



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**PAPEL DE LAS BENZOAZOLINONAS EN LA
INTERACCIÓN *FUSARIUM VERTICILLIOIDES* – MAÍZ**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA

MAYTE GARCÍA LÓPEZ

TUTOR

FRANCISCO JAVIER PLASENCIA DE LA PARRA



CDMX

2023



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesora: MEJIA CHAVEZ ADRIANA GUADALUPE

VOCAL: Profesor: PLASENCIA DE LA PARRA FRANCISCO JAVIER

SECRETARIO: Profesora: BERNAL GRACIDA LILIA ANGELICA

1er. SUPLENTE: Profesor: GUTIERREZ AGUILAR MANUEL

2° SUPLENTE: Profesora: CASTELLANOS ROMAN LUZ DEL CARMEN

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Departamento de Bioquímica, Laboratorio 101, Conjunto E, Facultad de Química, UNAM.

ASESOR DEL TEMA: Dr. F. Javier Plasencia de la Parra

SUSTENTANTE: Mayte García López

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis se realizó con el apoyo de los proyectos:

DGAPA-PAPIIT IN227720 “Función de los mecanismos de defensa preformados de maíz en la interacción con *Fusarium verticillioides*”.

PAIP 5000-9121, Facultad de Química, UNAM.

Mayte García López recibió una beca (Titulación) por parte del proyecto DGAPA-PAPIIT IN227720 durante el desarrollo de este trabajo.

ABREVIATURAS

µg: Microgramos	Glc: Glucósido
µL: Microlitros	h: Horas
µm: Micrómetros	HBOA: 2-Hidroxi-2 <i>H</i> -1,4-benzoxazin-3(4 <i>H</i>)-ona
µM: Micromolar	HPAA: <i>N</i> -(2-hidroxifenil)acetamida
2-AP: 2-Aminofenol	HPLC: Cromatografía de líquidos de alta resolución
AAPO: 2-Acetilamino-3 <i>H</i> -fenoxazin-3-ona	HPMA: Ácido <i>N</i> -(2-hidroxifenil)malonámico
APO: 2-Amino-3 <i>H</i> -fenoxazin-3-ona	IGP: Indol-3-glicerolfosfato
AX: Arabinoxilano	JA: Ácido jasmónico
BOA: 2-Benzoxazolinona	M: Molar
Bx: <i>Benzoxazineless</i>	MBOA: 6-Metoxibenzoxazolin-2(3 <i>H</i>)-ona
BXs: Benzoxazinoides	mg: Miligramos
CFU: Unidades formadoras de colonias	min: Minutos
cm: Centímetros	mL: Mililitros
CMI: Concentración mínima inhibitoria	mM: Milimolar
DE: Desviación estándar	Mpb: Millón de pares de bases
DIBOA: 2,4-Hidroxi-2 <i>H</i> -7-1,4-benzoxazin-3(4 <i>H</i>)-ona	MSA: Alineamiento múltiple de secuencias
DIMBOA: 2,4-Hidroxi-7-metoxi-2 <i>H</i> -1,4-benzoxazin-3(4 <i>H</i>)-ona	ng: Nanogramos
DMSO: Dimetilsulfóxido	nm: Nanómetros
EC ₅₀ : Concentración efectiva 50	<i>o</i> -AP: <i>o</i> -Aminofenol
EF-1α: Factor de elongación 1α	PDA: Agar papa dextrosa
EROs: Especies reactivas de oxígeno	rpm: Revoluciones por minuto
ET: Etileno	SA: Ácido salicílico
EtOH: Etanol	STD: Estándar
FB1: Fumonisin B1	TLC: Cromatografía de capa fina
FA: Ácido ferúlico	TSA: Triptófano sintasa
g: Gramos	UV: Ultravioleta
GAX: Glucurono arabinoxilanos	

