmente ácido ferúlico), mediante el grupo carboxilo de la molécula y el grupo hidroxilo en la posición 5 (O-5) de la arabinosa en el GAXs (Chanliaud et al., 1995; Carpita & Gibeaut, 1993).

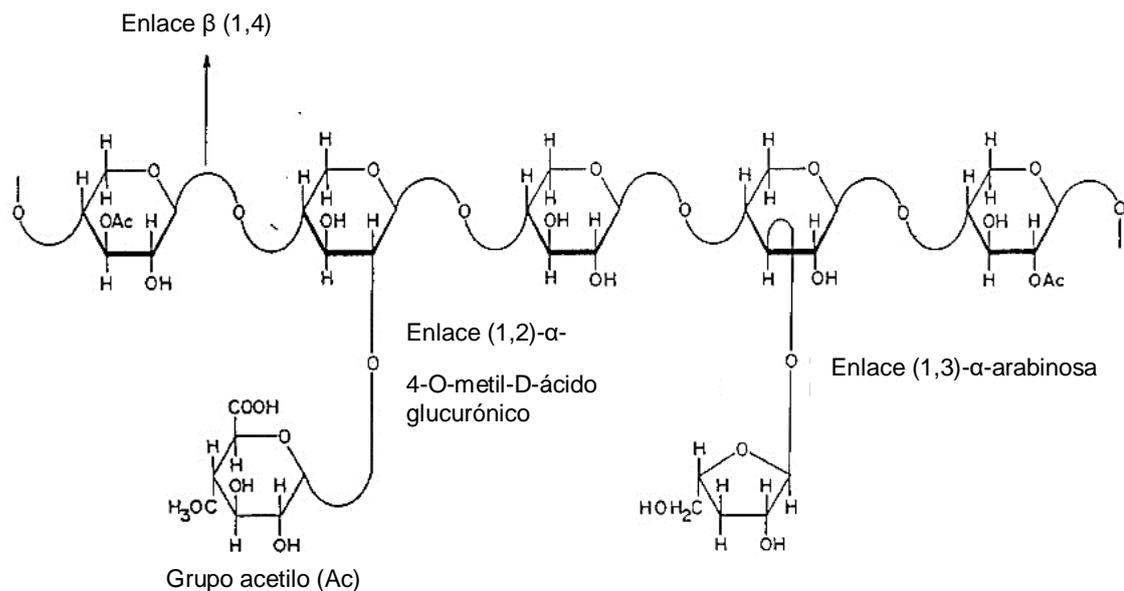


Figura 18. Representación esquemática de la estructura del xilano y algunas de las ramificaciones que presenta. Tomado y modificado de Bastawde (1992).

Los arabinoxilanos de las *Poáceas* consisten en una cadena principal de (1,4)- β -xilano que se encuentra sustituida en su mayoría por residuos de arabinosa (Burton et al., 2010). El porcentaje de los monómeros puede variar, por ejemplo, en el salvado de maíz, la xilosa constituye un 24.3% y la arabinosa, un 17.8% Saulnier et al (1995). El grado de ramificación afecta en gran medida su capacidad de unirse entre sí; la función de este polisacárido es de servir como unión con las microfibras de celulosa (Carpita, 1993).

c. Polisacáridos pécticos

Las pectinas son una familia de polisacáridos de pared celular de plantas ricos en ácido galacturónico unidos covalentemente. El ácido galacturónico (GalA) comprende aproximadamente el 70% de la pectina, y todos los polisacáridos pécticos contiene ácido galacturónico enlazados en las posiciones O-1 y O-4 (Mohnen, 2008).

Las pectinas son las estructuras más complejas de la familia de los polisacáridos en la naturaleza, llegan a formar hasta un ~35% de la pared celular de las dicotiledóneas y las monocotiledóneas no gramíneas, y de 2-10% en la pared de las gramíneas y otras comeliníadas. La pectina es abundante en las paredes que

rodean las células en crecimiento y en división, así como en las paredes de los tejidos más suaves de la planta, y en la lamela media y las esquinas de las células (Mohnen, 2008).

Las pectinas son moléculas extremadamente complejas que incluyen numerosas clases de estructuras, y los principales son: homogalacturonanos (HG), xilogalacturonanos (XGA), apiogalacturonanos (AP) y ramnogalacturonanos, estos últimos comprenden los de tipo I y II (RG-I y RG-II) (Burton et al., 2010) (Figura 19).

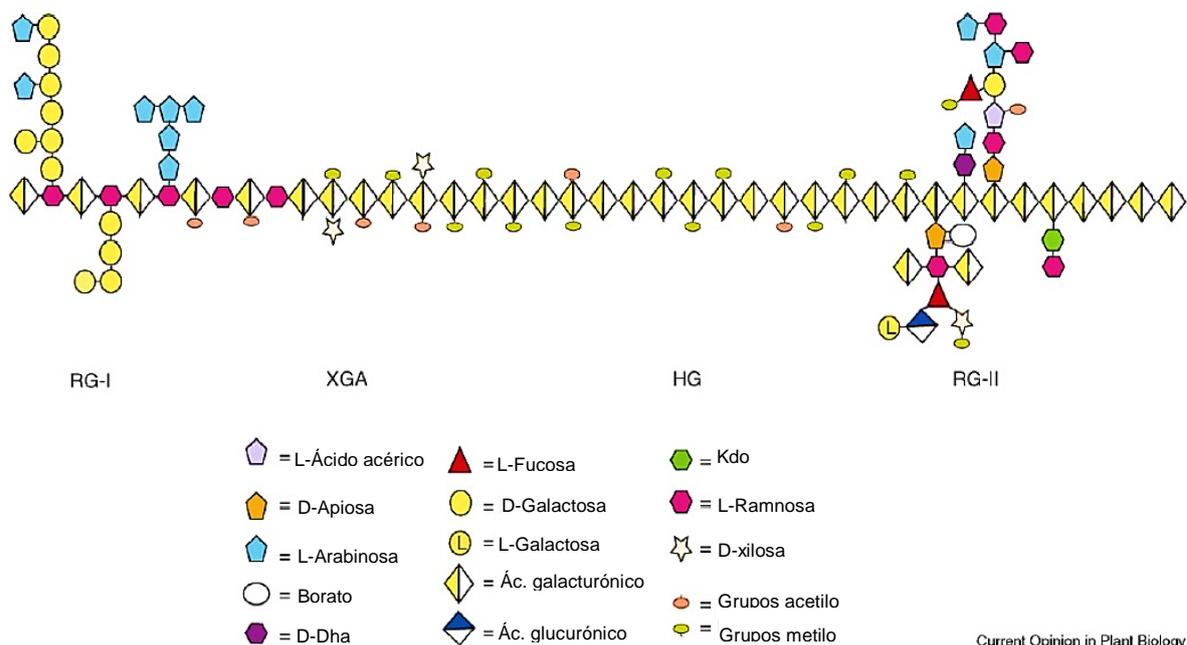


Figura 19. Estructura esquemática de la pectina en el que se muestran los cuatro principales polisacáridos pécticos. RG-I: Ramnogalacturonano I, XGA: Xilogalacturonano, HG: Homogalacturonano y RG-II: Ramanogalacturonano II Tomado y modificado de Mohnen (2008).

c.1. Homogalacturonano (HG)

Este polisacárido péctico es el más abundante de todos, se trata de un homopolímero lineal de ácido galacturónico con enlaces α -1,4 que comprende el ~65% de la pectina (Figura 20). El HG está parcialmente metil-esterificado en la posición C-6 del carboxilo y presenta acetilaciones en las posiciones O-2 o O-3. El HG está presente en tramos de aproximadamente 100 residuos de GalA de longitud, aunque se han detectado regiones más cortas de HG intercaladas entre otros polisacáridos pécticos.

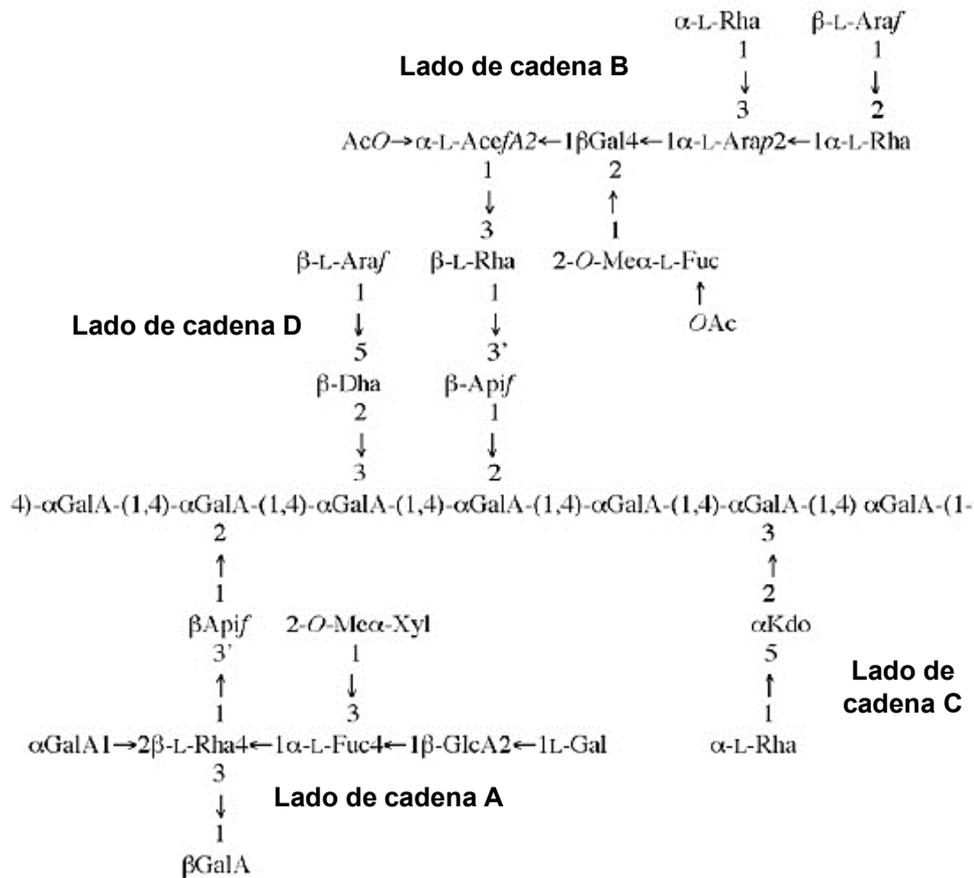


Figura 21. Estructura del Ramnogalacturonano II, se encuentra invariante en la mayoría de las especies de plantas. Tomado y modificado de Mohnen (2008).

2. Degradación enzimática de la pared celular como mecanismo de colonización

La pared celular vegetal es el componente estructural que contiene a la célula, provee soporte a la planta mediante la resistencia a la acción de la presión de turgencia, evitando así sobre-expansión de la célula por la entrada de agua, y también protege contra diversos tipos de estrés. Tiene una función esencial en el control de la forma, la velocidad de crecimiento y de las propiedades mecánicas de las plantas (Martínez-Sanz et al., 2015).

La pared celular es la interfaz para algunas de las primeras interacciones entre las plantas y otros organismos, incluidos insectos, patógenos y simbioses. Desde el punto de vista del patógeno, la pared celular constituye una barrera que limita su acceso al contenido celular, y potencialmente, una fuente de nutrientes. Por ello, cualquier grado de ruptura de la matriz de la pared extracelular del hospedero facilita la entrada de microorganismos patógenos.

El mecanismo mediante el cual los microorganismos pueden desensamblar y utilizar los polisacáridos y demás componentes asociados a la pared celular es por medio de la producción de enzimas líticas. Las enzimas degradadoras de pared celular (CWDE, *Cell-Wall Degrading Enzymes*), son los elementos principales por los cuales los patógenos confrontan la pared celular y para algunos hongos fitopatógenos, son importantes factores de virulencia (Cantu et al., 2008).

La complejidad de la pared celular vegetal se ve reflejada por el diverso arsenal de enzimas degradadoras de pared celular producidas por microorganismos. Cada tipo estructural de CWDE está representada en múltiples familias determinadas a través de la secuencia y similitudes estructurales. La categoría de celulasas (EC 3.2.1.4. & EC 3.2.1.91) está en al menos 12 familias diferentes de glicosil hidrolasas (GH), y las xilanasas (EC 3.2.1.8 & EC 3.2.1.37) en 12 familias de GH (King et al., 2011). Estas enzimas son producidas por muchos de los microorganismos asociados a plantas tanto patógenos como saprófitos.

La relación que tienen los microorganismos con su hospedero está tradicionalmente dividida en tres clases: biótrofos, que viven a expensas de la viabilidad de la célula, los necrótrofos, que se alimentan de la biomasa muerta y los hemibiótrofos, que tiene un estilo de vida mixto, ya que se comportan como biótrofos en etapas tempranas y como necrótrofos al final de su ciclo de vida (Cantu et al., 2008).

Aunque la maceración extensiva del tejido de las plantas suele ser una característica de las infecciones necrotróficas, la descomposición de la pared de la planta no se limita a estos patógenos, y tanto los biótrofos como los necrótrofos secretan diversos CWDE (Cantu et al., 2008). Para entender cómo influyen en la interacción planta-patógeno estos factores de virulencia, se debe entender como las CWDE impactan en la integridad de la pared del hospedero, y la relación que tiene cada tipo de fitopatógeno con la célula vegetal.

a. Patógenos biótrofos

Los organismos biótrofos deben mantener la viabilidad de la célula infectada pues esto es crucial para su supervivencia, para ello su establecimiento al huésped va acompañado de una pequeña lisis de la pared celular. Esto se puede comparar a través de la cantidad de genes que codifican para CWDE, por ejemplo, el hongo biótrofo *Ustilago maydis* tiene una relativa pequeña cantidad de genes CWDEs (33) en contraste con el hemibiótrofo *Magnaporthe grisea* (138) y con el necrótrofo *Fusarium graminearum* (103).

b. Patógenos hemibiótrofos y necrótrofos.

A diferencia de la mayoría de los patógenos biotróficos, los organismos necrotrofos secretan una gran variedad de CWDE dirigidos a múltiples polisacáridos de la pared celular de las plantas, causando una destrucción tisular extensa. A menudo, muchas isoenzimas CWDE con diferencias en la preferencia de sustrato e independiente regulación, pero con el mismo mecanismo catalítico, son producidas y dirigidas efectivamente a diversos polisacáridos de pared estructural. Como resultado de ello, mutagénesis de una o algunas CWDE no necesariamente causa la reducción de la virulencia, pues existe una redundancia enzimática.

Las enzimas que modifican la pectina son requeridas por los patógenos necrótrofos para la virulencia completa, las que incluyen pectato liasas (PLs) y pectin metilesterasas (PMEs); muchas CWDE asociadas con la virulencia son relacionadas con la digestión de la pectina, aunque en trabajos recientes se ha observado que las enzimas que degradan las estructuras de celulosa-hemicelulosa, específicamente el xilano y los xiloglucanos, contribuyen al éxito de algunos patógenos (Cantu et al., 2008).

3. Producción y características de glicohidrolasas por el género *Fusarium*

a. Identidad de glicohidrolasas producidas por *Fusarium*

Fusarium spp secreta una batería de enzimas hidrolíticas capaces de degradar los polímeros de la pared celular que facilitan la invasión del tejido y la

asimilación de los nutrientes liberados. La producción se ha evidenciado a través de la medición de la actividad enzimática utilizando sustratos específicos y por análisis proteómico de las proteínas secretadas.

En un estudio en el que se evaluó la producción de enzimas hidrolíticas para uso potencial en la sacarificación de biomasa celulósica en salvado de trigo por *Fusarium verticillioides* cepa 7600, se obtuvo un perfil de 166 enzimas secretadas (secretoma) de las cuales 57 (34%) corresponden a enzimas con actividad lignocelulolítica. Las CWDE con mayor presencia en este estudio fueron las que degradan pectina y hemicelulosa (Tabla 6; Ravalason et al., 2012).

Tabla 6. Enzimas degradadoras de pared celular en el secretoma de *F. verticillioides* crecido en salvado de trigo sometido a autoclave.

Predicción de la función enzimática	Clasificación CAZy ^a	Proteínas de <i>Fusarium verticillioides</i> ^b
Enzimas degradadoras de celulosa		
1,4 - β -glucosidasa	GH3	FVEG_05521, FVEG_13391, FVEG_13055, FVEG_08890
1,4 - β -glucosidasa	GH1	FVEG_09772
Endo-1,4- β -celulasa	GH61	FVEG_04722
Endo-1,4- β -celulasa	GH5-CBM1	FVEG_12423
Endo-1,4- β -celulasa	GH7	FVEG_01037
Endo-1,4- β -celulasa	GH6-CBM1	FVEG_08825
Enzimas degradadoras de xilano		
1,4 - β -xilosidasa	GH3	FVEG_09861
1,4 - β -xilosidasa	GH39	FVEG_07702
Endo-1,4 - β -xilanasas	GH30	FVEG_13578

Endo-1,4 – β -xilanasa	GH43	FVEG_08605, FVEG_10098, FVEG_13553
1,4 – β -xilosidasa	GH43	FVEG_08345, FVEG_10625, FVEG_13426
α -glucuronidasa	GH67	FVEG_08824
Endo-1,4 – β -xilanasa	GH10	FVEG_12502, FVEG_13343
Endo-1,4 – β -xilanasa	GH11	FVEG_08828
Endo-1,4 – β -xilanasa	GH42-CBM6	FVEG_08344
Enzimas degradadoras de pectina		
α -galactopiranosidasa/ β -arabinopiranosidasa	GH27	FVEG_13077, FVEG_12289
α -galactopiranosidasa	GH27	FVEG_07518
Endo-1,6- β -galactanasa	GH5	FVEG_12299
Exo-1,5- α -arabinasa	GH93	FVEG_13262
Δ -4,5-desaturasa- glucoronil hidrolasa	GH88	FVEG_08342
Ramnogalaturonano liasa	PL4	FVEG_04751
Pectin metil esterasa	CE8	FVEG_12766
Endo-1,4- α - poligalacturonasa	GH28	FVEG_13516
Exo-1,4- α - poligalacturonasa	GH28	FVEG_12744

^a Familia asignada conforme a la base de datos CAZy. GH: glicosilhidrolasa; PL: polisacárido liasa; CE: carbohidrato esterasa; CBM: modulador de unión a carbohidrato.

^b Número provisto por la base de datos de Broad Institute *F. verticillioides*

b. Regulación de glicohidrolasas

La expresión de genes que codifican para estas enzimas está regulada directamente por factores de transcripción que se activan cuando las células son expuestas a los carbohidratos de la pared celular vegetal. Por una parte, las vías que se encargan de sensar a los nutrientes, como por ejemplo las vías que priorizan el uso de fuentes de carbono preferidas actúan corriente arriba de la activación directa de genes que codifican CWDE para así inhibir su producción lo cual demandaría un costo energético alto. Además, algunos factores río abajo actúan regulando la producción y secreción de las glicohidrolasas, esto por retroalimentación del sistema de secreción (Figura 22; Tomado y modificado de Huberman et al., 2016)

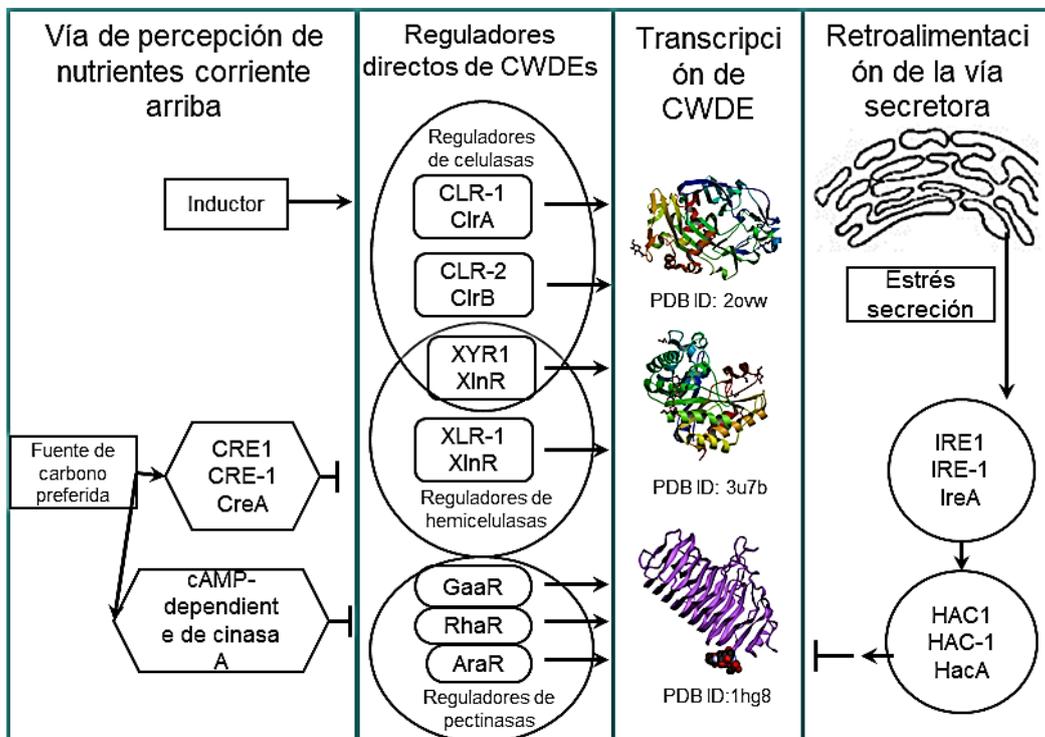


Figura 22. Control de la transcripción de glicohidrolasas en modelos de hongos filamentosos a través de reguladores directos, vías que sensan nutrientes río arriba y por retroalimentación de la vía secretora corriente abajo.

b.1 Regulación transcripcional directa.