CONTENIDO

I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCIÓN	2
1. Maíz	2
1.1. Características generales	2
1.1.1. Microorganismos patógenos como limitantes en la producción de maíz	4
1.2. Mecanismos de defensa	4
1.2.1. Mecanismos constitutivos	5
1.2.2. Mecanismos inducibles	10
2. Benzoxazolinonas	12
2.1. Características generales	12
2.2. Estructura	13
2.3. Biosíntesis	14
2.4. Actividad biológica	17
2.4.1. Fitosideróforos	17
2.4.2. Alelopatía	17
2.4.3. Insecticida	19
2.4.4. Antibacteriano	19
2.4.5. Antifúngico	20
3. <i>Fusarium verticillioides</i>	22
3.1. Taxonomía y características generales	22
3.2. Morfología	24
3.3. <i>F. verticillioides</i> como patógeno del maíz	26
3.3.1. Mecanismos de penetración de <i>F. verticillioides</i> en maíz	26
3.3.2. Enfermedades causadas por <i>F. verticillioides</i> en maíz	28
3.3.2.1. Tizón de la plántula	29
3.3.2.2. Pudrición del tallo	30
3.3.2.3. Pudrición de la mazorca y grano	30
3.3.3. Producción de fumonisinas y su función en la virulencia	31
4. Biotransformación de las benzoxazolinonas por <i>Fusarium verticillioides</i>	32
4.1. Actividad de β -metalolactamasa	32
4.2. Actividad de <i>N</i> -acetiltransferasa (<i>NAT</i>)	33
III. JUSTIFICACIÓN	35
IV. ANTECEDENTES	36
V. HIPÓTESIS	37

VI. OBJETIVOS	37
VII. MATERIALES Y MÉTODOS	38
1. Material biológico	38
1.1. Cepas de <i>Fusarium verticillioides</i>	38
1.2. Colecta y conteo de conidias	38
1.3. Genotipo de maíz	39
2. Análisis bioinformático de la filogenia del gen <i>NAT1</i>	39
3. Análisis de la presencia del gen <i>NAT1</i> en las cepas de <i>Fusarium verticillioides</i>	39
3.1. Extracción de DNA	39
3.2. Ensayos de PCR	40
3.2.1. Electroforesis horizontal en gel de agarosa	40
4. Evaluación de la capacidad de biotransformación de BOA y MBOA por <i>Fusarium verticillioides</i>	41
4.1. Inoculación, condiciones de incubación y muestreo	41
4.2. Análisis por Cromatografía en Capa Fina	41
4.3. Cuantificación por HPLC	42
4.3.1. Condiciones de análisis	42
5. Evaluación del HPMA como producto de la biotransformación de BOA por <i>Fusarium verticillioides</i>	42
5.1. Obtención del estándar de HPMA	42
5.2. Cuantificación de HPMA por HPLC	43
5.2.1. Condiciones de análisis	43
6. Efecto del 2-Aminofenol (2-AP) sobre el crecimiento radial de <i>Fusarium verticillioides</i>	43
6.1. Inoculación y condiciones de incubación	43
6.2. Medición del diámetro del crecimiento de las colonias	43
7. Evaluación de la capacidad de biotransformación de 2-Aminofenol (2-AP) por <i>Fusarium verticillioides</i>	44
7.1. Inoculación, condiciones de incubación y muestreo	44
7.2. Evaluación por TLC	44
7.3. Cuantificación por HPLC	44
8. Efecto del Ácido Ferúlico (FA) sobre el metabolismo de BOA y en el crecimiento radial de <i>Fusarium verticillioides</i>	45
8.1. Ensayo de crecimiento radial	45
8.2. Evaluación por TLC y cuantificación de BOA por HPLC	45
9. Ensayo de infección de raíces de maíz por <i>Fusarium verticillioides</i> y evaluación de la producción de benzoxazolinonas	45