Los factores de transcripción primarios en hongos relacionados con la regulación de las vías que sensan nutrientes son frecuentemente factores de transcripción de tipo clúster binucleares de zinc. La transcripción de genes que codifican

enzimas glicohidrolíticas en muchas especies de hongos filamentosos es promovida por este tipo de factores de transcripción. Por ejemplo, en *Trichoderma reesei* y *Aspergillus niger*, los principales regulares transcripcionales de celulasas y hemicelulasas son XYR1/XInR, por otro lado, en *Neurospora crassa* y *Aspergillus nidulans* los factores transcripcionales para los genes de celulasas y hemicelulasas están separados, siendo CLR-2 el que conduce la expresión de genes de celulasas y XLR-1 así como XnIR quienes regulan la degradación de hemicelulosa en *N. crassa*; en el caso de *A. nidulans* las proteínas ortólogas, ClrB y XYR1, son quienes controlan la degradación de celulosa y hemicelulosa respectivamente (Huberman et al., 2016).

En el caso del género *Fusarium* se ha encontrado que XInR es el principal activador transcripcional de genes de xilanasas en *F. oxysporum*, el cual tiene una identidad global del 50% con el factor transcripcional de *A. niger* (Calero-Nieto et al., 2007), por otro lado, en el caso de *F. graminearum* se ha visto que Xyr1 es el principal factor transcripcional que regula los genes que controlan la degradación y utilización de xilano y que además se sugiere que tiene un parcial control con los genes de celulasas (Sella et al., 2016)

Dado que la pectina es un el componente más heterogéneo de la pared celular vegetal, no existe un único factor de transcripción que regule la utilización de este polisacárido. Hay varios factores de transcripción clúster binuclear de zinc. En algunos hongos filamentosos como *Botrytis cinérea* y *A. niger* la utilización del ácido galacturónico está regulada por GaaR, mientras que para *A. niger* y *A. nidulans* la utilización de ramnosa y arabinosa, se regula por RhaR y AraR respectivamente.

b.2 Vía de percepción de nutrientes corriente arriba.

Otro mecanismo que controla la producción de estas enzimas es por medio de la represión catabólica por carbono (RCC), la cual implica la regulación negativa de genes necesarios para el consumo de una fuente de carbono compleja en presencia de una fuente de carbono simple o preferida. En hongos filamentosos la RCC es regulada por factores de transcripción binuclear de zinc, CreA/CRE1/CRE-1. La regulación de estos factores parece ser parcialmente

dependiente de la ubicación intracelular, ya que, bajo condiciones represoras, CreA/CRE1/CRE-1 se encuentra en el núcleo donde puede regular la expresión de sus genes blanco y cuando las condiciones dejan de ser represoras, estos factores de transcripción salen del núcleo. Sin embargo, la regulación genética parece ser más divergente entre hongos filamentosos. Por ejemplo, en *A. nidulans*, la cinasa activada por AMP, SnfA, es necesaria para exportar a CreA al núcleo, pero por otro lado en *T. reesei*, la fosforilación de CRE1 es necesaria para la expresión de sus genes blanco, además de que esta fosforilación no depende del homólogo a SnfA. Durante la utilización de los carbohidratos de la pared celular vegetal, RCC puede activarse no solo por la adición exógena de azúcares, sino que también por medio de los productos de hidrólisis de la pared, por ello el papel de la RCC no sólo se limita a glucosa sino a todo un amplio rango de fuente de carbono preferidas (Huberman et al., 2016). Un ejemplo lo constituye la D-xilosa, este monosacárido juega el papel de inductor y de represor de genes xilanolíticos y celulolíticos en *A. niger*, y esto ocurre por medio de un balance entre la inducción por XlnR y la represión por CreA. Este monosacárido es liberado gradualmente del xilano, lo que da una baja concentración de D-xilosa en el medio y bajo estas condiciones la represión mediada por CreA es baja y se detectan altos niveles de expresión, por otra parte, cuando los niveles de D-xilosa en el medio alcanzan concentraciones de 70 mM, la represión por CreA es más significativa, dando una disminución de los niveles de expresión (Gutiérrez-Rojas et al., 2015)

Para el género *Fusarium* se sabe que la proteína ortóloga CRE1 es quien regula la RCC en *Fusarium oxysporum* y que además esta tiene localización nuclear cuando el hongo es crecido en glucosa, etanol o pectina y esta se ubica en el citoplasma durante el crecimiento en bajas concentraciones de glucosa (0.01%) o cuando crece en glicerol (Jonkers & Rep, 2009)

El mecanismo por el cual la respuesta transcripcional a la RCC se da es por medio de la represión de los genes necesarios para la degradación y consumo de pared celular, así como también en los factores de transcripción que los controlan.

b.3 La regulación postraduccional de glicohidrolasas

Las enzimas degradadoras de pared celular una vez transcritas y traducidas continúan con su regulación por medio de la vía secretora. Las glicohidrolasas nacientes son enviadas a retículo endoplásmico (ER) para ser clasificados y procesados para su secreción. Dado el incremento de flujo de proteínas en la vía secretora se produce un significativo estrés en el ER por la necesidad de plegar, formar puentes disulfuro, glicosilar y ordenar a las proteínas. Para hacer frente a esto se ha visto que en hongos la secreción de enzimas glicohidrolíticas va acompañada de la activación de varios mecanismos de retroalimentación, que son: la respuesta a proteínas no plegadas (UPR, por sus siglas en inglés), la degradación asociada a ER (ERAD, por sus siglas en inglés) y la represión transcripcional bajo condiciones de estrés.

El mecanismo por el cual actúa UPR está altamente conservado en hongos y el que está bien caracterizado es el de *Saccharomyces cerevisiae*, donde la acumulación de proteínas sin plegar en el ER activa Ire1 una proteína de membrana de ER que tiene actividad de endonucleasa y cuando se activa Ire1, este corta intrones no canónicos del RNAm del factor transcripcional de zipper de leucina (HAC1). En caso contrario en que Hac1 sea eficientemente traducido activa la transcripción de un amplio set de genes que permiten mejorar la capacidad de plegamiento en el ER y así hacer más eficiente el tráfico de proteínas. Un papel similar para IRE1 y HAC1 se han encontrado ortólogos en UPR en varias especies de hongos filamentosos.

c. Proceso de inducción y secreción.

Por último, para ejemplificar como ocurre la inducción de una glicohidrolasa de pared celular se tomará como ejemplo la de las celulasas del hongo modelo *T. reesei*. La expresión de celulasas por medio de celulosa no es algo trivial pues este sustrato es de naturaleza insoluble, entonces la hidrólisis de dicho material constituye un proceso más elaborado. En *T. reesei* los productos de la hidrólisis de la celulosa no actúan del todo como inductores de celulasas, pues la glucosa la reprime y la celobiosa induce muy pobremente. Sin embargo, se ha reportado que la soforosa (β -D-glucosa-[1,2]-D-glucosa) es capaz de inducir 2 500 veces

más la expresión de celulasas en comparación con la celobiosa, la presencia de soforosa se da por medio de la actividad de una β -glucosidasa constitutiva localizada en la membrana plasmática. Se ha propuesto un modelo para describir como ocurre esta inducción y posterior hidrólisis de este polisacárido en el que se comprenden seis etapas. La primera es que los conidios entran en contacto con la celulosa y las celulasas en su superficie la degradan a oligosacáridos, que son hidrolizados a glucosa y transglucosilados a soforosa por una β -glucosidasa constitutiva. En segundo lugar, los conidios germinan y la glucosa y la soforosa entran a la célula, una como fuente de carbono y la otra como inductor. Tercero, la soforosa induce la síntesis de celulasas que son secretadas fuera de la célula. Cuarto, las celulasas secretadas degradan celulosa causando un aumento de la cantidad oligosacáridos y glucosa, Quinto, la glucosa es asimilada, los celooligosacáridos son hidrolizados a glucosa y transglucosilados a soforosa y sexto, el ciclo continúa hasta que el sustrato se agota o el sistema es reprimido (Gutiérrez-Rojas et al., 2015). En la Figura 23 se muestra un esquema de la expresión de genes celulolíticos en micelio expuesto a celulosa y los reguladores implicados en dicho proceso.

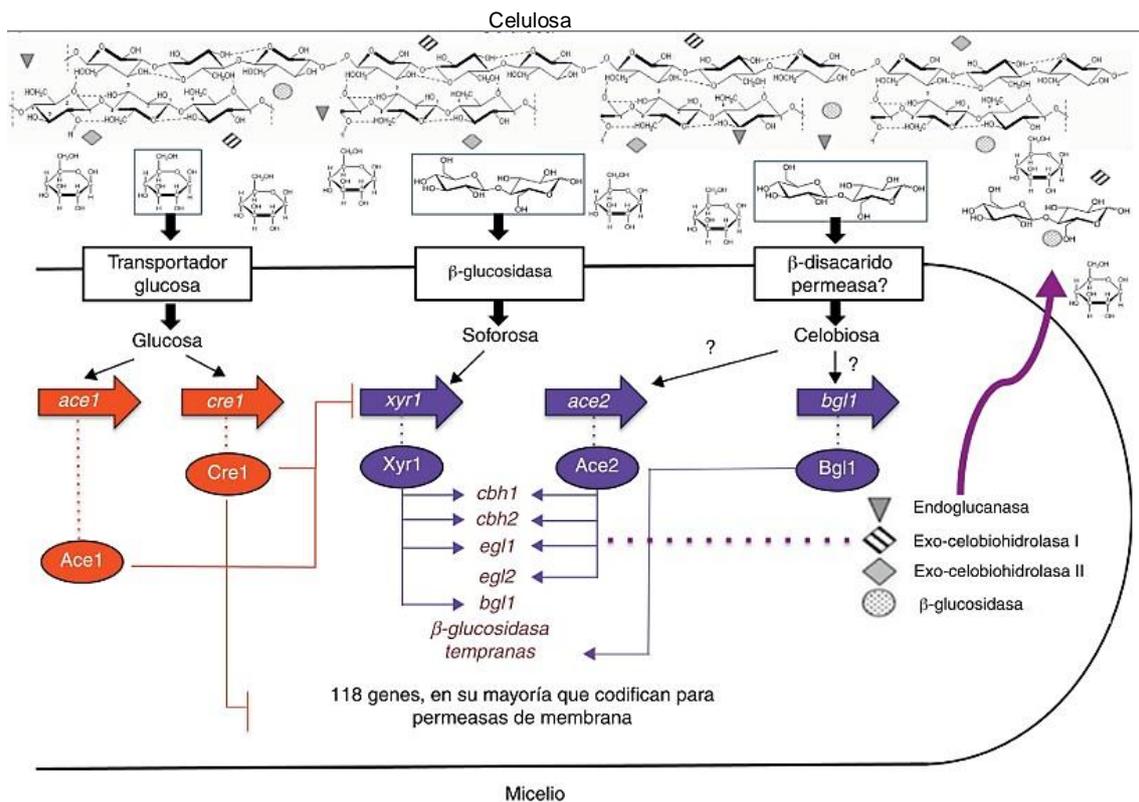


Figura 23. Modelo para la regulación de celulasas en *T. reesei*. Las flechas naranjas muestran los genes de los factores de transcripción encargados de la RCC y las flechas moradas indican los genes de los factores de transcripción que activan para genes de glicohidrolasas, así los óvalos naranjas y morados los productos de dichos genes (Gutiérrez-Rojas et al., 2015).

d. Presencia y actividad de glicohidrolasas en tejido vegetal.

La secreción de estas enzimas se ha asociado con los síntomas del marchitamiento vascular en plantas; enfermedad causada por el género *Fusarium*. En un estudio en el que se evaluó el proceso de infección de *F. verticillioides* en plantas de coliflor (*Brassica oleracea*) y tomate (*Lycopersicon esculentum*), se encontró que después de 4-8 días se observaba signos de descomposición en las puntas de las raíces y el hipocótilo, además del desprendimiento del tejido cortical. En estos tejidos se encontraron actividades elevadas de algunas CWDE (Tabla 7; Niture & Pant, 2007).

Tabla 7. Producción de diferentes CWDE por *Fusarium verticillioides* en tejido infectado de tomate y coliflor (Niture & Pant, 2007).

Tejido	Exp.	Celulasas (U/g)	Xilanasa (U/g)	PG (U/g)	PL (U/g)
Tomate					
Hipocótilo	C	0.021	0.041	0.025	0.031
	F	1.21	2.31	2.55	0.08
Raíz	C	0.031	0.028	0.051	0.041
	F	3.8	4.2	4.67	1.32
Coliflor					
Hipocótilo	C	0.08	0.03	0.044	0.068
	F	2.23	1.87	1.2	1.74
Raíz	C	0.044	0.054	0.012	0.043
	F	3.61	2.34	1.57	2.74

C: Tejido control; F: Tejido infectado; PG: Poligalacturonasa; PL: Pectato liasa

Estudios funcionales mediante la generación de mutantes para determinar el papel de estas enzimas en la patogénesis no han sido exitosos debido a que hay múltiples genes para cada una de estas actividades (Tabla 6).

III. ANTECEDENTES

En tejidos de maíz se ha estudiado el efecto de la enfermedad causada por *Fusarium verticillioides*. Galeana-Sánchez (2017), evaluó la severidad de daño a tallos de maíz inoculados con diferentes cepas, catalogadas como de alta, moderada y baja producción de FB1. El daño observado (Figura 24) se relaciona con la producción de toxina por parte del hongo, ya que las cepas con alta y moderada producción de toxina (MY3 y H-135-1, respectivamente) son las que desarrollaron una mayor área de necrosis y una decoloración de color canela en tallo interno. Sin embargo, las cepas con baja capacidad de producción presentaron capacidad de colonizar el tejido y causar daño. La Figura 25a muestra que las cepas H-135-1 y MY3 mantiene una relación de siete veces mayor número de conidios en embrión que las cepas MY5 y PAL1, y que, para los niveles de ergosterol, lípido de membrana de hongos, la diferencia es menos marcada entre cada una de las cepas de *F. verticillioides* (Figura 25b).

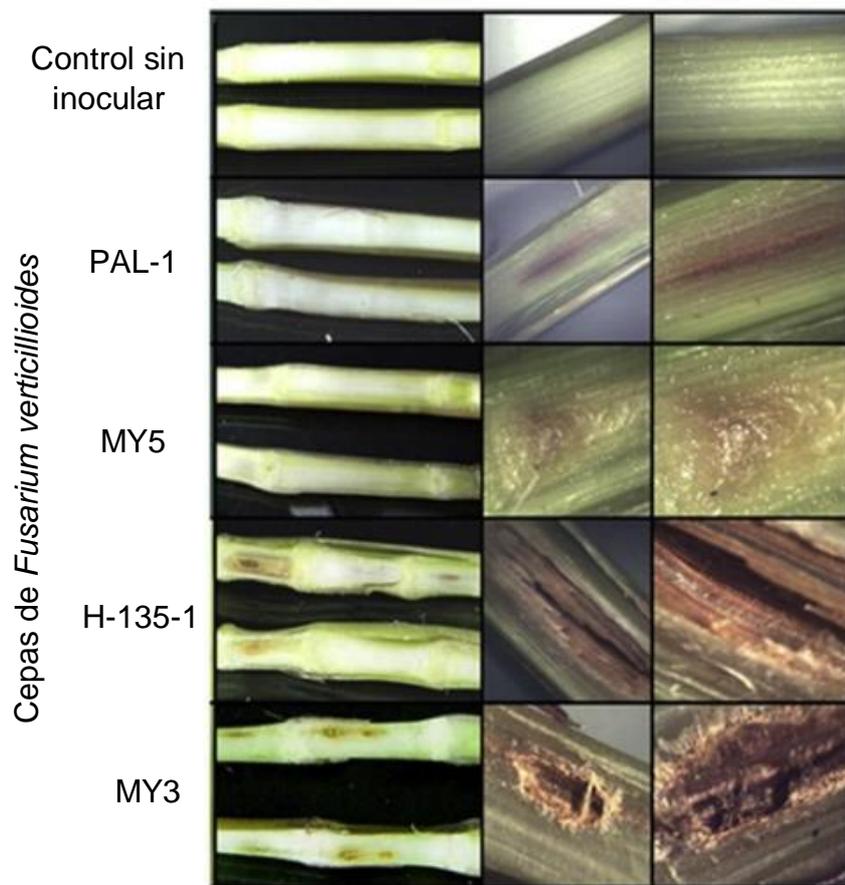


Figura 24. Síntomas de la infección de tallos de maíz por cuatro cepas de *F. verticillioides*. Tres semanas después de la infección por cepas de *F. verticillioides* (PAL-1, MY5, H-135-1 y MY3) por punción con 5×10^4 conidias. Los tallos fueron cortados longitudinalmente y se registraron los síntomas (Galeana-Sánchez et al., 2017).

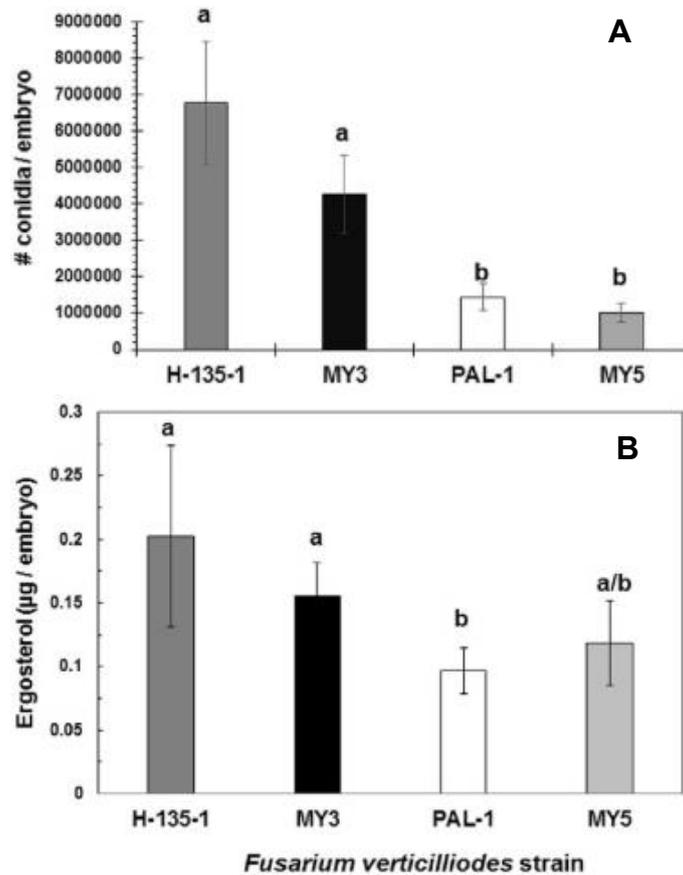


Figura 25. Colonización fúngica de embriones de maíz por cuatro cepas de *F. verticillioides*. **A.** Conteo de conidios por embrión de maíz. **B.** Niveles de ergosterol en embriones de maíz (Galeana-Sánchez et al., 2017).

Estas observaciones sustentan la hipótesis para estudiar la capacidad que tiene estas cepas de *F. verticillioides* para colonizar y causar con ello enfermedad, dichos factores de virulencia podrían estar implicados en la facilitación de la invasión a tejidos de maíz.

IV. HIPÓTESIS

Si las cepas de *Fusarium verticillioides* que producen bajas cantidades de FB1 son capaces de infectar tejido de maíz entonces contarán con otros mecanismos como lo son las glicohidrolasas de pared celular.

V. OBJETIVOS GENERALES Y PARTICULARES

Objetivo general: Producir enzimas glicohidrolíticas en cepas de *Fusarium verticillioides* las cuales difieren en su capacidad de síntesis de FB1. Evaluar la relación que mantiene la FB1 con los otros factores de virulencia de *Fusarium verticillioides*

Objetivos particulares:

1. Producir CWDE en *Fusarium spp* mediante su capacidad de crecer en medios de cultivos suplementados y midiendo la actividad de enzimas asociadas a la degradación de la pared celular.
2. Evaluar el efecto de la fuente de carbono sobre la producción de FB1 por *Fusarium verticillioides*.
3. Observar el efecto de la FB1 sobre la actividad de glicohidrolasas de *Fusarium verticillioides*.

A. Material biológico: cepas de *Fusarium verticillioides* y *Fusarium oxysporum*

Se utilizaron cuatro distintas cepas de *Fusarium verticillioides* (MY3, MY5, H135-1 y PAL1) aisladas de mazorca de maíz de diferentes partes de México (Sánchez-Rangel, *et al.*, 2005), cuya característica es producir cantidades variables de FB1 (Galeana-Sánchez *et al.*, 2017) y una cepa de *Fusarium oxysporum*, aislada de raíces de plantas de *Agave tequilana* perteneciente a la Colección de Hongos Fitopatógenos del laboratorio 101 del Depto. de Bioquímica.

1. Preparación del medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (PDA) para las cepas de *Fusarium spp.*

Para preparar el medio PDA al 0.5X, se mezclaron en 250 mL de agua 4.875 g de PDA (Sigma-Aldrich) y 1.125 g de agar. Se esterilizó con calor húmedo (14 psi, 121 °C por 20 min) y se distribuyó en 10 cajas Petri (Galeana-Sánchez, 2014)

2. Crecimiento de *Fusarium spp*

Las cepas de *Fusarium sp.* almacenadas en sustrato de turba de musgo/vermiculita (Windels *et al.*, 1988) a -20°C se inocularon en medio PDA y se incubó a 28°C bajo luz fluorescente por 8-10 días. A partir de este se tomó un cubo de 1 cm³ y se resembró en medio PDA que se incubó bajo las mismas condiciones por 10 días para coleccionar conidias.

3. Preparación del inoculo y conteo de conidios.

Se utilizaron cultivos de aprox. 10 días de crecimiento de las cepas de *Fusarium spp* crecidas en medio PDA, se les adicionaron de 5 a 10 mL de agua estéril (dependiendo del crecimiento) y se dejaron en agitación (150 rpm) a temperatura ambiente por 90 min. Se hizo una recolección del líquido

de las cajas con punta estéril y este se colocaron en tubos de 16 x 150 mm (Galeana-Sánchez, 2014). Para el conteo de conidios se usó una cámara de Neubauer y con un microscopio óptico se contaron los conidios de los cuatro cuadrantes de las esquinas. La ecuación para calcular la concentración de conidios es la que se presenta:

Cálculo de concentración

$$C = \bar{x}(F.D.) \left(10 \frac{\text{conidios}}{\mu\text{L}} \right)$$

Donde:

\bar{x} = promedio de los cuatro cuadrantes

F.D. = factor de dilución

Se utilizaron concentraciones de entre 10^4 conidios/ μL - 10^6 conidios/ μL para los diferentes experimentos.

B. Evaluación de la actividad de glicohidrolasas en cepas de *Fusarium spp*

Para evaluar la actividad de glicohidrolasas en cepas de *Fusarium spp*, se realizaron diferentes pruebas, primero para comprobar la presencia de dichas enzimas de manera indirecta a partir del crecimiento de *Fusarium spp* en medios con diferentes sustratos y después midiendo directamente la actividad enzimática presente en extractos de proteína intracelular y extracelular.

1. Crecimiento de cepas de *Fusarium spp* en agar con diferentes fuentes de carbono.

Se inocularon suspensiones de 10^4 conidios de *Fusarium spp* en discos de papel filtro estéril de 0.7 cm de diámetro (aprox. un volumen de 10-20 μL), que se colocaron en los medios de agar con distintas fuentes de carbono, la composición de cada medio se especifica en la Tabla A1 del Anexo. Éstos se incubaron a 28°C bajo luz fluorescente por 10 días y durante ese periodo de tiempo se midió el diámetro de crecimiento cada 24 h posterior a su inoculación.

El parámetro cinético del crecimiento de *Fusarium spp* que describe su comportamiento en la fase logarítmica de crecimiento en medio sólido fue μ , el cual se obtuvo al sacar la pendiente de los datos en fase exponencial del crecimiento, de acuerdo con la siguiente expresión.

$$x_t = x_0 e^{\mu t}$$

$$\ln x_t = \mu t + \ln x_0$$

(Stanbury, 2017, p. 22)

Donde:

X= diámetro de crecimiento en fase exponencial (cm)

μ = velocidad de crecimiento específica (h^{-1})

2. Evaluación de la actividad de glicohidrolasas en cepas de *Fusarium spp* en medio sólido.

Se realizó un ensayo de difusión radial en gel en medios que contenían 0.8% de agarosa (p/v) y 0.5% de pectina de manzana (p/v) disuelto en amortiguador de acetatos pH 6 y suplementados con tetraciclina (10 mg/mL). Los medios se inocularon con suspensiones de 10^4 conidios en discos de papel filtro de 0.6 cm de diámetro. Después de 72 h de incubación a 29° C las placas de agarosa fueron reveladas con CTAB al 1% para detectar la actividad de PG, donde se visualizó la apariencia de un halo. Una unidad de difusión fue definida como la cantidad de enzima que produce un halo de 0.5 cm de radio (externo al pozo de inoculación) (Paccanaro, 2017; Hankin & Anagnostakis, 1975).

3. Ensayos de actividad de glicohidrolasas en proteína intracelular de cepas de *Fusarium spp* crecidas en medio líquido con glucosa como fuente de carbono.

a. Medio de cultivo

En matraces de 125 mL con tapón de rosca se adicionaron 30 mL de medio de cultivo GYAM (Tabla A3; Bojja et al., 2004). Para preparar 100 mL de medio GYAM se disolvieron 0.67 g de ácido málico y 0.05 g de extracto de levadura en 50 mL de agua desionizada y se mezcló con 10

mL de Stock de sales GYAM (Tabla A4; Bojja et al., 2004). Esta mezcla se esterilizó (14 psi, 121 °C por 20 min) y una vez estéril se dejó enfriar a temperatura ambiente. Finalmente, se adicionaron 20 mL de una solución de glucosa 0.6 M y 20 mL de una solución de asparagina 40 mM, ambas esterilizadas por microfiltración en membranas Millipore de 0.22 µm. Las concentraciones finales del medio se encuentran en la Tabla A3 del Anexo.

b. Condiciones de incubación

Los matraces se inocularon con suspensiones de 10^5 conidios e incubados por 7 días a 30° C en agitación (200 rpm), excepto el cultivo de la cepa PAL-1 de *F. verticillioides*, cuya incubación prescindió de agitación y se mantuvo estático bajo las mismas condiciones de temperatura ya que se observó que esta cepa no crece en agitación.

c. Extracción de proteína intracelular

Del crecimiento en medio de cultivo líquido GYAM, se hizo la separación los componentes por filtración al vacío con embudo Buchner utilizando una gasa estéril. La biomasa recolectada en la gasa fue trasferida a un mortero y este se molió con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino. Se adicionaron 750 µL de amortiguador de extracción (Tabla A5, Anexo) fueron mezclados con el pistilo hasta obtener una pasta. El macerado se transfirió a tubos Eppendorf de 1.5 mL. Los tubos se centrifugaron en microfuga MiniSpin Eppendorf a 13,400 rpm a 4°C por 5 min. Se colectó el sobrenadante en tubos Eppendorf de 600 µL y se guardaron a -20°C para posteriores experimentos.

d. Cuantificación de proteína por el método de Bradford (Bradford, 1976)

Se elaboró una curva estándar de albumina sérica bovina (BSA) como se indica en el Apéndice. Cada punto de la curva patrón se hicieron

triplicados técnicos y en el caso de las muestras duplicados. Se ocupó 20 μL de muestra (dependiendo del análisis se ocuparon distintos volúmenes de muestra) y se utilizó como blanco de éstas el amortiguador de extracción de proteínas. La cantidad de proteína de cada análisis se obtuvo extrapolando la absorbancia de las muestras con el de la curva patrón, la lectura de la absorbancia se hizo a $\lambda = 595 \text{ nm}$ en placas de ELISA de 96 pozos. Un ejemplo de curva patrón se encuentra en la Figura A1 del Anexo

e. Determinación de la actividad enzimática específica de celulasas y pectinasas por el método de DNS

La actividad de celulasas y pectinasas se determinó mediante el análisis de azúcares reductores por su reacción con el ácido dinitro salicílico (DNS; Paccanaro, 2017), usando D-(+)-glucosa (Sigma Aldrich) como estándar. Los azúcares reductores liberados se midieron después de incubar 50 μL de extracto proteico en una mezcla total de 200 μL que contenía acetil celulosa (5.0 mg/mL) o pectina de manzana (5.0 mg/mL) disuelto en un buffer de acetatos pH 5, las mezclas de la reacción y los blancos se muestran en la Tabla A10 del Anexo. Se incubaron a 30°C por 14 h a 200 rpm y a 30°C por 2 h a 200 rpm para medir actividad de celulasas y pectinasas, respectivamente. Se definió una unidad de celulasas o pectinasas como la cantidad de enzima requerida para liberar 1 μmol de carbohidrato reductor equivalente a glucosa en un 1 min, bajo las condiciones de ensayo.

4. Ensayos de actividad de glicohidrolasas en cepas de *Fusarium spp* crecidas en medio liquido suplementado con distintas fuentes de carbono

a. Medios de cultivo

- Celulosa y pectina (Szécsi, A., 1990), como fuentes de carbono.

Para preparar 170 mL de medio de cultivo de acetil celulosa o pectina de manzana como fuentes de carbono, se esterilizaron 153 mL de agua desionizada más 17 mL de solución de Stock de sales Szécsi (Tabla A2;

Szécsi, A., 1990) y una vez estéril y frío se adicionó 170 μ L de tetraciclina (10 mg/mL) y la fuente de carbono. Para prevenir contaminación, la acetil celulosa y la pectina de manzana se expusieron con luz UV de longitud de onda corta (280 nm), durante 24 min y la mezcla resultante se agitó hasta obtener una suspensión homogénea. Se adicionó 30 mL por cada matraz de 125 mL con tapón de rosca.

- Hemicelulosa (Bertonha et al., 2018), como fuente de carbono.

El medio de cultivo se preparó por cada matraz de 125 mL con tapón de rosca a los cuales se le adicionaron 25 mL de agua desionizada más 500 μ L de solución Stock de sales Vogel modificado cuya composición se presenta en la Tabla A7 del Anexo (Vogel, 1956). Éste se agitó para homogeneizar y después se le agregó 1.5 g de salvado de trigo y esta mezcla se esterilizó en autoclave (14 psi, 121 °C por 20 min).

b. Condiciones de incubación

Los medios de cultivo con acetil celulosa y pectina de manzana se inocularon con un cubo de agar del cultivo en PDA de aprox. 1 cm³ de una placa de 10 días de crecimiento y se mantuvieron con agitación (200 rpm) por 7 días a 30°C. El medio con salvado de trigo fue inoculado con una suspensión de conidios 10⁶ y se incubó por 7 días bajo luz fluorescente a 29°C en estático.

c. Obtención de enzimas extracelulares

Después de la incubación, los medios de cultivo con acetil celulosa y pectina fueron centrifugados a 3,200 rpm, 5°C por 15 min y el sobrenadante fue separado por decantación en un tubo Falcon de 50 mL y éste se filtró al vacío con un embudo Buchner haciéndolo pasar por membranas Millipore de 0.45 μ m. El volumen recuperado se colocó en tubos Falcon de 50 mL; para ayudar a preservar las muestras se colocaron 3 mL de glicerol (25%) por cada 10 mL de muestras. Esta

mezcla se sometió a liofilización y el volumen obtenido se almacenó a -20°C para ensayos posteriores.

El medio de cultivo con salvado de trigo se filtró al vacío a través de un embudo Buchner haciéndolo pasar a través de gasas estériles para separar la biomasa y el salvado de trigo remanente. Se obtuvo un primer filtrado (F1), éste se centrifugó a 3,200 rpm, 5°C por 5 min y se separó en tubos Falcon la fracción soluble del sedimento por decantación. Por último, se hizo pasar F1 por una membrana Millipore de 0.22 µm, obteniendo con ello el segundo filtrado (F2), el cual se almacenó a -20°C para posteriores ensayos.

d. Determinación de la actividad enzimática específica de celulasas, pectinasas y xilanasas

La actividad de celulasas y pectinasas se determinó por el método de azúcares reductores (DNS), como se describió anteriormente.

La actividad de xilanasas de la proteína extracelular de cepas de *Fusarium spp* fue medida por medio de la utilización de un sustrato sintético, RBB-xilano (Sigma-Aldrich; Biely et al., 1988). Se realizaron tres réplicas técnicas para los ensayos de actividad y para el blanco de reacción. Se utilizó 200 µL de F2 que se mezcló con 200 µL de amortiguador MES pH 6.5 y se adicionó 50 µL de reactivo RBB-xilano, esta mezcla se agitó por unos segundos en vórtex para homogeneizar los componentes y después se incubó a 40°C por 10 min en estático. Una vez transcurrido el tiempo se adicionó 900 µL de etanol absoluto y se mantuvo a temperatura ambiente de 20-25 min, seguido de esto se centrifugó en microfuga MiniSpin Eppendorf por 5 min a 13,400 rpm y 4°C. El blanco de reacción se trató de la misma manera, sustituyendo la muestra (F2) por medio de cultivo sin inocular. La lectura se hizo en placas de ELISA a una longitud de onda de 595 nm. Y se definió como una unidad de actividad de xilanasas como la cantidad de enzima que

libera colorante RBB produciendo así absorbancia a 595 nm por un minuto.

C. Relación de los factores de virulencia en *Fusarium verticillioides*

Para analizar la influencia de la actividad enzimática (pectinasas) por parte de *Fusarium verticillioides* cepa MY3 con la capacidad de producción de la toxina FB1, y de esa manera vislumbrar la posible correlación de los diferentes factores de virulencia producidos por este fitopatógeno, se realizó un análisis de la producción de FB1 en medios suplementados con diversas fuentes de carbono. Así mismo, se evaluó la actividad pectinolítica de *F. verticillioides* MY3 en presencia de diferentes concentraciones de FB1.

1. Efecto de la fuente de carbono en la producción de fumonisina B1 en *Fusarium verticillioides*, cepa MY3

a. Medios de Cultivo

Se utilizaron medios de cultivo en los que se varió la fuente de carbono utilizada, éstas fueron: glucosa, galactosa, pectina y salvado de trigo, teniendo un medio líquido basal que consistió en solución de sales Szécsi (Tabla A2; Szécsi, 1990) extracto de levadura y ácido málico. Las concentraciones de cada componente se especifican en la Tabla A11 del Anexo

Para preparar 125 mL de medio glucosa, se mezclaron 12.5 mL de stock 10X de sales Szécsi con 101 mL de agua desionizada y se disolvieron 62.5 mg de extracto de levadura y 0.838 g de ácido málico, esta mezcla se esterilizó por autoclave. Una vez frío y estéril se disolvieron 11.5 mL de glucosa al 0.6 M y esta disolución se repartió en matraces de 125 mL con tapón de rosca, 25 mL por cada matraz.

En el caso del medio galactosa, se mezclaron 12.5 mL de stock 10X de sales Szécsi con 100 mL de agua desionizada y se disolvieron 62.5 mg de extracto de levadura y 0.838 g de ácido málico, esta mezcla se esterilizó por autoclave. Una vez frío y estéril, se disolvieron 12.5 mL de

galactosa al 0.55 M y esta disolución se repartió en matraces de 125 mL con tapón de rosca, 25 mL por cada matraz.

Para preparar 125 mL de medio pectina, se mezclaron 12.5 mL de stock 10X de sales Szécsi con 112.5 mL de agua desionizada y se disolvieron 62.5 mg de extracto de levadura y 0.838 g de ácido málico, esta disolución se esterilizó por autoclave. Una vez frío y estéril se le adicionó 125 μ L de tetraciclina (10 mg/mL) y 1.25 g de pectina de manzana que fue sometida con anterioridad a luz UV de longitud corta por 24 min, se hizo una agitación vigorosa para poder disolver el sustrato.

El medio con salvado de trigo se preparó por cada matraz de capacidad de 125 mL para un volumen total de medio de 25 mL. Se mezcló 2.5 mL de stock 10X de sales Szécsi con 22.5 mL de agua desionizada y se agregaron 12.5 mg de extracto de levadura y 167.6 mg de ácido málico, esto se agitó para homogeneizar la disolución y se agregó por último, 1.5 g de salvado de trigo. Esta mezcla se esterilizó por autoclave (14 psi, 121 °C por 20 min).

b. Condiciones de incubación

Los medios suplementados con las distintas fuentes de carbono se inocularon con 10^6 conidios de la cepa MY3 de *F. verticillioides*. El medio con salvado de trigo, galactosa y glucosa se incubaron por 7 días bajo luz fluorescente a 29°C en estático, mientras que los suplementados con pectina se incubaron a 30°C a 200 rpm. Al término del periodo de incubación se separó el medio de cultivo de la biomasa fúngica, como se describe arriba para los distintos tipos de sustrato.

c. Cuantificación de FB1 en medios suplementados con diferentes fuentes de carbono mediante HPLC

El sobrenadante de cada medio fue utilizado para medir la cantidad de FB1 presente a través de cromatografía de líquidos de alta resolución

(HPLC) conforme a Sánchez-Rangel et al. (2012). La cromatografía es un método físico de separación basado en la distribución de los componentes de una mezcla entre dos fases inmiscibles, una estacionaria y otra móvil. El flujo de la fase móvil a través de la columna se hace a altas presiones.

En la detección de FB1 se utiliza el grupo amino de la estructura de la fumonisina, formando un complejo por derivatización con α -ftaldialdehído (OPA) y β -mercaptoetanol. El complejo formado es capaz de emitir fluorescencia, que posteriormente es medida con un detector de fluorescencia.

d. Preparación de la curva patrón y las muestras

Para preparar el agente de derivatización, se pesaron 2 mg de OPA que fue disuelto en 400 μ L de metanol grado HPLC y diluido con 2 mL de amortiguador de boratos 50 mM (pH 9.7), y se le añadió 3 μ L de β -mercaptoetanol. Este reactivo fue preparado en un frasco ámbar para proteger de la luz y fue almacenado en hielo.

Para la mezcla de reacción se ocupó una alícuota de 25 μ L de agente de derivatización que fue adicionado a un tubo eppendorf de 600 μ L que contenía 10 μ L muestra o de estándar de FB1, estos se mezclaron en vórtex y se mantuvieron a temperatura ambiente por 3 min, después se le añadió 465 μ L de acetonitrilo-agua (1:1) y se mantuvo en hielo.

La curva patrón se realizó a partir de estándares de FB1 (Sigma-Aldrich), cuyas concentraciones fueron 12.5, 25, 50 y 100 μ M. Para los estándares y las muestras se realizaron las diluciones correspondientes utilizando acetonitrilo-agua (1:1) de las cuales se tomó 20 μ L para inyectar en el HPLC. La preparación de cada uno de los puntos en la curva patrón se muestra en la Tabla A12 del Anexo

e. Condiciones de análisis

Se ocupó como fase estacionaria una columna de Pursospher® RP-18 de 15 cm por 4.6 mm y tamaño de partícula de 5 µm. En el caso de la fase móvil se utilizó una mezcla metanol (grado HPLC) y buffer de fosfatos 50 mM (pH 3) a una proporción de 75:25 (v/v). En el sistema de flujo se ocupó una bomba a 1.2-1.5 mL/min y a presión de 102 kgf/cm². El HPLC fue acoplado a un detector de fluorescencia (Shimadzu, RF-10AXL) programado a una longitud de onda de excitación de 335 nm y a una de emisión de 440 nm. Las condiciones del detector y del integrador se encuentran en las Tablas A13 y A14 del Anexo

Para la identificación de fumonisina B1 se realizó una comparación de los tiempos de retención de los derivados fumonisina B1-OPA en los medios de cultivo con respecto a los observados en los estándares de fumonisina B1.

2. Efecto de la fumonisina B1 en la producción de la actividad pectinolítica en *Fusarium verticillioides*, cepa MY3

a. Medio de cultivo

Se ocupó el medio líquido suplementado con pectina de manzana (Szécsi, 1990) cuya composición se especifica en el Apéndice. Se preparó un matraz con 100 mL del medio de acuerdo con el procedimiento antes descrito (4.a Medio de cultivo. Pectina de manzana como fuente de carbono) y se repartió en cuatro matraces de 25 mL con tapón de rosca, cada uno con 20 mL de medio. A estos se les adicionaron 50 µL, 100 µL y 200 µL de una disolución stock de FB1 con concentración de 2 mM, para lo cual quedaron con una concentración final de 5, 10 y 20 µM de FB1, respectivamente, y dejando a un matraz sin adición de FB1 (0 µM FB1). Se agitaron para homogenizar y se repartieron en cuatro tubos de ensayo de 16x150 mL con tapón de rosca cada uno con 5 mL de medio. En el Tabla A15 del Anexo se esquematiza aquel proceso, así como los volúmenes tomados.

b. Condiciones de incubación y procesamiento de la muestra

Los tubos fueron inoculados con suspensiones de 10^6 conidios de la cepa MY3 de *F. verticillioides* y se incubaron por 5 días a 30°C a 200 rpm.