9.1.	Desinfección de semillas	45
9.2.	Inoculación y condiciones de incubación	46
9.3.	Tinción histoquímica de benzoxazinoïdes en raíces primarias	46
VIII.	RESULTADOS	47
1.	Análisis bioinformático de la filogenia del gen <i>NAT1</i> en <i>Fusarium verticillioides</i>	47
2.	Análisis de la presencia del gen <i>NAT1</i> en cepas de <i>Fusarium verticillioides</i>	49
3.	Evaluación de la capacidad de biotransformación de 2-BOA y MBOA por <i>Fusarium verticillioides</i>	50
3.1.	Diversidad en el metabolismo de 2-BOA por <i>F. verticillioides</i>	50
3.2.	Diversidad en el metabolismo de MBOA por <i>F. verticillioides</i>	53
4.	Evaluación del HPMA como producto de la biotransformación de BOA por <i>Fusarium verticillioides</i>	55
5.	Efecto del 2-Aminofenol (2-AP) sobre el crecimiento radial de <i>Fusarium verticillioides</i>	56
6.	Evaluación de la capacidad de biotransformación de 2-Aminofenol (2-AP) por <i>Fusarium verticillioides</i>	59
7.	Efecto del ácido ferúlico sobre el metabolismo de BOA y en el crecimiento radial de <i>Fusarium verticillioides</i>	60
8.	Ensayo de infección de raíces de maíz por <i>Fusarium verticillioides</i> y evaluación de la producción de benzoxazolinonas	62
IX.	DISCUSIÓN	65
1.	Análisis bioinformático del gen <i>NAT1</i>	65
2.	Análisis de la presencia del gen <i>NAT1</i> en las cepas de <i>Fusarium verticillioides</i>	66
3.	Capacidad de biotransformación de BOA y MBOA por <i>Fusarium verticillioides</i>	66
4.	Evaluación de HPMA como producto de la biotransformación de BOA por <i>Fusarium verticillioides</i>	67
5.	Efecto del 2-Aminofenol (2-AP) sobre el crecimiento radial de <i>Fusarium verticillioides</i>	67
6.	Capacidad de biotransformación de 2-Aminofenol (2-AP) por <i>Fusarium verticillioides</i>	68
7.	Efecto del ácido ferúlico sobre el metabolismo de BOA y en el crecimiento radial de <i>Fusarium verticillioides</i>	70
8.	Infección de raíces de maíz por <i>Fusarium verticillioides</i> y producción de benzoxazolinonas	71
X.	CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	72
1.	Conclusiones	72
2.	Perspectivas	73
XI.	REFERENCIAS	74

XII. ANEXO	82
1. Preparación de medios	82
1.1. Preparación de medio Czapek	82
1.2. Preparación de medio PDA 0.5X	82
1.3. Preparación de Agar 1.2 %	83
2. Preparación de curva patrón	83
2.1. BOA y MBOA	83
2.2. HPMA	85
2.3. 2-Aminofenol	86

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de las hemicelulosas.	6
Figura 2. Representación de la estructura de la pared celular secundaria en maíz.	7
Figura 3. Clasificación de los compuestos saponínicos.	9
Figura 4. Fitoalexinas producidas por el maíz.	11
Figura 5. Vía de producción de benzoxazolinonas.	13
Figura 6. Derivados de benzoxazinoides y su estructura química.	14
Figura 7. Genes involucrados en la biosíntesis de benzoxazinoides en maíz.	15
Figura 8. Biosíntesis de benzoxazinoides en maíz.	16
Figura 9. Comparación de los efectos alelopáticos de BOA y DIBOA.	18
Figura 10. Estructura general de las fumonisinas del grupo B.	23
Figura 11. Aspecto microscópico de <i>Fusarium verticillioides</i> .	25
Figura 12. Cultivos de <i>Fusarium verticillioides</i> cepa MY3 en agar papa dextrosa.	26
Figura 13. El ciclo de la enfermedad por <i>Fusarium verticillioides</i> , centrado en el ciclo de vida del maíz.	28
Figura 14. Plántulas de maíz infectadas por <i>Fusarium verticillioides</i> .	29
Figura 15. Pudrición del tallo provocada por <i>Fusarium spp.</i>	30
Figura 16. Pudrición de la mazorca provocada por <i>Fusarium spp.</i>	31
Figura 17. Biotransformación de las benzoxazolinonas por <i>Fusarium verticillioides</i> .	32
Figura 18. Inhibición de la actividad de NAT1 por distintos fitoquímicos.	34
Figura 19. Patrón de crecimiento radial de distintas cepas de <i>Fusarium verticillioides</i> en medio PDA suplementado con BOA (0.5 mg/mL) durante 8 días.	36
Figura 20. Inoculación de raíces primarias con <i>Fusarium verticillioides</i> .	46
Figura 21. Árbol filogenético que muestra la relación entre las secuencias de la posible proteína NAT1 codificada en el locus <i>FDB2</i> con sus homólogos presentes en <i>Fusarium spp.</i>	48
Figura 22. Árbol filogenético que muestra la relación entre las secuencias de la posible proteína NAT1 codificada en el locus <i>FDB2</i> con sus homólogos presentes en especies de hongos no pertenecientes a <i>Fusarium spp.</i>	49
Figura 23. Amplificación del gen <i>NAT1</i> a partir de cepas de <i>F. verticillioides</i> mediante PCR.	50
Figura 24. Biotransformación de 2-BOA por 10 cepas de <i>Fusarium verticillioides</i> analizadas por TLC.	51
Figura 25. Evaluación de la biotransformación de BOA por 4 cepas de <i>Fusarium verticillioides</i> (MY3, MY5, FQZR-76 y FQH135-1) mediante TLC.	52
Figura 26. Cromatograma representativo de las benzoxazolinonas y de los productos de la biotransformación cuantificados por HPLC.	52
Figura 27. Biotransformación de BOA por cuatro cepas de <i>Fusarium verticillioides</i> (MY3, MY5, FQZR-76 y FQH135-1).	53
Figura 28. Evaluación de la biotransformación de MBOA por 4 cepas de <i>Fusarium verticillioides</i> (MY3, MY5, FQZR-76 y FQH135-1) mediante TLC.	54
Figura 29. Biotransformación de MBOA por cuatro cepas de <i>Fusarium verticillioides</i> (MY3, MY5, FQZR-76 y FQH135-1).	54
Figura 30. Evaluación a las 24 horas de la producción de HPMA por 4 cepas de <i>F. verticillioides</i> .	55