Se tomaron alícuotas de 300 μ L en condiciones de esterilidad, cada 24 h por 5 días por cada medio de cultivo y este volumen se depositó en tubos Eppendorf de 1.5 mL. Las muestras se centrifugaron a 13,400 rpm, 4° C por 15 min, colocando el sobrenadante en tubos Eppendorf de 600 μ L y almacenándolos a -20° C hasta su análisis. La actividad de pectinasa se determinó como se describe en la sección 3.e (Determinación de la actividad enzimática específica de celulasas y pectinasas por el método de DNS), sin embargo, debido a los volúmenes recuperados no se pudo obtener la actividad específica únicamente expresándolo como actividad (U) la cual se definió como mmoles de equivalente de azúcar reductor (glucosa) liberado por unidad de tiempo (min).

VII. RESULTADOS

A. Evaluación de la actividad de glicohidrolasas en cepas de *Fusarium verticillioides*

1. Crecimiento de cepas de *Fusarium spp* en agar con diferentes fuentes de carbono.

Para la evaluar la capacidad que tienen las cepas de *Fusarium spp* para producir un perfil de enzimas capaces de degradar polímeros que componen la pared celular vegetal, se realizaron pruebas en medios de cultivo en placa suplementados con distintos carbohidratos como única fuente de carbono.

Las cinco cepas de *Fusarium spp* fueron capaces de utilizar pectina de manzana pues crecieron en la placa, e incluso algunas produciendo pigmento y abundante micelio (Figura 26).

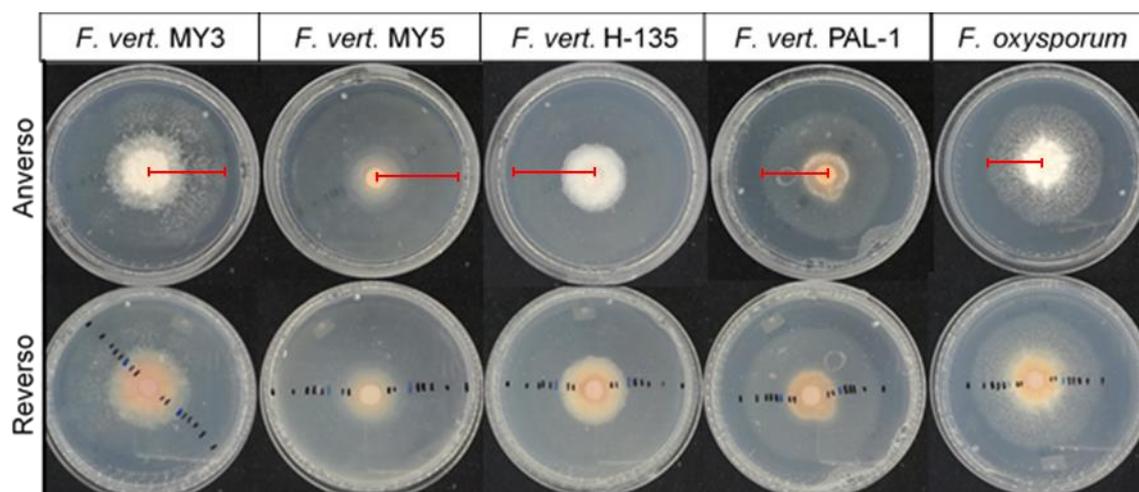


Figura 26. Crecimiento de las cinco cepas de *Fusarium spp* en agar suplementado con pectina de manzana (1%) como fuente de carbono. Se muestra el anverso y reverso de las cajas en cultivos de 12 días. |—| = diámetro de crecimiento.

También, las cinco cepas de *Fusarium spp.* fueron capaces de metabolizar la acetil celulosa, aunque en menor grado que la pectina. La Figura 27 muestra el anverso de las placas y el crecimiento de las colonias (las partículas blancas en el medio de cultivo es el sustrato sin solubilizar)

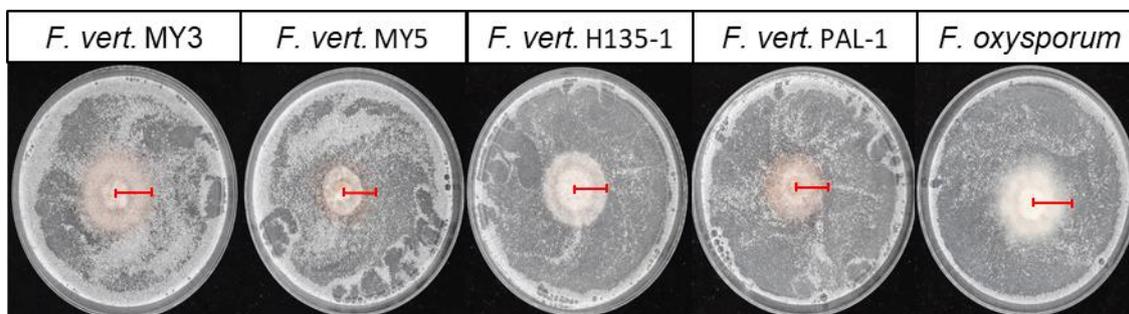


Figura 27. Crecimiento de las cinco cepas de *Fusarium spp* en agar suplementado con acetil celulosa (1%) como fuente de carbono. Se muestra el anverso de las cajas en cultivos de 10 días. |—| = diámetro de crecimiento.

Por último, se evaluó el crecimiento de las cepas de *Fusarium spp* en medio agar-xilosa, en este caso se observó un muy escaso desarrollo del micelio y no hubo producción de pigmento en ninguna de las cinco cepas (Figura 28).

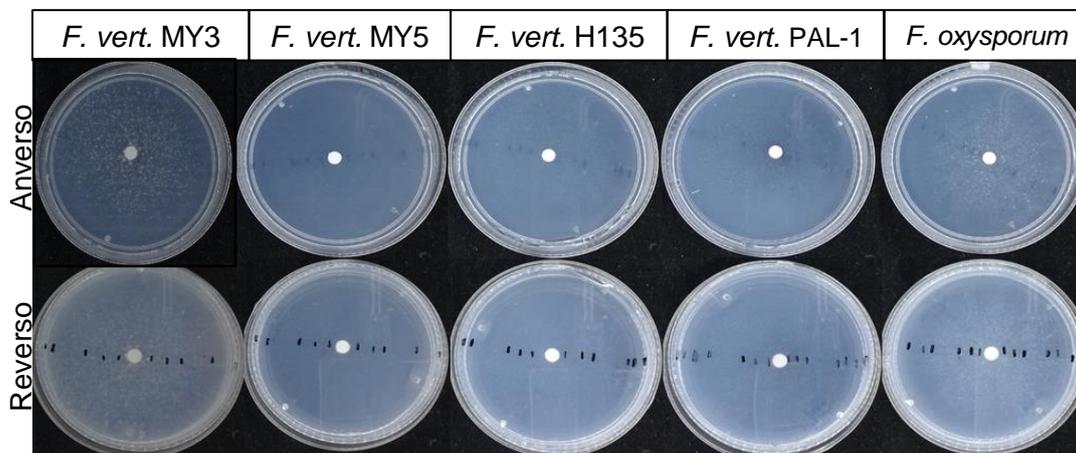


Figura 28. Crecimiento de las cinco cepas de *Fusarium spp* en agar suplementado con D-(+)-xilosa (1%) como fuente de carbono. Se muestra el anverso y reverso de las cajas en cultivos de 10 días.

Para evaluar la tasa de crecimiento, se midió el diámetro de las colonias en los diferentes medios sólidos a lo largo del tiempo y se construyó una curva de crecimiento microbiano, además se graficó el Ln de dicho crecimiento con el fin

de obtener un gráfico que denotara la fase exponencial (linealidad) de tal desarrollo para así obtener los parámetros cinético.

En el medio de agar-pectina de manzana, las curvas de crecimiento de las cepas de *Fusarium spp* no presentaron la fase Lag, y se observó únicamente el periodo exponencial durante el transcurso de tiempo evaluado (Fig. 29). Se observó un comportamiento diferencial entre las cepas pues mientras que las cepas de *F. verticillioides* (MY3, MY5 y H-135) alcanzaron un diámetro entre 7 y 7.7 cm a los 12 días de cultivo, las cepas (*F. vert.* PAL-1 y *F. oxysporum*), solamente llegaron a 5.5 cm. Se encontró que existe diferencia significativa del diámetro de crecimiento al final de crecimiento ($p < 0.05$) ANOVA de un factor.

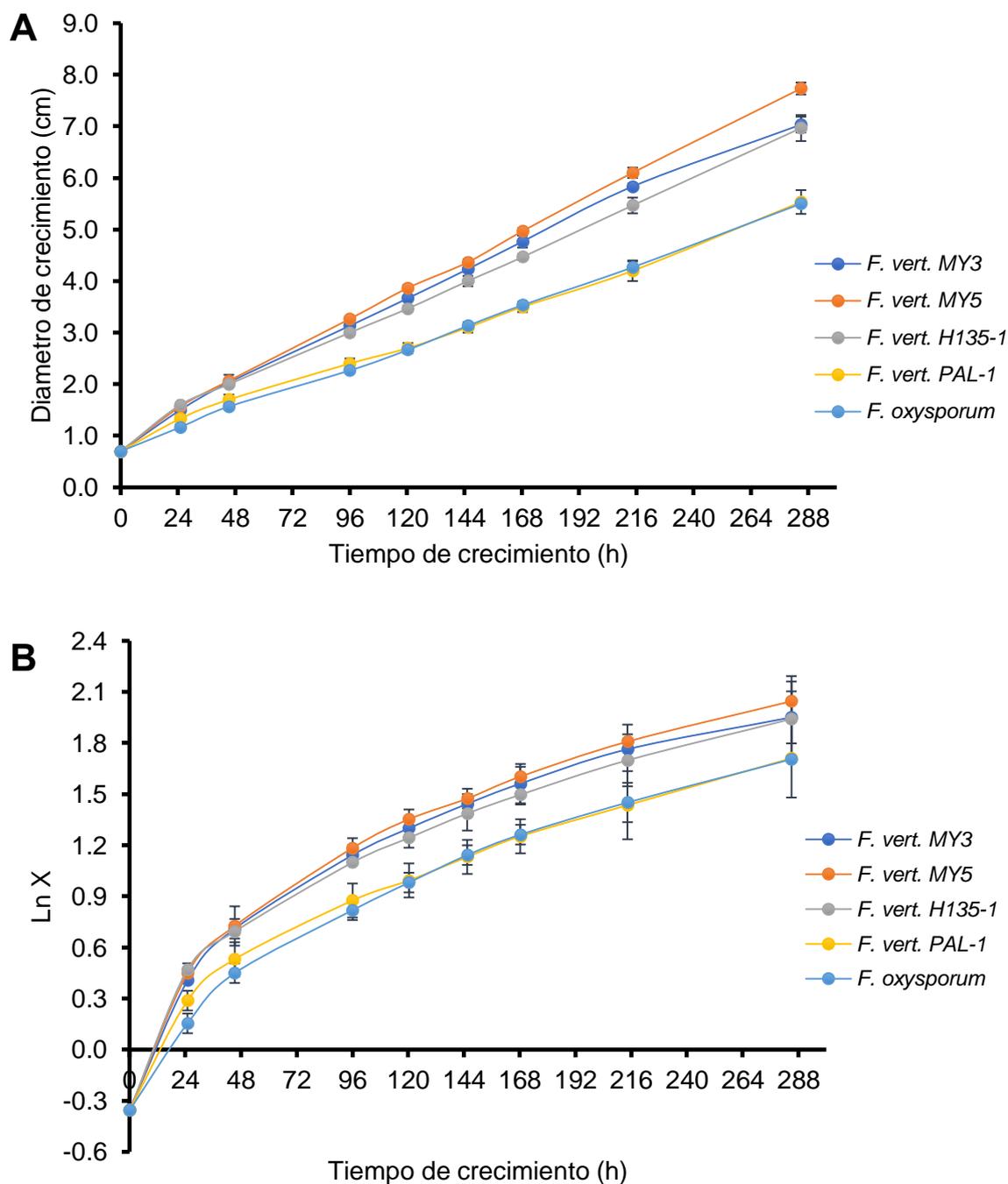


Figura 29. Curvas de crecimiento de las cinco cepas de *Fusarium spp* en presencia de pectina de manzana (1%) en medio sólido. Cada punto de la curva representa el promedio de un triplicado y las barras de error corresponden a la DE (n=3). A. Diámetro del crecimiento (cm) vs tiempo B. Ln Diámetro del crecimiento vs tiempo.

La curva de crecimiento de las cinco cepas de *Fusarium spp* en el medio agar-acetil celulosa se muestra en la Figura 30, en la que se distinguen las tres fases (Lag, Log y estacionaria), y alcanzaron un diámetro máximo de entre 3 y 4 cm a los 10 días de cultivo.

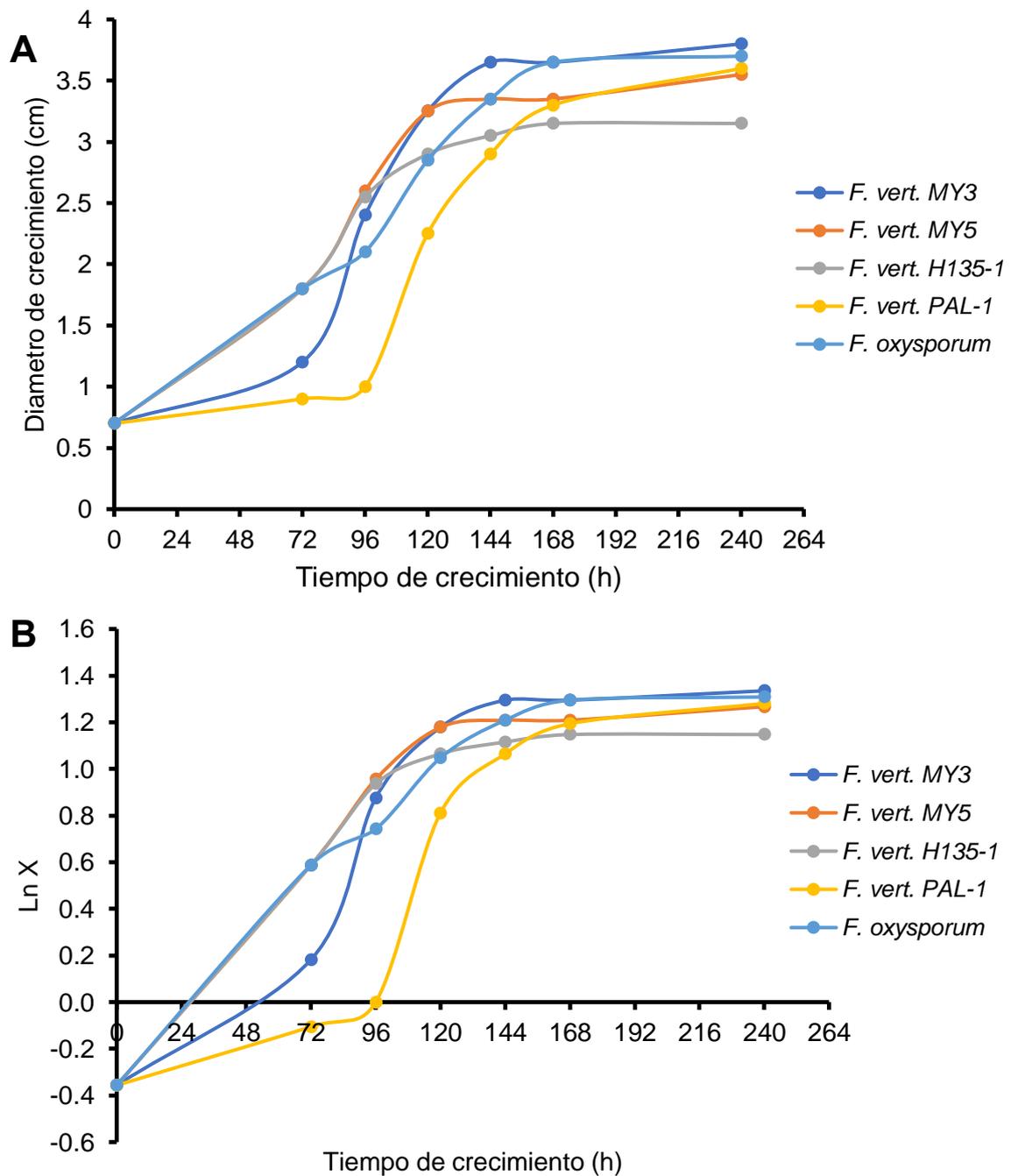


Figura 30. Curva de crecimiento de las cinco cepas de *Fusarium spp.* en presencia de acetil celulosa (1%) en medio sólido, determinado por el diámetro de la colonia. Cada punto de la curva representa el promedio de un duplicado. A. Diámetro del crecimiento (cm) vs tiempo B. Ln Diámetro del crecimiento vs tiempo

A partir de las curvas de crecimientos obtenidas de las figuras 29B y 30B se calculó la velocidad específica de crecimiento (μ), para se obtuvo la pendiente

de la fase logarítmica de crecimiento. La Tabla 8 muestra los valores del parámetro μ .

El medio de cultivo suplementado con acetil celulosa presentó los mayores valores de velocidad específica en comparación con los del medio con pectina de manzana, y permitió distinguir a las cepas pues *F. vert* MY3 tuvo el valor más elevado (0.0208), seguido de las cepas *F. vert.* MY5 y *F. vert.* H135. En el medio con pectina, los valores de tasa de crecimiento son menos contrastantes (Tabla 8).

Tabla 8. Parámetro de la cinética de crecimiento de *Fusarium spp* en medio de cultivo sólido suplementada con diferentes fuentes de carbono.

Cepa de <i>Fusarium spp</i>	Agar-pectina de manzana		Agar-acetil celulosa	
	μ (h ⁻¹)	R ²	μ (h ⁻¹)	R ²
<i>F. vert.</i> MY3	0.0074	0.9908	0.0208	0.9514
<i>F. vert.</i> MY5	0.0076	0.9837	0.0135	0.9989
<i>F. vert.</i> H135	0.0070	0.9922	0.0134	0.9996
<i>F. vert.</i> PAL-1	0.0060	0.9944	0.0106	1.0000
<i>F. oxysporum</i>	0.0069	0.9990	0.0116	0.9914

μ : Velocidad específica de crecimiento (pendiente de la fase exponencial); R²: Coeficiente de correlación de los datos de crecimiento en fase exponencial

2. Evaluación de la actividad de glicohidrolasas en cepas de *Fusarium spp* en medio sólido.

Para probar la producción de enzimas extracelulares en medio sólido, como las pectinasas, se utilizó un medio inductor y su actividad se reveló mediante la adición de CTAB (1%) que permitió observar el halo de degradación del polisacárido, como lo muestra la Figura 31.

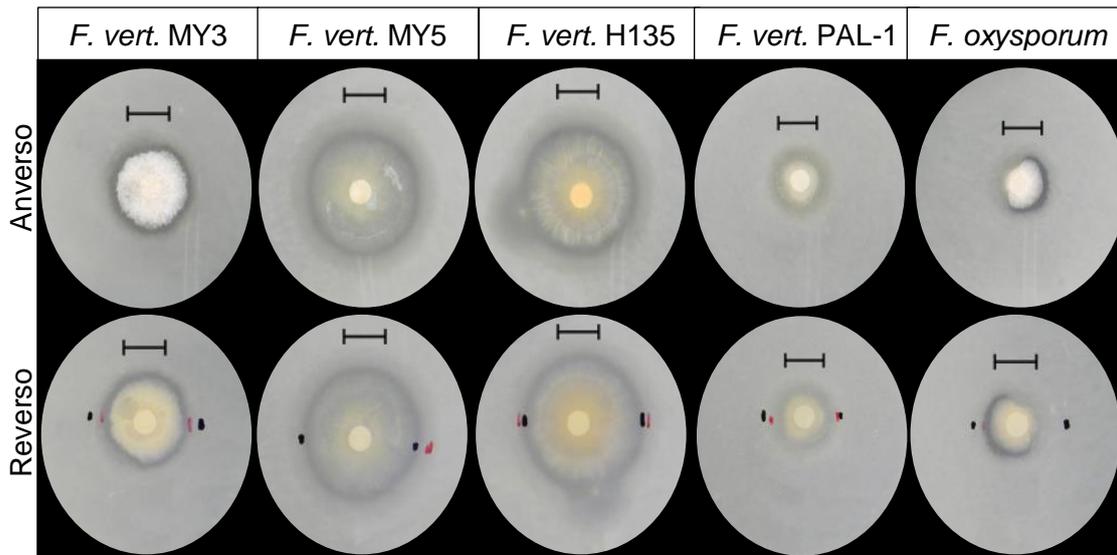


Figura 31. Degradación de pectina por cinco cepas de *Fusarium spp.*, en medio solidificado con agarosa. El halo de degradación se reveló a las 72 h con CTAB 1%. Las barras de escala indican 1 cm y las marcas rojas indican el tamaño del halo medido.

Para cuantificar la actividad pectinolítica, se midió el halo de degradación para cada una de las cepas, y como se muestra en la Tabla 9, son las cepas MY5 y H135, las que presentaron un halo de mayor tamaño.

Tabla 9. Unidades de difusión en agarosa obtenidas a partir del diámetro del halo de degradación de pectina por las cinco cepas de *Fusarium spp.*

	<i>F. vert.</i> MY3	<i>F. vert.</i> MY5	<i>F. vert.</i> H135	<i>F. vert.</i> PAL-1	<i>F.</i> <i>oxysporum</i>
Unidades de difusión en agarosa* (cm)	2.3	2.7	2.7	1.3	1.1

*1 unidad de difusión en agarosa= cantidad de enzima que produce un halo de 0.5 cm de radio (exterior al pozo de inoculación)

3. Ensayos de actividad de glicohidrolasas en proteína intracelular de cepas de *Fusarium spp*, crecidas en medio líquido con glucosa como fuente de carbono.

La actividad de celulasas se determinó en los extractos proteicos del micelio de las cepas de *Fusarium spp.*, usando acetil celulosa como sustrato. La actividad específica de éstos se presenta en la Figura 32 y se observa que la cepa *F. vert.* MY3 presentó la mayor actividad de celulasas (0.018 U/mg proteína), seguidas de *F. vert* H135, *F. oxysporum* y *F. vert.* MY5, y en la cepa PAL-1 la actividad enzimática fue apenas detectable.

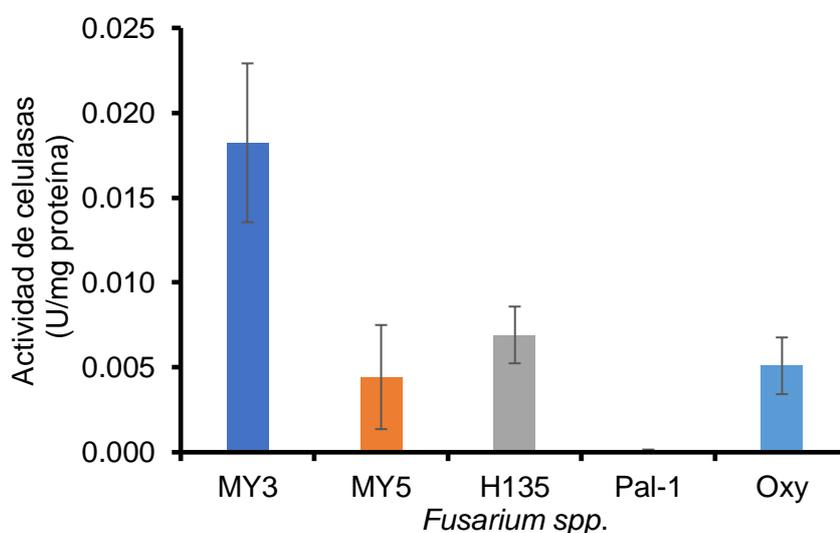


Figura 32. Actividad específica de celulasa de *Fusarium spp.* en extractos proteicos de micelio crecido en medio líquido suplementado con glucosa (0.12 M). Los valores corresponden al promedio de triplicados y las barras de error a la DE.

La actividad de pectinasas se midió en los extractos proteicos de micelio de *Fusarium spp.*, usando pectina de manzana como sustrato. La actividad específica se presenta en la Figura 33 y se observa que la cepa *F. verticillioides* MY3 tuvo la mayor actividad (0.36 U/mg proteína) seguida por *F. oxysporum*, la cepa H135, MY5 y PAL-1.

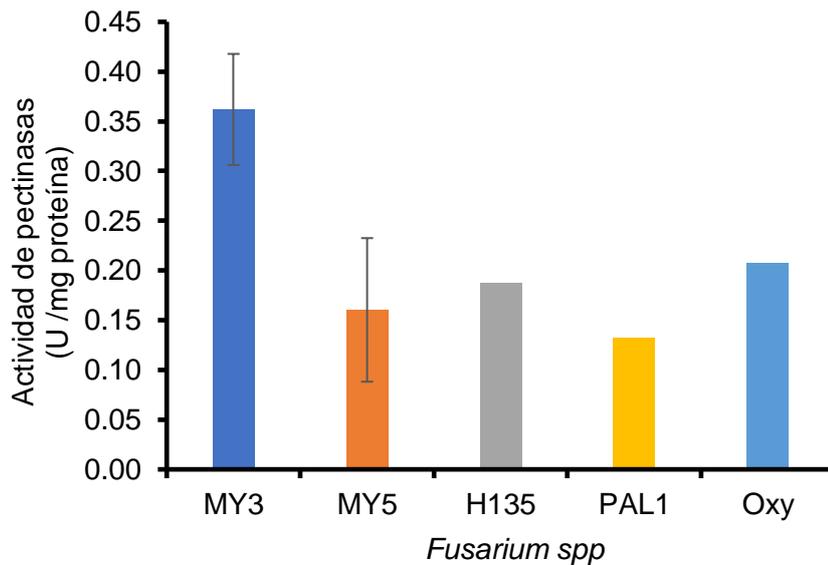


Figura 33. Actividad específica de pectinasa de *Fusarium spp.* en extractos proteicos de micelio crecido en medio líquido suplementado con glucosa (0.12 M). Los valores corresponden al promedio de triplicados y las barras de error a la DE.

4. Ensayos de actividad de glicohidrolasas en cepas de *Fusarium spp* crecidas medio líquido suplementado con distintas fuentes de carbono.

Para evaluar la actividad de enzimas excretadas al medio de cultivo, se crecieron las cepas de *Fusarium spp.* en presencia de acetil celulosa como fuente de carbono. La actividad específica se muestra en la Figura 34 y se observó que la cepa MY5 presentó la mayor actividad (0.13 U/mg proteína) seguida de las cepas PAL-1, MY3 y *F. oxysporum*, y fue la cepa H135 la que tuvo menor actividad.

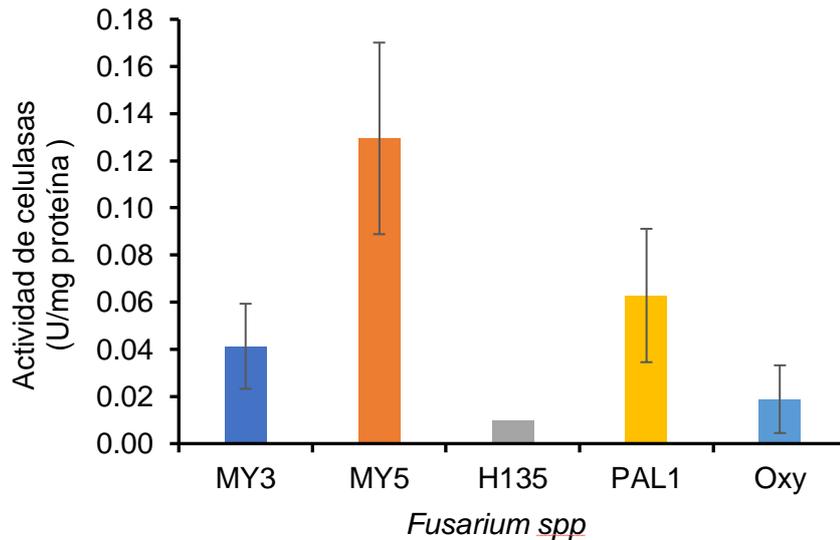


Figura 34. Actividad específica de celulastas excretadas al medio en cepas de *Fusarium spp.* cultivadas en medio líquido con acetil celulosa como fuente de carbono. Los valores corresponden al promedio de triplicados y las barras de error a la DE.

La actividad de pectinasas se midió en el medio líquido suplementado con pectina de manzana. La actividad específica se muestra en la Figura 35 y se observó que *F. oxysporum* presentó la mayor actividad (17.18 U/mg proteína) seguida de las cepas PAL-1, MY5 y MY3, y fue la cepa H135 con menor actividad (2.26 U/mg proteína).

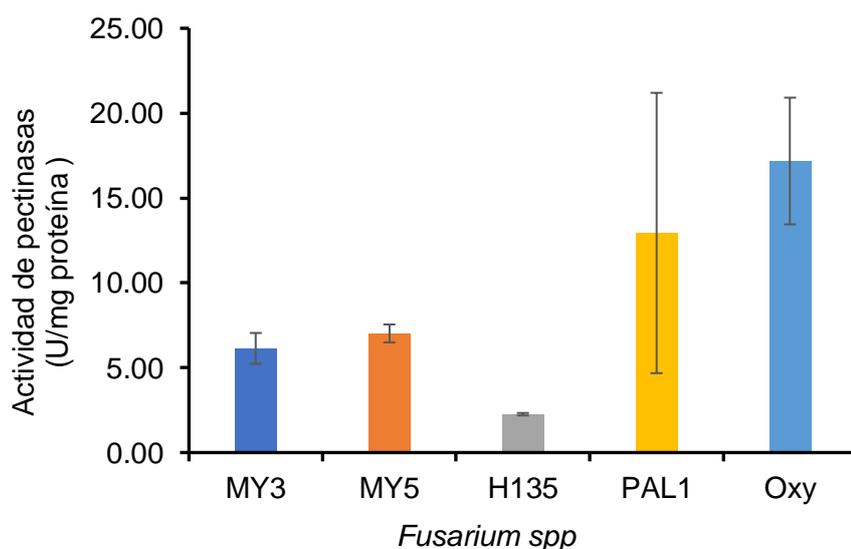


Figura 35. Actividad específica de pectinasas excretadas al medio en cepas de *Fusarium spp.* cultivadas en medio líquido con pectina de manzana como fuente

de carbono. Los valores corresponden al promedio de triplicados y las barras de error a la DE.

La actividad de xilanasas se midió en el medio líquido suplementado con salvado de trigo. La actividad específica se muestra en la Figura 36 y se observó que *F. oxysporum* presentó la mayor actividad (1.7 U/mg proteína) seguida de las cepas MY3 y H135, y fueron las cepas PAL-1 y MY5, las que tuvieron menor actividad (0.9 U/mg proteína).

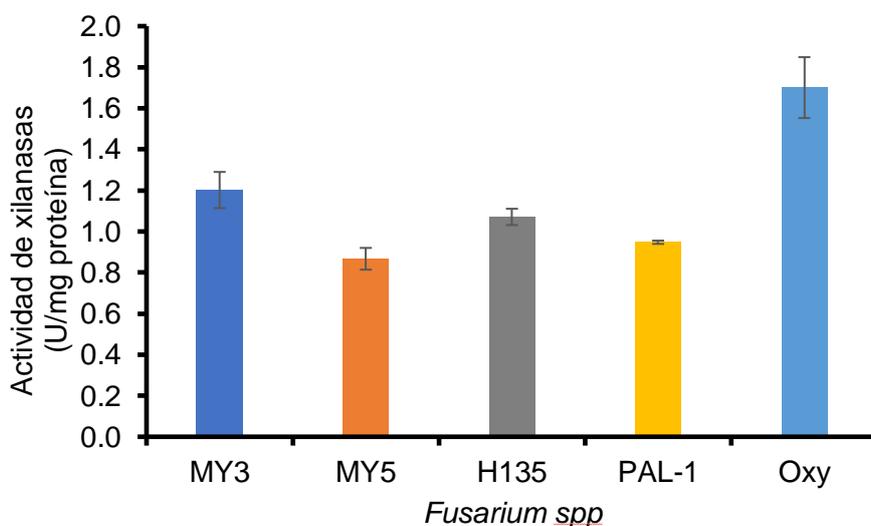


Figura 36. Actividad específica de xilanasas excretadas al medio en cepas de *Fusarium spp.* cultivadas en medio líquido con salvado de trigo como fuente de carbono. Los valores corresponden al promedio de triplicados y las barras de error a la DE.

Para conocer cuáles podrían ser el tipo de reacción que realizan las enzimas con actividad pectinolítica se realizó una cromatografía en capa fina (CCF), estos resultados se presentan en la Figura A4 del ANEXO. De los cuales se puede concluir que en las cepas de *F. verticillioides* MY5 y PAL-1 solamente se detectó actividad de endopectinasas pues sólo se observaron oligosacáridos en placa, mientras que en las cepas MY3, H-135 y *F. oxysporum* liberaron monosacáridos y oligosacáridos, relacionados con una actividad exopectinasa como endopectinasa.

B. Relación de los factores de virulencia en *Fusarium verticillioides*

1. Efecto de la fuente de carbono en la producción de fumonisina B1 en *Fusarium verticillioides*, cepa MY3.

Para evaluar la asociación entre la fuente de carbono y la producción de un factor de virulencia, se cuantificaron los niveles de la toxina FB1 en los cultivos de *Fusarium verticillioides* (cepa MY3) crecida en presencia de cuatro fuentes de carbono. Encontramos diferencias significativas en su producción para los diferentes medios de cultivo (Figura 37). El medio de cultivo que permitió una alta biosíntesis de FB1 fue el que contenía salvado de trigo (9422 ng FB1/mL cultivo), mientras que el medio con galactosa fue una moderada producción (11.5%) y el medio con glucosa una baja producción (1.6%), y en el medio con pectina no se detectó la toxina.

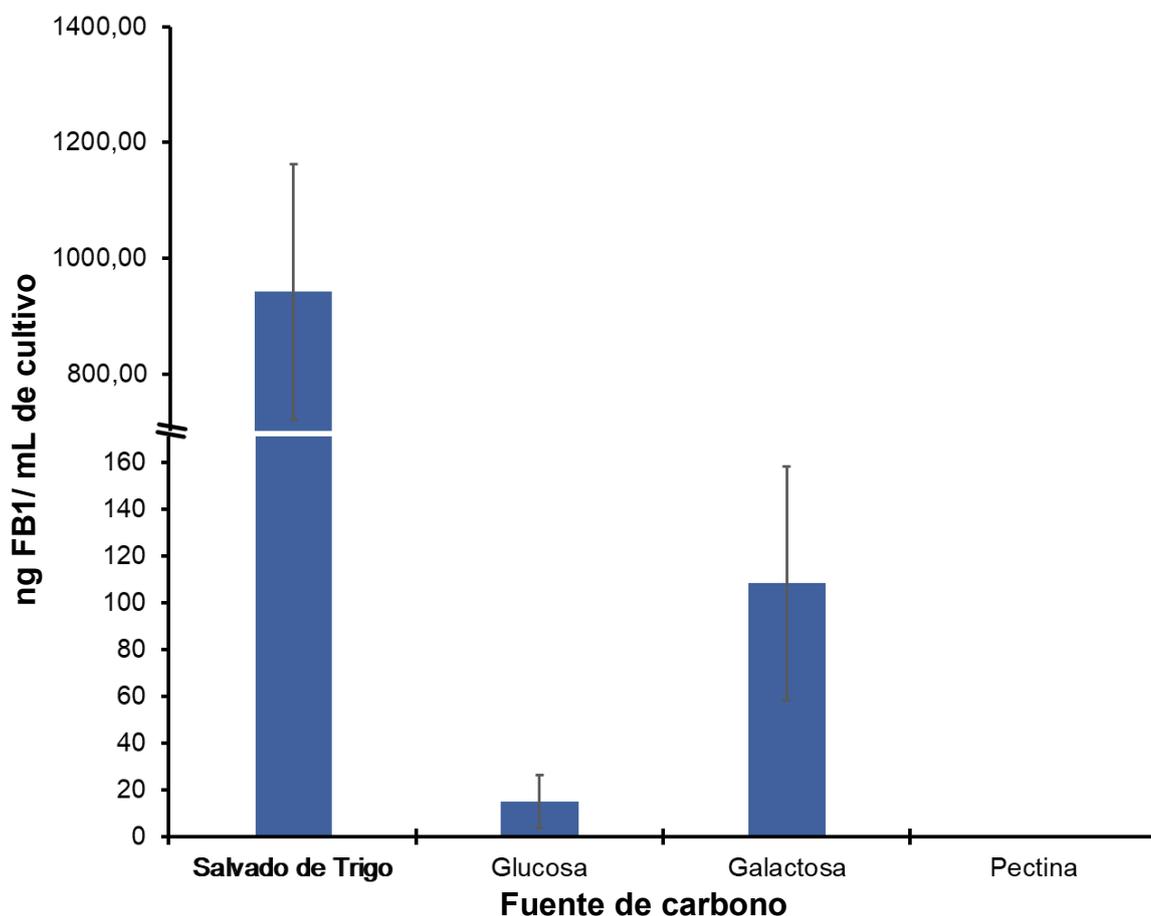


Figura 37. Niveles de producción de FB1 por la cepa *F. verticillioides* MY3, en medios de cultivo suplementados con distintas fuentes de carbono. Se representan los valores promedio y las barras de error corresponden a la DE (n=4).

Dado que el pH es un factor que influye en la producción de FB1, se midió este parámetro en el medio antes de la inoculación y después del periodo de incubación (Figura 38). El pH de los medios se redujo ligeramente y solo para el medio con salvado de trigo aumentó de manera significativa por más de dos unidades.



Figura 38. Crecimiento de *F. verticillioides* MY3 en medios suplementados con distintas fuentes de carbono y valores promedio de pH para los medios antes y después de la incubación.

2. Efecto de la fumonisina B1 en la producción de la actividad pectinolítica en *Fusarium verticillioides*, cepa MY3.

La actividad pectinolítica de *Fusarium verticillioides* MY3 bajo la adición de distintas concentraciones de FB1 se midió a través del tiempo (Fig. 39). Esto considerando el tiempo óptimo en el que se desarrolla la mayor cantidad de biomasa y se presenta la más alta actividad enzimática, como se observó en un experimento preliminar (Anexo, Figura A5 y A6).

Se encontró que, a las 24 h las concentraciones más altas de FB1 suprimieron marginalmente la actividad de pectinasas, pero a partir de las 72 h no se observó un efecto significativo de la presencia de FB1.

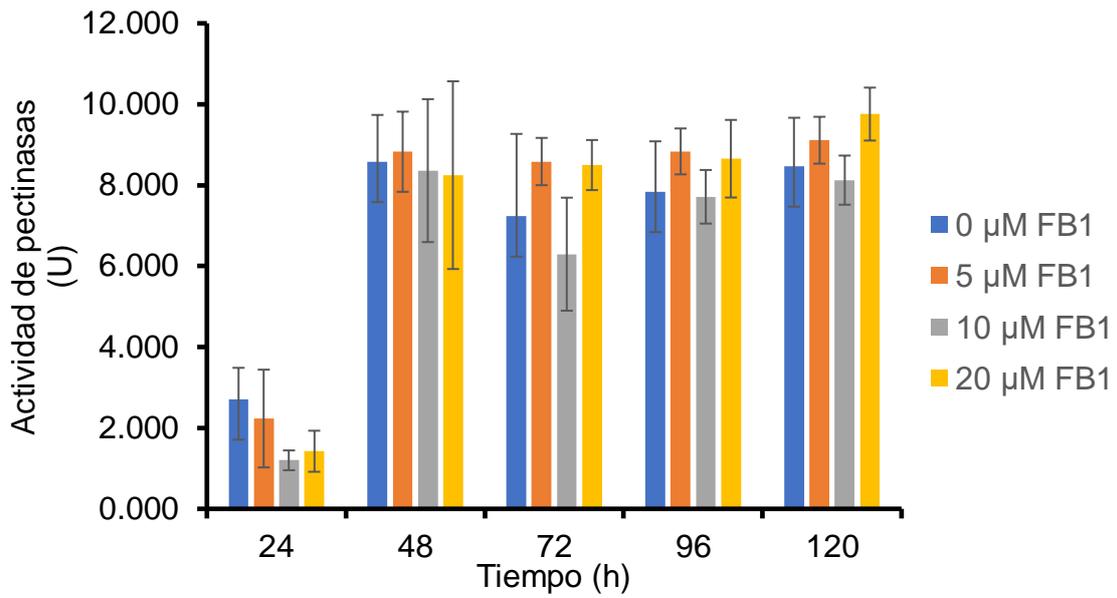


Figura 39. Efecto de la FB1 sobre la actividad pectinolítica de la cepa de *F. verticillioides* MY3. Cada punto representa el promedio y las barras de error corresponden a la DE (n = 4). Los datos se analizaron por ANOVA de un factor ($p < 0.05$) para cada tratamiento con FB1. U=mmol de glucosa/min

A. Evaluación de la actividad de glicohidrolasas

1. Utilización de los polisacáridos en el medio de cultivo.

En este trabajo se establecieron las condiciones para evaluar en *Fusarium spp.* la utilización de tres diferentes polímeros que forman parte de pared celular vegetal (pectina, acetil celulosa y salvado de trigo como fuente de hemicelulosa). Asimismo, se midieron las actividades de glicohidrolasas totales en el extracto proteico del micelio y en el medio de cultivo.

Para los resultados del crecimiento radial de *Fusarium spp.* en medios que contenían acetil celulosa y pectina se observó una mayor facilidad de adaptación al medio suplementado con pectina que en comparación con el medio con acetil celulosa, pues las cepas de *Fusarium spp.* presentaron a las primeras horas (72 h) un diámetro mayor y que además este crecimiento resultó diferencial para las distintas cepas pues MY5, MY3 Y H135 fueron quienes presentaron el mayor diámetro en pectina siendo igual patrón en medio con acetil celulosa (excepción de MY3 que desarrollo un menor diámetro). Estos resultados se observan también al término del crecimiento donde ocurre que en medio agar-pectina existe diferencia significativa entre el diámetro que presenta cada una de las cepas, donde MY5 presentó el mayor crecimiento, después MY3 & H135 con un 10% menos del diámetro y PAL1 & *F. oxysporum* con un 30% menos de desarrollo respecto a MY5. En medio agar-acetil celulosa la diferencia de crecimiento al final del ensayo fue a penas de 15% de diferencia entre la cepa de mayor crecimiento (MY3 con 3.8 cm) y la del menor diámetro (H135 con 3.1 cm)

Para dar de una explicación a estas diferencias observadas primero habrá que hablar de la composición de los medios de cultivo y qué es lo que los distingue; como se observa en su composición (Tabla A1), ambos cuentan con la misma relación de fuente de nitrógeno y sales (además cabe hacer notar que en ambos casos se colocó la misma cantidad de inóculo), siendo así la única diferencia la naturaleza química de la fuente de carbono. En medio de agar-pectina se trata de ácido poli-D-galacturónico metil éster cuyo grado de

esterificación oscila entre los 50-75% según el productor (Sigma-Aldrich, Número CAS: 9000-69-5), este polisacárido es clasificado como homogalacturonano y en la naturaleza forma tramos de 100 residuos de ácido galacturónico (GalA). La presencia de grupos carboxilo en el carbono 6 (C-6) le da la naturaleza ácida y precisamente así es, pues el pH que imparte al medio es de 3 (pH=3), esto también le permita una mayor solubilidad por medio de la interacción $\text{-COO}^- \text{-H}_2\text{O}$, pues como se observa en el medio (Figura 26), la presencia de grumos o material particulado es menor a diferencia del medio con acetil celulosa (Figura 27) el cual es sustrato sin carga (Sigma-Aldrich; Número CAS 9004-35-7), con un tamaño de 30 000 y con acetilaciones en las posiciones C-2, C-3, C-4 o C-6 de la estructura de la glucosa (aprox. 39.8% en peso de acetilaciones), la naturaleza insoluble de la celulosa lo vuelve un sustrato más difícil de degradar por acción enzimática (Brown, 2003).

Otro de los factores importantes fue el pH y es que este puede determinar la expresión de diferentes genes de CWDEs por medio del factor transcripcional PACC1 el cual se ha visto en varios hongos filamentosos (*N. crassa* y *Aspergillus spp.*) funciona como un regulador positivo para la expresión de hemicelulasas y celulasas (Amore et al., 2013). Existen reportes que indican que la expresión de genes es dependiente de pH, por ejemplo, la producción de poligalacturonasas fue estudiado en *A. kawachii* a diferentes pHs y se obtuvo que un medio pH 2 fue posible purificar dos poligalacturonasas y únicamente una se purificó a pH 5 (De Vries & Visser, 2001). En el presente trabajo a diferencia del medio con pectina, el medio con acetil celulosa presentó un pH de 4 al final del crecimiento lo cual sugiere que la eficiencia con la cual se ocuparon los polisacáridos como fuente de carbono dependió de dicho factor.

En cuanto a la cantidad de CWDEs se ha visto que las enzimas secretadas por *F. verticillioides* (cepa 7600) en presencia de material lignocelulósico son en su mayoría hemicelulasas (26%), pectinasas (20%) y finalmente celulasas (15%), de un total de 57 CWDE (Ravalason et al., 2012). La presencia de cierto número de enzimas encargadas de la depolimerización del homogalacturonano sea también un factor que permita el rápido desarrollo de las cepas en este medio de cultivo.

Finalmente, el crecimiento diferencial presentado por las cepas de *Fusarium spp.* en los medios de cultivo se deba a la naturaleza de su procedencia pues éstas fueron aisladas de distintos tejidos de plantas de maíz en diferentes regiones de México (Sánchez-Rangel et al., 2005), reflejándose así en una respuesta variable a la fuente de carbono y a las condiciones de cultivo empleadas, traduciéndose con ello en una diferencia en el diámetro de crecimiento.

En otro ensayo de crecimiento radial se usó xilosa como fuente de carbono con el fin de probarlo como posible inductor de xilanasas, ya que se había reportado por parte de *Trichosporum cutaneum* SL409 la capacidad de crecer e inducir xilanasas en concentraciones de 1% (p/v) en un medio basal suplementado con xilosa, en el que se vio que a las 48 h de incubación se tenía un crecimiento abundante así como una alta actividad xilanólítica (225.8 nkat/mg), como con un medio suplementado con xilano (Liu et al., 1999). Sin embargo, la xilosa tiene un papel dual en la expresión y represión de los genes xilanolíticos (De Vries & Visser, 2001; Gutiérrez-Rojas et al., 2015) esto en función de la concentración en el medio. Un aspecto importante es que en la naturaleza la xilosa es liberada gradualmente del xilano sin que haya entonces una acumulación de este compuesto, dando como resultado una baja concentración en el medio (Seiboth et al., 2012). En el presente trabajo no se obtuvo crecimiento por parte de las cepas de *Fusarium spp.* en medios suplementados con xilosa con concentración de 1% (p/v) equivalente a 66.6 mM. Se ha reportado en *A. niger* que la represión catabólica por carbono por xilosa ocurre a concentraciones de 70 mM y esta es mediada por CreA, que es el ortólogo de Cre1 en *T. reesei* (De Vries et al., 1999)

En la Figura 40 se muestra un esquema del rol que presenta la xilosa en el modelo de *A. niger*; si la concentración de xilosa es alta causa la represión por CreA y en consecuencia en la reducción de la expresión de genes, mientras que XlnR media la expresión de hemicelulasas a través de bajas concentraciones de xilosa.

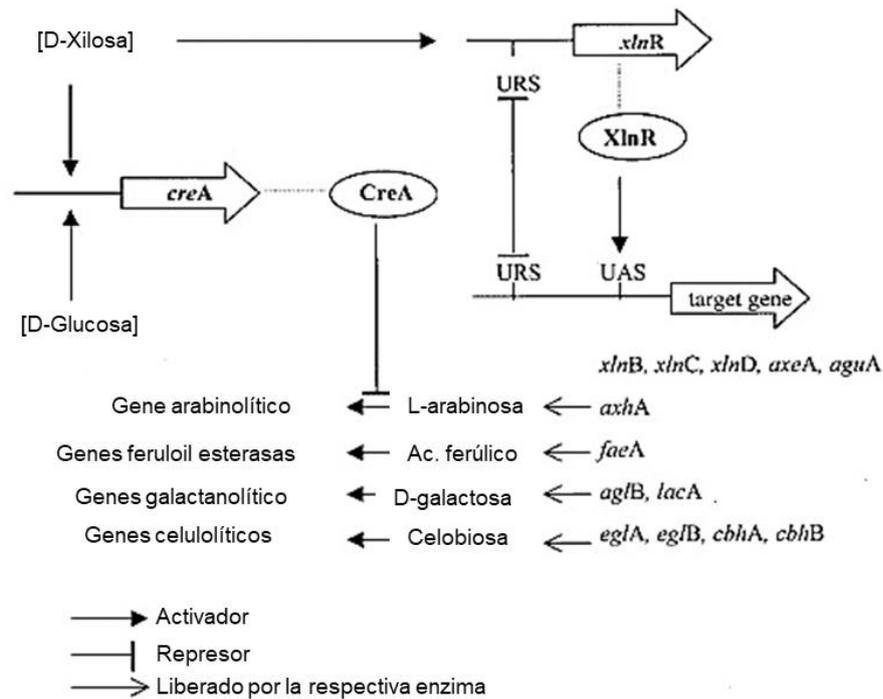


Figura 40. Modelo para la inducción o represión de genes hemicelulolíticos y celulolíticos por acción CreA y XlnR activados por la concentración de xilosa y glucosa por *A. niger*. Tomado y modificado De Vries & Visser, (2001).

Para analizar las diferencias que presentaban las cepas de *Fusarium spp* en los medios de cultivo sólido se utilizó el parámetro de velocidad específica de crecimiento (μ) y se comparó la velocidad con la que crecían en la fase exponencial. Se encontró que agar-pectina las cepas presentaron una ligera diferencia siendo así que las cepas con mayor velocidad de crecimiento, MY5 y MY3, tan sólo difieren en un 20% con respecto a la de menor velocidad que fue PAL1. Para el medio con acetil celulosa la diferencia consistió en un 40% entre la que presentó el mayor valor, MY3 y la de menor (PAL1).

Si bien, presentar fase de adaptación permite al hongo ser capaz de preparar la maquinaria enzimática necesaria para poder aprovechar los nutrientes del medio, la delimitación de esta fase fue puramente arbitraria con base en el gráfico de crecimiento (Figura 29B y 30B) y el parámetro del coeficiente de correlación (R) lo cual nos dejó observar que para las cepas que presentaron fase estacionaria la velocidad de crecimiento obtuvo valores más bajos y viceversa.

Además, se detectó la presencia de enzimas pectinolíticas en medio sólido mediante el uso de CTAB el cual forma un precipitado con el ácido D-poligalacturónico intacto a través de la interacción de las cargas negativas que tiene el polisacárido y el detergente catiónico (Hadj-Taieb et al., 2011). Para permitir que los grupos carboxilo libres (que no se encuentran formando enlaces éster con el metanol) estén cargados negativamente se modificó el pH del medio a 6, sin embargo, esto también repercute en la inducción de enzimas pectinolíticas que se secreten al medio. De acuerdo con Hankin & Anagnostakis, (1975) el perfil de enzimas que se favorece a pH 7 es el de pectato liasas y la actividad de poligalacturonasas se favorece a pH 5.

En este trabajo se encontró que tanto la cepa MY5 y H135 fueron las que presentaron unidades de difusión radial mayores (2.7 U), seguidas de MY3 (2.3 U) y finalmente PAL1 y *F. oxysporum* (1.3 y 1.1 U, respectivamente). En la literatura se reporta cepas de *F. graminearum*, crecidas por 20 h, que presentan actividades de alrededor de 1.3 unidades de difusión radial (U) tanto para el genotipo silvestre como para una de las mutantes carentes de un gen (*Fgxyr*) relacionado con la regulación transcripcional de genes que expresan xilanasas (Paccanaro et al., 2017). Las cepas de *Fusarium spp* analizadas en este estudio presentaron rangos que abarcan 1.1 U (*F. oxysporum*) hasta los 2.7 U (*F. verticillioides* MY5 y H-135) a las 72 h, siendo esta una menor capacidad de degradar pectina en comparación con el fitopatógeno reportado.

2. Actividad enzimática de glicohidrolasas en *Fusarium spp*.

La actividad enzimática de las glicohidrolasas estudiadas fue medida, primero a través de analizar si existía actividad bajo condiciones represoras (medio suplementado con glucosa) dentro de las células del micelio.

Se registraron actividades de celulasas y pectinasas entre las distintas cepas de *Fusarium spp* (Fig. 32 y 33). En el caso de la actividad de celulasas, la cepa MY3 mostró los niveles más altos de actividad (0.018 U/mg), con respecto a las otras cepas, H135, MY5 y *F. oxysporum* que tuvieron un 40% de esta actividad y por último fue a penas detectable la actividad para la cepa PAL1. Por otra parte, la actividad detectada para pectinasas fue de un orden de

magnitud mayor respecto a encontrada para las celulasas, presentado que la actividad más alta la tuvo la cepa MY3 (0.36 U/mg), seguidas de las cepas *F. oxysporum*, MY5, H135 y PAL1 con aproximadamente un 50% menos.

Se sabe que los genes de celulasas y pectinasas se encuentran bajo represión catabólica por carbono mediante el factor de transcripción Cre1 en hongos filamentosos, sin embargo, en un estudio con *T. reesei* se encontró que muchos genes que codifican para hidrolasas extracelulares son reprimidos por Cre1, pero que existen otros genes para CWDE que son constitutivos y son independientes de la acción de dicho factor. Además, se menciona que, si bien la regulación de enzimas xilanolíticas y celulolíticas se ha demostrado por Cre1, ninguno de estos genes estaba fuertemente sobrerregulado en mutantes ($\Delta cre1$). Finalmente se concluye que la represión catabólica por carbono mediada por Cre1 afecta principalmente su inducción, pero no su expresión basal (Portnoy et al., 2011)

La producción basal de enzimas glicohidrolíticas (celulasas y pectinasas) en *Fusarium spp* se estudió en presencia de glucosa. Sin embargo, no es común el hecho de que estas enzimas se encuentren dentro de la célula pues la naturaleza de su actividad se ve reflejada fuera de ella, la regulación postraduccional sea un factor que permita explicar su ubicación debido a su tránsito por el retículo endoplásmico (Huberman et al., 2016). Otros autores han reportado la presencia de pectinasas intracelulares mediante ELISA y ensayos de inmunolocalización esto en una cepa de *Fusarium verticillioides* (NCIM 1276), se ha reportado cantidades significativas de pectato liasas (15 ng/mg biomasa) en presencia de 1% de glucosa como fuente de carbono (Niture et al., 2006)

En el medio de cultivo suplementado con polisacáridos de pared celular, se registraron niveles más elevados de actividad enzimática de celulasas y pectinasas. Con la presencia de estas fuentes de carbono en el medio se incrementó la actividad de celulasas hasta una orden de magnitud y de pectinasas de aproximadamente dos órdenes en comparación con la actividad encontrada en medio con glucosa.

Los valores de actividad de celulasas en las cepas de *Fusarium spp* presentaron un patrón distinto, pues la cepa MY5 fue ahora la que alcanzó los

niveles más altos (0.13 U/mg), seguidos de la cepa PAL1, MY3, *F. oxysporum* y finalmente la cepa H135. Para la actividad de pectinasas los valores más altos los presentó *F. oxysporum* (17.2 U/mg), seguido de las cepas PAL1 y las cepas MY5 y MY3, siendo también H135 la que alcanzó el más bajo valor. Esta diferencia entre la actividad más alta alcanza por pectinasas que por celulasas se ha visto también, Niture & Pant (2007) reportaron una actividad de pectinasas (pectato liasas) entre 1 a 2 órdenes de magnitud mayor que la actividad de celulasas en *Fusarium verticillioides* (NCIM1276).

Como último ensayo se evaluó la actividad de xilanasas y se encontró que los valores más altos los alcanzó *F. oxysporum* (1.7 U/mg), seguido de MY3 y H135 (70%) y finalmente las cepas MY5 y PAL-1 con aprox. la mitad de actividad presente

B. Relación de los diferentes factores de virulencia en *Fusarium verticillioides*

1. Efecto de la fuente de carbono en la producción de fumonisina B1 en *Fusarium verticillioides*, cepa MY3.

La capacidad de producción de FB1 en la cepa MY3 es considerada alta (Galeana-Sánchez et al., 2017), por ello el uso de esta cepa sirvió para analizar la influencia que tiene la fuente de carbono en la producción de esta micotoxina. Se tuvo un medio basal (Szécsi, 1990; Tabla A11) donde se varió la fuente de carbono (salvado de trigo, glucosa, galactosa y pectina) para así observar el efecto en la producción de FB1. Se encontró que existe una diferencia significativa ($p < 0.05$) en la producción de FB1 de acuerdo con la fuente de carbono ocupada. En medio con salvado de trigo, los niveles de FB1 son los más altos (942.17 ng FB1/mL de cultivo), seguidos del medio con galactosa (11.5%), glucosa (1.6%) y, por último, en el medio suplementado con pectina de manzana no se logró detectar FB1.

El efecto que tiene la fuente de carbono sobre la producción de micotoxinas ha sido observado para distintos hongos fitopatógenos, algunos ejemplos como “la alta producción de patulina en medios con maltosa, sacarosa o glucosa por *Penicillium expansum* (Zong et al., 2015); la producción de

tricotecenos facilitada por sacarosa en comparación con glucosa y galactosa u otros polisacáridos en *F. graminearum* (Kawakami et al., 2014); y adicionalmente la alta respuesta in vitro de la producción de fumonisinas en medio con harina de maíz por *F. verticillioides* y *F. proliferatum*" (citados por Li et al., 2017)

Se ha visto que para la producción FB1 por *F. proliferatum* crecido en un medio con celulosa, hemicelulosa o cáscara de plátano existe una disminución en la síntesis en comparación con un medio suplementado con sacarosa, además esto va acompañado por la disminución de la expresión de genes *FUM* (FUM1, FUM18, FUM19 y FUM8) y así como del gen para el factor de transcripción, ZRF1 (Wu et al., 2019). En este estudio se vio que la pectina de manzana tenía la capacidad de bloquear la síntesis de FB1 lo cual concuerda con la tendencia reportada por Wu et al. (2019) para celulosa y hemicelulosa, sin embargo, este efecto no se empata para el sustrato complejo que fue el salvado de trigo con respecto a la cáscara de plátano.

En cuanto al efecto presentado por diferentes tipos de monosacáridos a la producción de FB1, se ha reportado por ejemplo que para *F. proliferatum* la fructosa inhibe la producción de fumonisinas, la glucosa no influencia la producción y que la manosa inhibe significativamente la producción de fumonisinas (Li et al., 2017). En el presente estudio se observó que la galactosa presenta un efecto mayor en la producción de FB1 por *Fusarium spp* en comparación con la glucosa.

Adicionalmente Li et al., (2017) analizaron el mecanismo por el cual la manosa afecta la producción de FB1, esto por medio un análisis proteómico comparativo en el que identificaron la expresión diferencial de proteínas relacionados con la biosíntesis de la micotoxina. Primero encontraron que la manosa afectó las vías metabólicas implicadas en la producción de los precursores y cofactores requeridos para la biosíntesis de FB1, produciendo una regulación negativa de enzimas relacionadas con la glucólisis (2 gliceraldehído 3- fosfato deshidrogenasa y un fosfoglicerato cinasa) y una enzima relacionada con el ácido cítrico (isocitrato deshidrogenasa dependiente de NADP) dando como resultado la limitación de carbono a acetil-coA y con ello la posible inhibición de la síntesis del policétido. También encontraron que la vía del metabolismo de la metionina se ve regulada negativamente con un decremento

de proteínas relacionadas (metiltransferasa y cistationina beta-sintasa) ante la presencia de un medio suplementado con manosa en comparación con sacarosa, lo cual afectaría la metilación del policétido en el primer paso de la biosíntesis de FB1.

Con lo anterior se sugiere que el papel que tomó cada fuente de carbono en la producción de FB1 reguló positiva o negativamente genes que van desde los genes biosintéticos del clúster *FUM* hasta otros que proveen precursores y cofactores necesarios para la vía.

Otro factor que afecta la producción de FB1 es el pH del medio y eso ocurre mediante la expresión del gen *pac1* el cual codifica para PAC1 un factor transcripcional que regula las vías de respuesta a diferentes pH. En *F. verticillioides* este factor regula de manera positiva la biosíntesis de FB1 en condiciones de pH bajo y en condiciones de pH alcalino (pH 8.4) actúa como regulador negativo inhibiendo la producción de FB1 (Flaherty et al., 2003). En este estudio se midió el pH de los medios de cultivo antes y después del tiempo de incubación (Fig. 38), en todos se obtuvieron condiciones ácidas y al final del estudio sólo en el medio con salvado de trigo ocurrió un incremento de 3.27 a 5.96, este hecho se atribuye a la presencia de diferentes fuentes de nitrógeno que pudieran servir para la producción de amonio (Prusky et al., 2016)

2. Efecto de la fumonisina B1 en la producción de la actividad pectinolítica en *Fusarium verticillioides*, cepa MY3.

Por último, analizando el efecto que tendría la presencia de la micotoxina en la actividad glicohidrolítica, se analizó la actividad enzimática de pectinasas bajo diferentes concentraciones de FB1 suplementada al medio de cultivo. Se observó que a las 24 h la actividad tiende a disminuir conforme al incremento de concentración exógena de FB1 en el medio, sin embargo, estas diferencias no son significativas y a partir de las 48 h en adelante no se observa un efecto dependiente de concentración; por último, a las 120 h se observa que a la concentración más alta de FB1 usada presentó la actividad pectinolítica más alta.

La relación que mantiene la producción CWDEs con la biosíntesis de la micotoxina no es del todo claro. Existen pocos reportes de esta relación, por

ejemplo, Jian et al., (2019) observaron una relación inversa el crecer en medio con fructosa a *F. proliferatum* en el cual existía una regulación positiva en genes relacionados con CWDEs, pero una disminución de la producción de fumonisina. En otro estudio se reporta que en distintas cepas de *F. graminearum* productoras y no productoras de tricotecenos se reportó una variación de su actividad de pectinasa, siendo esta menor en las cepas incapaces de producir la micotoxina (Khaledi et al., 2017).

Conclusiones

- De manera *in vitro* fue posible detectar y medir la actividad de diferentes glicohidrolasas de pared celular (xilanasas, celulasas y pectinasas) en cepas de *Fusarium verticillioides* con baja producción de FB1, lo cual sugiere que la capacidad de estas cepas por penetrar e invadir a tejidos de maíz estaría facilitada por la producción de dichas enzimas.
- La producción de FB1 por *F. verticillioides* se ve afectada por el tipo de fuente de carbono en el medio.
- La relación que mantiene la micotoxina con los otros factores de virulencia (CWDE), en este caso las pectinasas no mantienen una asociación directa.

Perspectivas

- Medir la actividad de celulasas y xilanasas a diferentes tiempos en medio líquido para conocer el tiempo en que se produce la máxima actividad enzimática.
- Realizar la cuantificación de FB1 en medios suplementados con acetil celulosa para conocer efecto que produce en la síntesis de la micotoxina.
- Determinar la actividad enzimática para xilanasas a diferentes concentraciones de FB1 con el fin de determinar si existe una regulación en la actividad.

X. BIBLIOGRAFÍA

- Agrios, G. N. (2005). *Plant Pathology*. Burlington, Massachusetts: Elsevier/Academic Press. ISBN: 0120445654
- Amore, A., Giacobbe, S., & Faraco, V. (2013). Regulation of cellulase and hemicellulase gene expression in fungi. *Current Genomics*, 14(4), 230–249
- Bastawde, K.B. (1992). Xylan structure, microbial xylanases, and their mode of action. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 8 (4), 353-368
- Bertonha, L. C., Leal Neto, M., Garcia, J. A. A., Vieira, T. F., Castoldi, R., Bracht, A., & Peralta, R. M. (2018). Screening of *Fusarium sp.* for xylan and cellulose hydrolyzing enzymes and perspectives for the saccharification of delignified sugarcane bagasse. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 16, 385–389
- Biely, P., Mislovicová, D., & Toman, R. (1985). Soluble chromogenic substrates for the assay of endo-1,4-beta-xylanases and endo-1,4-beta-glucanases. *Analytical Biochemistry*, 144 (1), 142–146.
- Blacutt, A. A., Gold, S. E., Voss, K. A., Gao, M., & Glenn, A. E. (2018). *Fusarium verticillioides*: Advancements in Understanding the Toxicity, Virulence, and Niche Adaptations of a Model Mycotoxigenic Pathogen of Maize. *Phytopathology*, 108 (3), 312–326
- Bojja, R. S., Cerny, R. L., Proctor, R. H., & Liangcheng, D. (2004). Determining the biosynthetic sequence in the early steps of the fumonisin pathway by use of three gene-disruption mutants of *Fusarium verticillioides*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52 (10), 2855-2860
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry (UK)*, 72(1/2), 248–254.
- Brown, D. W., Butchko, R. A., Busman, M., and Proctor, R. H. (2012). Identification of gene clusters associated with fusaric acid, fusarin, and perithecial pigment production in *Fusarium verticillioides*. *Fungal Genetics and Biology*, 49, 521-532
- Brown, R. M. (2003). Cellulose structure and biosynthesis: What is in store for the 21st century?. *Journal of polymer science. Part A. Polymer chemistry*. 42(3):487-495
- Burton, R. A., Gidley, M. J., & Fincher, G. B. (2010). Heterogeneity in the chemistry, structure and function of plant cell walls. *Nature Chemical Biology*, 6(10), 724–732

- Cantu, D., Vicente, A. R., Labavitch, J. M., Bennett, A. B., & Powell, A. L. T. (2008). Strangers in the matrix: plant cell walls and pathogen susceptibility. *Trends in Plant Science*, 13(11), 610–617.
- Carelo-Nieto, F., Di Pietro, A., Roncero, M. I. G., & Hera, C. (2007). Role of the transcriptional activator XlnR of *Fusarium oxysporum* in regulation of xylanase genes and virulence. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 20(8):977-985
- Carpita, N. C., & Gibeaut, D. M. (1993). Structural models of primary cell walls in flowering plants: Consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Plant Journal*, 3(1), 1–30.
- Chanliaud, E., Saulnier, L., & Thibault, J.-F. (1995). Alkaline extraction and characterisation of heteroxylans from maize bran. *Journal of Cereal Science*, 21(2), 195–203
- de la Torre-Hernández, M. E. De, 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(1), 77–91
- De Vries, R. P., & Visser, J. (2001). *Aspergillus* enzymes involved in Degradation of plant cell wall polysaccharides. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 65 (4):497-522
- De Vries, R. P., Visser, J., & de Graaff, L. H. (1999). CreA modulates the XlnR-induced expression on xylose of *Aspergillus niger* genes involved in xylan degradation. *Research in Microbiology*, 150(4), 281–285
- Desjardins AE, Munkvold GP, Plattner RD, Proctor RH. (2002). *FUM1*—a gene required for fumonisin biosynthesis but not for maize ear rot and ear infection by *Gibberella moniliformis* in field tests. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 15 (11), 1157–1164
- Doblin, M.S., Pettolino, F. & Bacic, A. (2010). Plant cell walls: the skeleton of the plant world. *Functional Plant Biology*. 37 (5), 357–381
- FAO. (2016). Ahorrar para crecer en la práctica: maíz, arroz y trigo. Guía para la producción sostenible de cereales. Recuperado el 18 de diciembre de 2019, de <http://www.fao.org/3/a-i4009s.pdf>
- Flaherty, J.E., Pirttila, A.M., Bluhm, B.H. and Woloshuk, C.P. (2003). PAC1, a pH- regulatory gene from *Fusarium verticillioides*. *Applied Environmental Microbiology*. 69, 5222– 5227.
- Galeana-Sánchez, E., Sánchez-Rangel, D., de la Torre-Hernández, M. E., Nájera-Martínez, M., Ramos-Villegas, P., Plasencia, J. (2017). Fumonisin B1 produced in planta by *Fusarium verticillioides* is associated with inhibition of

maize β -1,3-glucanase activity and increased aggressiveness. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 100, 75–83.

- Gallardo Reyes, E. D., Ibarra Moreno, G. M., Sánchez Mariñez, R. I., Cuamea Cruz, G., Molina Gil, D., Parra Vergara, N. V., Rosas Burgos, E.C., Cortez Rocha, M. O., (2006). Micobiota de maíz (*Zea mays* L.) recién cosechado y producción de fumonisina B1 por cepas de *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenb. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 24 (1), 27-34
- Glenn, A.E., Zitomer, N.C., Zimeri, A.M., Williams, L.D., Riley, R.T., Proctor, R.H. (2008). Transformation-mediated complementation of a FUM gene cluster deletion in *Fusarium verticillioides* restores both fumonisin production and pathogenicity on maize seed- lings. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 21(1), 87–97
- Gelderblom, W. C. A., Jaskiewicz, K., Marasas, W. F. O., Thiel, P. G., Vlegaar, R., Horak, R. M., & Kriek, N. P. J. (1988). Fumonisins-novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. *Applied & Environmental Microbiology*, 54(7), 1806-1811
- Gutiérrez-Nájera, N., Muñoz-Clares, R.A., Palacios-Bahena, S., Ramirez, J., Sanchez-Nieto, S., Plasencia, J., Gavilanes-Ruíz, M. (2005). Fumonisin B1, a sphingoid toxin, is a potent inhibitor of the plasma membrane H⁺-ATPase, *Planta*, 221(4), 589-596.
- Gutiérrez-Rojas, I., Moreno-Sarmiento, N., & Montoya, D. (2015). Mecanismos y regulación de la hidrólisis enzimática de celulosa en hongos filamentosos: casos clásicos y nuevos modelos. *Revista Iberoamericana de Micología*, 32(1), 1–12
- Hadj-Taieb, N., Tounsi, H., Chabchoub, A., Abid, N., & Gargouri, A. (2011). Studies on the Zymogram Method for the Detection of Pectinolytic Activities Using CTAB. *Applied Biochemistry & Biotechnology*, 165(7/8), 1652–1660
- Hankin, L., & Anagnostakis, S. (1975). The Use of Solid Media for Detection of Enzyme Production by Fungi. *Mycologia*, 67(3), 597-607.
- Himmel, M. E. (2008). *Biomass recalcitrance: deconstructing the plant cell wall for bioenergy*. Blackwell Pub. ISBN:9781444305418
- Huberman, L. B., Liu, J., Qin, L., & Glass, N. L. (2016). Regulation of the lignocellulolytic response in filamentous fungi. *Fungal Biology Reviews*, 30(3), 101–111
- Jian, Q., Li, T., Wang, Y., Zhang, Y., Zhao, Z., Zhang, X., Gong, L., Jiang, Y. (2019). New insights into fumonisin production and virulence of *Fusarium proliferatum* underlying different carbon sources. *Food Research International*, 116, 397–407

- Jonkers W, Rep M. 2009. Mutation of CRE1 in *Fusarium oxysporum* reverts the pathogenicity defects of the FRP1 deletion mutant. *Molecular Microbiology*. 74 (5): 1100–1113
- Khaledi, N., Taheri, P., & Falahati Rastegar, M. (2017). Identification, virulence factors characterization, pathogenicity and aggressiveness analysis of *Fusarium* spp., causing wheat head blight in Iran. *European Journal of Plant Pathology*, 147(4), 897–918.
- Kim, H. and Woloshuk, C.P. (2008) Role of AREA, a regulator of nitrogen metabolism, during colonization of maize kernels and fumonisin biosynthesis in *Fusarium verticillioides*. *Fungal Genetics Biology* 45, 947–953
- King, B.C., Waxman, K.D., Nenni, N.V., Walker, L.P., Bergstrom, G.C., Gibson, D.M. (2011). Arsenal of plant cell wall degrading enzymes reflects host preference among plant pathogenic fungi. *Biotechnology for biofuels* 4 (1), 80
- Kva, M., Marasas, W.F.O., Wingfield, B.D., Wingfield., M.J., & Steenkamp, E.T., (2009). Diversity and evolution of *Fusarium* species in the *Gibberella fujikuroi* complex. *Fungal Diversity*. 34:1-21
- Lee, H. J. & Ryu, D. (2017). Worldwide Occurrence of Mycotoxins in Cereals and Cereal-Derived Food Products: Public Health Perspectives of Their Co-occurrence. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(33), 7034–7051
- Leslie, J. F., & Summerell, B. A. (2006). *The Fusarium Laboratory Manual.*, Ames, Iowa, USA: Blackwell. ISBN: 978-0-813-81919-8
- Li, T., Gong, L., Jiang, G., Wang, Y., Gupta, V. K., Qu, H., Duan X., Wang J., Jiang, Y. (2017). Carbon Sources Influence Fumonisin Production in *Fusarium proliferatum*. *Proteomics*, 17(19) 1-15
- Liu, W., Lu, Y., & Ma, G. (1999). Induction and glucose repression of endo- β -xylanase in the yeast *Trichosporon cutaneum* SL409. *Process Biochemistry*, 34(1), 67–72.
- 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, UNAM.
- Martínez-Sanz, M., Lopez-Sanchez, P., Gidley, M., & Gilbert, E. (2015). Evidence for differential interaction mechanism of plant cell wall matrix polysaccharides in hierarchically-structured bacterial cellulose. *Cellulose*, 22(3), 1541–1563.
- Mendgen, K. and Hahn, M. (2002) Plant infection and establishment of fungal biotrophy. *Trends in Plant Science*. 7 (8), 352–356
- Mohnen, D. (2008). Pectin structure and biosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology*. 11, 266–277

- 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 Genetics and Biology*. 51, 42-49.
- Moretti, A., Susca, A. (2017). *Mycotoxigenic Fungi. Methods and Protocols. Humana Press.* (Vol. 1542) ISBN: 978-1-4939-6707-0
- Munkvold, G. P. 2003. Epidemiology of *Fusarium* diseases and their mycotoxins in maize ears. *European Journal of Plant Pathology*. 109,705-713
- Munkvold, G. P., McGee, D. C., & Carlton, W. M. (1997). Importance of different pathways for maize kernel infection by *Fusarium moniliforme*. *Phytopathology*, 87(2), 209–217.
- Musser, S.M., Plattner, R.D., (1997). Fumonisin composition in cultures of *Fusarium moniliforme*, *Fusarium proliferatum* and *Fusarium nygami*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 45, 1169–1173.
- Neme, K., & Mohammed, A. (2017). Mycotoxin occurrence in grains and the role of postharvest management as a mitigation strategie. A review. *Food Control*, 78, 412–425.
- Niture, S.K. & Pant, A. (2007). Production of cell wall-degrading enzymes by a pH tolerant estuarine fungal isolate *Fusarium moniliforme* NCIM1276 in different culture conditions. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 23, 1169-1177
- Niture, S.K., Kumar, A. R., Pant, A. (2006). Role of glucose in production and repression of polygalacturonase and pectate lyase from phytopathogenic fungus *Fusarium moniliforme* NCIM 1276. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 22(9):893-899
- Oren, L., Ezrati, S., Cohen, D., and Sharon, A. (2003). Early events in the *Fusarium verticillioides*-maize interaction characterized by using a green fluorescent protein-expressing transgenic isolate. *Applied and Environmental Microbiology*. 69, 1695-1701.
- Paccanaro, M. C., Sella, L., Castiglioni, C., Giacomello, F., Martínez-Rocha, A. L., D'Ovidio, R., Schäfer W; Favaron, F. (2017). Synergistic Effect of Different Plant Cell Wall-Degrading Enzymes Is Important for Virulence of *Fusarium graminearum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 30(11), 886–895.
- Picot, A., Barreau, C., Pinson-Gadais, L., Caron, D., Lannou, C., and Richard-Forget, F. (2010). Factors of the *Fusarium verticillioides*-maize environment modulating fumonisin production. *Critical Reviews in Microbiology*. 36, 221-231

- Pitt, J. I., & Hocking, A. D. (2009). *Fungi and food spoilage*. Third edition. New York: Springer
- Polizeli, M. de L. T. M., & Rai, M. (2014). *Fungal enzymes*. CRC Press
- Portnoy, T., Margeot, A., Linke, R., Atanasova, L., Fekete, E., Sándor, E., Hartl, L., Karaffa, L., Druzhinina, I., Seiboth, B., Le Crom, S., Kubicek, C. P. (2011). The CRE1 carbon catabolite repressor of the fungus *Trichoderma reesei*: a master regulator of carbon assimilation. *BMC Genomics*, 12(1), 269–280.
- Proctor, R.H., Brown, D.W., Plattner, R.D. & Desjardins, A.E. (2003). Co-expression of 15 contiguous genes delineates a fumonisin biosynthetic gene cluster in *Gibberella moniliformis*. *Fungal Genetics and Biology*. 38, 237-249
- Prusky, D. B., Bi, F., Moral, J., & Barad, S. (2016). How does host carbon concentration modulate the lifestyle of postharvest pathogens during colonization? *Frontiers in Plant Science*, 7, 1306.
- Ravalason, H., Grisel, S., Chevret, D., Favel, A., Berrin, J.-G., Sigoillot, J.-C., & Herpoël-Gimbert, I. (2012). *Fusarium verticillioides* secretome as a source of auxiliary enzymes to enhance saccharification of wheat straw. *Bioresource Technology*, 114, 589–596
- Ridley, B.L., O'Neill, M.A. & Mohnen, D. (2001). Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry* 57, 929–967
- Rossi, V., Scandolara, A., and Battilani, P. (2009). Effect of environmental conditions on spore production by *Fusarium verticillioides*, the causal agent of maize ear rot. *European Journal of Plant Pathology* 123, 159-169.
- SAGARPA (2018). Atlas agroalimentario 2012-2018. SIAP. México. Recuperado el 18 de diciembre de 2019, de https://nube.siap.gob.mx/gobmx_publicaciones_siap/pag/2018/Atlas-Agroalimentario-2018
- Sánchez-Rangel D, San Juan-Badillo A, Plasencia J. (2005). Fumonisin production by *Fusarium verticillioides* strains isolated from maize in Mexico and Development of a Polymerase Chain Reaction to detect potential toxigenic strains in grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53, 8565-8571
- Sanchez-Rangel, D., Sanchez-Nieto, S., Plasencia, J. (2012). Fumonisin B1, a toxin produced by *Fusarium verticillioides*, modulates maize b-1,3-glucanase activities involved in defense response, *Planta*, 235(5):965-978
- Saulnier, L., Marot, C., Chanliaud, E., & Thibault, J.-F. (1995). Cell wall polysaccharide interactions in maize bran. *Carbohydrate Polymers*, 26(4), 279–287

- Seghers, D., Wittebolle, L., Top, E.M., Verstraete, W., Siciliano, S.D. (2004). Impact of agricultural practices on the *Zea mays* L. endophytic community. *Applied and Environmental Microbiology* 70 (3), 1475-1482.
- Seiboth, B., Herold, S., Kubicek, C.P. (2012) Metabolic Engineering of Inducer Formation for Cellulase and Hemicellulase Gene Expression in *Trichoderma reesei*. In: Wang X., Chen J., Quinn P. (eds) Reprogramming Microbial Metabolic Pathways. *Subcellular Biochemistry*, vol 64. Springer. ISBN: 9789400750548
- Seifert, K.A., Aoki, T., Baayen, R. P., Brayford, D., Burgess, L. W., Chulze, S., Gams, W., Geiser, D., de Gruyter, J., Leslie, J.F., Logrieco, A., Marasas, W. F. O., Nirenberg, H. I., O'Donell, K., Rheeder, J., Samuels, G. J., Summerell, B. A., Thrane, U., Walwijkm, C. (2003). The Name *Fusarium Moniliforme* Should No Longer Be Used. *Mycological Research*, 107(6), 643–644
- Sella, L., Gazzetti, K., Castiglioni, C., Sch" afer, W., D'Ovidio, R., and Favaron, F. (2016). The *Fusarium graminearum* Xyr1 transcription factor regulates xylanase expression but is not essential for fungal virulence. *Plant Pathology*. 65(5), 713–722
- Singh, J. S. & Singh, D. P. (2019). New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering: microbial biotechnology in agro-environmental sustainability. Elsevier. ISBN:9780444641915
- Singh V., Van Oostrom E. J., Jordan D.R., Messina C.D., Cooper M. y G. L. Hammer. (2010). Morphological and architectural development of root systems in sorghum and maize. *Plant Soil*. 1-2, 287-299
- Stanbury, P. F., Whitaker, A., Hall, S. J. (2017). Chapter 2. Microbial growth kinetics. En *Principles of Fermentation Technology* (3^a ed.), p.p. 21-74 Butterworth-Heinemann. ISBN 9780080999531
- Szecsí, A. (1990). Analysis of pectic enzyme zymograms of *Fusarium* species. I: *Fusarium lateritium* and related species. *Journal of Phytopathology*, 128(1):75-83
- Taylor, Neil G. (2008). Cellulose Biosynthesis and Deposition in Higher Plants. *The New Phytologist*, 178(2), 239
- Vogel, H.J. (1956) A convenient growth medium for *Neurospora*. *Microbiol Genetics Bull* 13:42–46
- Vogel, J. (2008). Unique aspects of the grass cell wall. *Current Opinion in Plant Biology*, 11(3), 301–307.
- Wen-Zeng, Q., Hui-Hui, L., Peng. L., Shu-Ting, D., Bing-Qiang, Z., Hwat, B. S., Geng, L., Heng-De, L., Ji-Wang, Z., Bin, Z. (2012). Morphological and

physiological characteristics of corn (*Zea mays* L.) roots from cultivars with different yield potentials. *European Journal of Agronomy*. 38, 54-63

Widels, C. E., Burnes, P. M. and Kommedahl, T. (1988). Five-year preservation of *Fusarium spp* on silica gel and soil. *Phytophatology* 78, 107-109

Wu Y., Li T., Gong L., Wang Y., Jiang Y. (2019). Effects of Different Carbon Sources on Fumonisin Production and *FUM* Gene Expression by *Fusarium proliferatum*. *Toxins* 11 (5) pp 289

A. Anexo Materiales y Métodos

Tabla A1. Composición medios de cultivo con diferentes fuentes de carbono

Medio	Compuesto	Concentración final en el medio
Agar-celulosa	Acetil celulosa (Sigma Aldrich) (39.8% en peso de acetilación)	1%
	Solución Stock Szécsi	1X
	Agar	0.9%
	Tetraciclina	10^{-2} µg/µL
Agar-Pectina	Pectina de manzana (Sigma Aldrich) (50-75% esterificada)	1%
	Solución Szécsi	1X
	Agar	0.9%
	Tetraciclina	10^{-2} µg/µL
Agar-xilosa	D-(+)-Xilosa \geq 99% esterilizado por microfiltración	1%
	Solución Szécsi	1X
	Agar	0.9%

Tabla A2. Composición solución Stock Szécsi (Szécsi, A., 1990)

Componentes	Compuesto	Concentración 10X
Sales minerales	Sulfato de magnesio (MgSO ₄ 7H ₂ O)	4.1 mM
	Cloruro de potasio (KCl)	67.1 mM

Fuente de N	Fosfato de amonio monobásico ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$)	78.2 mM
	Fosfato de amonio dibásico ($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$)	151.5 mM

Tabla A3. Composición medio de cultivo GYAM (Bojja et al., 2004)

Compuesto	Concentración final en el medio
Glucosa	0.12 M
Extracto de levadura	0.05%
Ácido Málico ($\text{COOHCH}_2\text{COHCOOH}$)	50 mM
L-asparagina	8 mM
Stock de Sales GYAM	1X

Tabla A4. Composición solución sales Stock GYAM (Bojja et al., 2004)

Compuesto	Concentración 10X
Cloruro de sodio (NaCl)	1.7 mM
Sulfato de magnesio (MgSO_4)	2.0 mM
Fosfato dibásico de potasio (K_2HPO_4)	4.4 mM
Cloruro de calcio (CaCl_2)	8.8 mM

Tabla A5. Amortiguador de extracción de proteínas

Compuesto	Concentración
Acetato de sodio	50 mM
β -Mercaptoetanol	5 mM

EDTA	10 mM
PVP	1%
Glicerol	10%
Tableta de inhibidor de proteasas. Roche Diagnostics GmbH	1 por cada 25 mL

Tabla A6. Componentes de la cuantificación de proteína por el método de Bradford.

Concentración de BSA (3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) a diferentes diluciones				
Muestra	BSA (μL)	H ₂ O (μL)	Reactivo de Bradford (μL)	Blanco de las muestras (μL)
Blanco 1	-	1000	-	-
Blanco 2	-	800	200	-
Blanco 3	-	800-x	200	x
1	3	797		
2	6	794		
3	9	791		
4	12	788		
5	15	785		
6	18	782		
7	21	779		
Muestras	x	800-x	200	

x= volumen de la muestra que corresponde al volumen del componente que se utilice como blanco de las muestras

Tabla A7. Composición solución Stock Vogel (Vogel, 1956)

Compuesto	Concentración 50X
Citrato de sodio ($\text{HOC}(\text{COONa})(\text{CH}_2\text{COONa})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.42 mM
Fosfato dipotásico (K_2HPO_4)	1.8 M
Nitrato de potasio (KNO_3)	1.25 M
Sulfato de magnesio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	40.6 mM
Cloruro de calcio ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	34.0 mM
Solución de elementos traza	5 mL

Tabla A8. Solución de elementos traza Vogel (Vogel, 1956)

Compuesto	Concentración
Ácido cítrico ($\text{HOC}(\text{COOH})(\text{CH}_2\text{COOH})_2$)	260.0 mM
Sulfato de zinc ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$)	173.9 mM
Sal de sodio EDTA Hierro (III)	25.5 mM
Sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	10.0 mM
Cloruro de manganeso ($\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$)	2.95 mM
Ácido bórico (H_3BO_3)	8.1 mM
Oxido de molibdeno (MoO_3)	2.1 mM

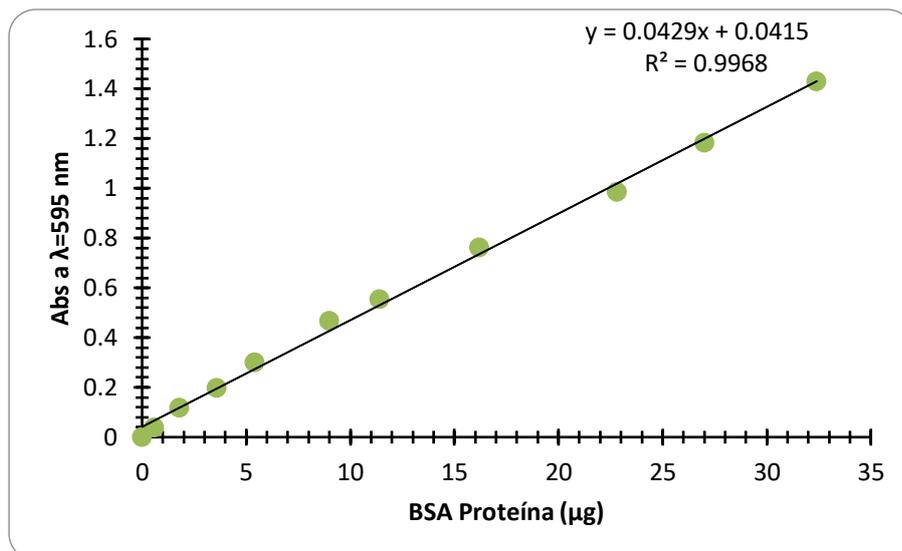


Figura A1. Curva patrón de proteínas. Método de Bradford. Se empleó BSA como estándar

Preparación del reactivo de DNS

Para preparar 15 mL de reactivo de DNS, se pesaron 150 mg de ácido 3,5-dinitrosalicílico y mezclar con 3 mL de NaOH 2M + 7 mL de solución TSP* + 5 mL de H₂O, esto en un frasco ámbar para proteger de la luz. El reactivo de DNS debe ser preparado fresco antes de cada determinación.

*Solución TSP (Tartrato de sodio y potasio): Disolver 30 g de tartrato sodio y potasio en 50 mL de agua. Se añade lentamente bajo agitación. Conservar en refrigeración.

Fundamento de la medición de azúcares reductores con DNS

Para la determinación de la actividad se utilizó un ensayo indirecto que se basa en detectar los productos de la reacción entre el DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) y un azúcar reductor, que forma el 3-amino-5-nitrosalicílico (de color rojo) el cual es medido espectrofotométricamente a una absorbancia de 540 nm

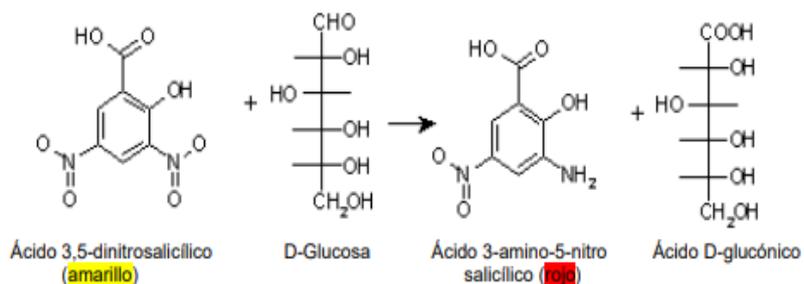


Figura A2. Estructuras de la reacción de un azúcar reductor (glucosa) y el ácido 3,5-dinitrosalicílico.

Tabla A9. Composición de la curva patrón de glucosa.

Solución Stock de Glucosa (2 mg/mL)				
Muestra	Volumen del Stock de glucosa (μL)	Cantidad de Glucosa (μmol)	Volumen de amortiguador acetatos (μL)	Volumen de reactivo de DNS (μL)
B. curva	0	0	50	50
1	5	0.06	45	50
2	10	0.11	40	50
3	15	0.17	35	50
4	20	0.22	30	50
5	25	0.28	25	50
6	30	0.33	20	50

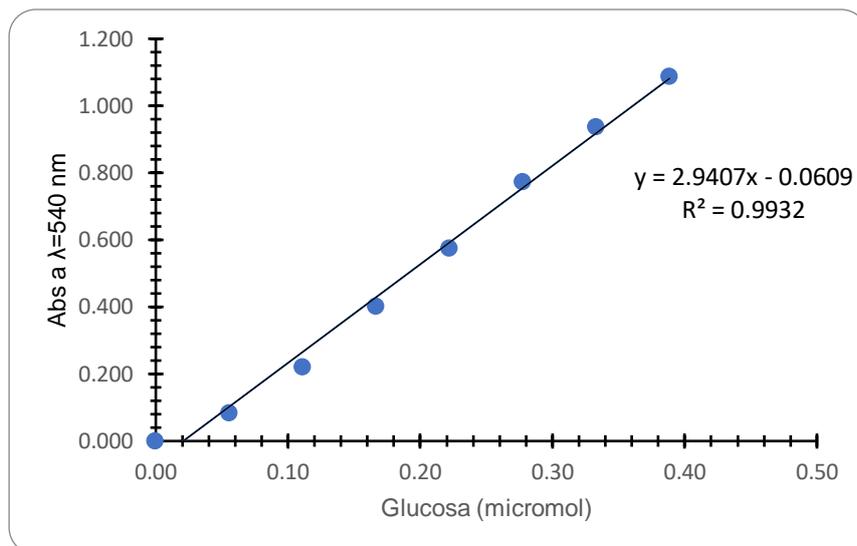


Figura A3. Curva patrón de glucosa por el método de DNS.

Tabla A10. Mezclas de reacción de ensayos de actividad enzimática.

	Composición de la mezcla de reacción
Bb= Blanco del amortiguador	150 µL amortiguador de acetatos pH 5 + 50 µL de agua desionizada
Brx= Blanco de reacción	150 µL amortiguador de acetatos pH 5 + 50 µL de extracto proteico
Bs= Blanco de sustrato	150 µL sustrato (5 mg/mL) disuelto en amortiguador de acetatos pH 5 + 50 µL de agua desionizada

Tabla A11. Composición de medio líquido basal para el análisis de producción de FB1 en *Fusarium verticillioides*.

Componente	Concentración
Solución de sales Szécsi 10X	1X
Extracto de levadura	0.05%

Ácido málico		50 mM
Fuente de C	Concentración	pH
Glucosa	1%	2.54
Galactosa	1%	2.54
Pectina	1%	2.71
Salvado de trigo	6%	3.27

Tabla A12. Preparación de la curva patrón de FB1.

Muestra	Volumen de muestra (μL)	Volumen de OPA (μL)	ACN:Agua (1:1) (μL)	fmoles en 20 μL
Blanco	10 ACN:agua	25	465	0
FB1 (12.5 μM)	10	25	465	62.5
FB1 (25 μM)	10	25	465	125
FB1 (50 μM)	10	25	465	187.5
FB1 (100 μM)	10	25	465	250

Tabla A13. Parámetros en el detector de fluorescencia marca Shimadzu, Modelo: RF-10AXL para el análisis de fumonisina.

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

SENSITIVITY	1
RESPONSE	4

Tabla A14. Parámetros del Integrador Shimadzu C-R5A para el análisis de fumonisina.

Atenuación	4
Pendiente	35 000
Método	0021
Formato	40

Volumen de la alícuota (µL) tomada cada 24 h

Conc. de FB1	Tubo de ensayo (mL)	Volumen de la alícuota (µL) tomada cada 24 h					Vol. total ocupado
		Tiempo (h)					
		24	48	72	96	120	
0 µM	5	300	300	300	300	300	1.5 mL
	5	300	300	300	300	300	1.5 mL
	5	300	300	300	300	300	1.5 mL
	5	300	300	300	300	300	1.5 mL
5 µM	5	300	300	300	300	300	1.5 mL
	5	300	300	300	300	300	1.5 mL
	5	300	300	300	300	300	1.5 mL
	5	300	300	300	300	300	1.5 mL
10 µM	5	300	300	300	300	300	1.5 mL
	5	300	300	300	300	300	1.5 mL
	5	300	300	300	300	300	1.5 mL
	5	300	300	300	300	300	1.5 mL
20 µM	5	300	300	300	300	300	1.5 mL
	5	300	300	300	300	300	1.5 mL
	5	300	300	300	300	300	1.5 mL
	5	300	300	300	300	300	1.5 mL

Al final de la recolección de las muestras se quedó un 30% menos del medio de cultivo original.

B. Anexo Resultados

1. Cromatografía en capa fina (CCF)

Se realizó CCF utilizando como fase estacionaria un soporte de sílice (SiO_2) y la para la fase móvil etanol, butanol y agua (5:9:6, v:v:v). El revelador que se utilizó fue orcinol el cual reacciona con los grupos alcohol de los carbohidratos. El límite de detección para este revelador comprende entre los 0.8-0.4 μg .

Como estándares se utilizaron diferentes azúcares, los cuales se muestran sus valores promedio de Rf en la Tabla

Tabla A16. Rf en CCF promedios de diferentes carbohidratos

Carbohidrato	Rf promedio
Glucosa	0.59
Fructosa	0.60
Galactosa	0.57
Sacarosa	0.56
Lactosa	0.46
Maltosa	0.50
Maltotriosa	0.44

Para los ensayos en CCF se corrieron las muestras de la reacción enzimática de las pectinasas y sus blancos de reacción, los cuales no contenían el sustrato, esto para todas las cepas de *Fusarium spp*, tal y como se observa en la Figura A4

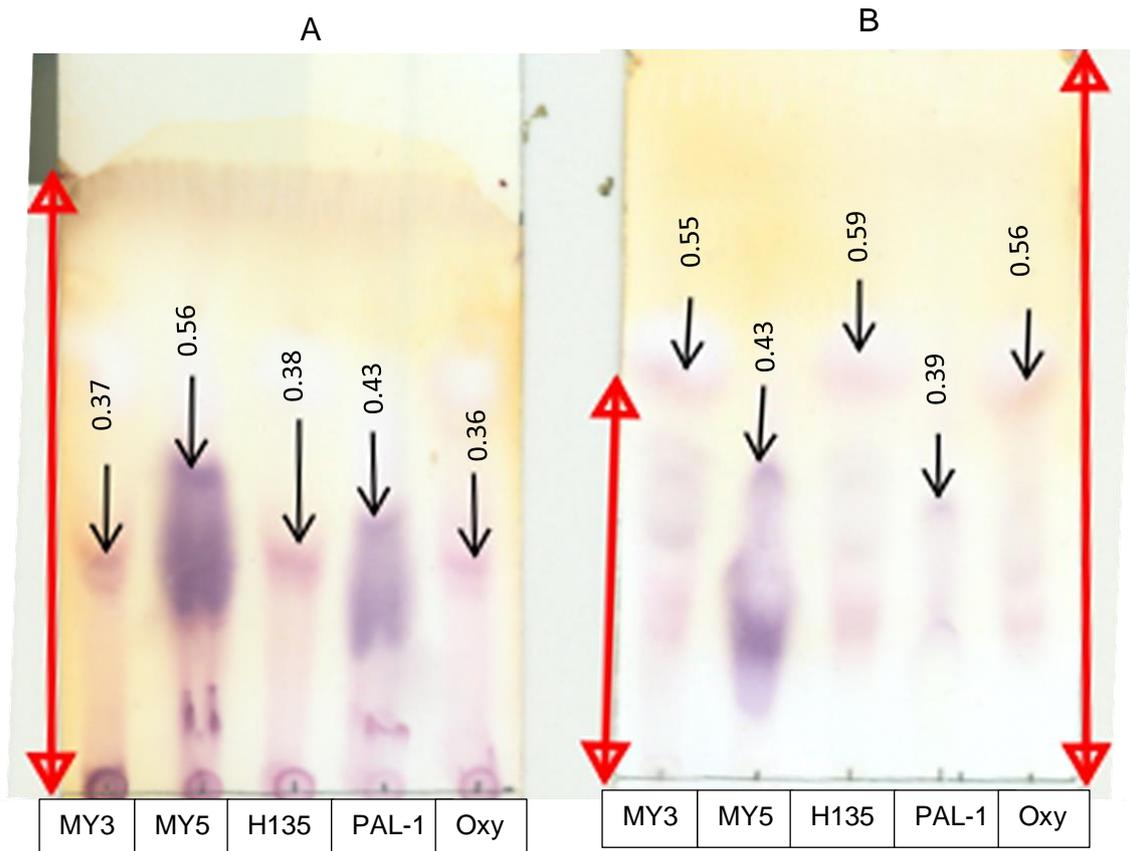


Figura A4. Cromatografía en capa fina de los productos de hidrólisis de la incubación de pectina con las fracciones extracelulares de cultivos de las cinco cepas de *F. verticillioides*. **A:** Blanco de reacción enzimática de pectinasas de las cepas de *Fusarium* spp. **B:** Reacción enzimática de pectinasas de las cepas de *Fusarium* spp. en presencia de pectina de manzana. Los productos se separaron en una placa de silica gel y se resolvieron con una mezcla de etanol/ butanol/ agua (5:9:6, v:v:v) como fase móvil. La placa se reveló con una solución de orcinol.

2. Cinética de crecimiento y actividad de la cepa MY3 de *Fusarium verticillioides*

La producción de biomasa de *F. verticillioides* expresada como la diferencia de peso, obtenida a lo largo del tiempo en medio líquido suplementado con pectina de manzana se muestra en la Figura A5, en ella se aprecia que el crecimiento en mg más alto alcanzado ocurre a las 144 h.

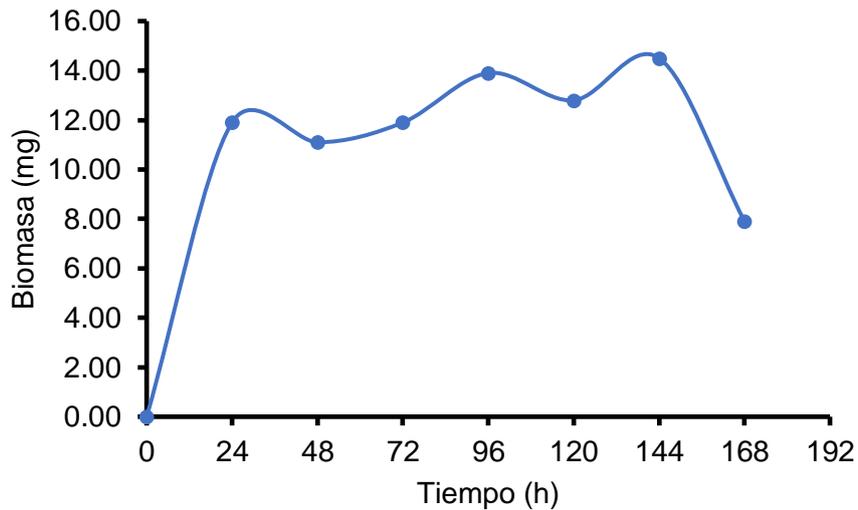


Figura A5. Producción de biomasa de *F. verticillioides* en presencia de pectina de manzana en medio líquido

En la Figura A6 se muestra la actividad de pectinasas de *F. verticillioides* obtenida a lo largo del tiempo en medio suplementado con pectina de manzana. Se observa que la actividad más alta para pectinasas se alcanza a las 120 h alcanzando un valor de 0.046 U

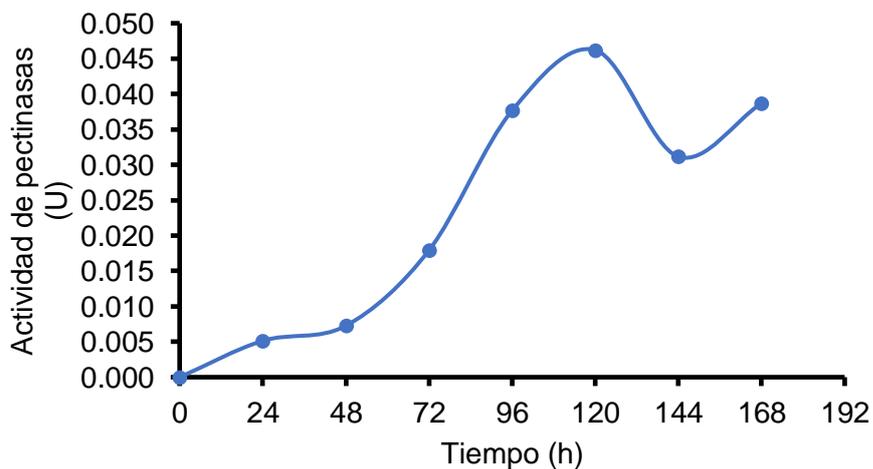


Figura A6. Actividad enzimática de *F. verticillioides* cepa MY3 en presencia de pectina de manzana como sustrato en medio líquido.