Figura 31. Evaluación a las 72 horas de la producción de HPMA por 4 cepas de <i>F. verticillioides</i> .	56
Figura 32. Crecimiento radial de dos cepas de <i>Fusarium verticillioides</i> (MY3 y FQZR-76) en medio PDA 0.5X suplementado con distintas concentraciones de 2-Aminofenol.	57
Figura 33. Efecto de concentraciones crecientes de 2-Aminofenol (2-AP) en el crecimiento radial de la cepa MY3 de <i>Fusarium verticillioides</i> .	58
Figura 34. Efecto de concentraciones crecientes de 2-Aminofenol (2-AP) en el crecimiento radial de la cepa FQZR-76 de <i>Fusarium verticillioides</i> .	58
Figura 35. Evaluación de la biotransformación de 2-AP por 4 cepas de <i>Fusarium verticillioides</i> (MY3, MY5, FQZR-76 y FQH135-1) mediante TLC.	59
Figura 36. Cromatograma representativo 2-AP cuantificado por HPLC.	59
Figura 37. Biotransformación de 2-AP por cuatro cepas de <i>Fusarium verticillioides</i> (MY3, MY5, FQZR-76 y FQH135-1).	60
Figura 38. Crecimiento radial de la cepa MY3 de <i>Fusarium verticillioides</i> en medio PDA 0.5X suplementado con BOA y distintas concentraciones de ácido ferúlico (FA).	61
Figura 39. Efecto del ácido ferúlico (FA) en el crecimiento radial de la cepa MY3 de <i>Fusarium verticillioides</i> .	61
Figura 40. Efecto del ácido ferúlico en biotransformación de 2-BOA por <i>Fusarium verticillioides</i> (MY3).	62
Figura 41. Infección de raíces con <i>Fusarium verticillioides</i> en agar 1.2 %.	63
Figura 42. Tinción de benzoxazinoides en raíces primarias de maíz infectadas con <i>Fusarium verticillioides</i> (MY5, MY3, FQZR-76 y FQH135-1).	64
Figura 43. Biotransformación de las benzoxazolinonas por <i>Fusarium verticillioides</i> en varios metabolitos.	69
Figura A1. Curva patrón de 2-BOA obtenida por HPLC.	84
Figura A2. Curva patrón de MBOA obtenida por HPLC.	84
Figura A3. Curva patrón de HPMA obtenida por HPLC.	85
Figura A4. Curva patrón de 2-AP obtenida por HPLC.	86

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición aproximada del grano de maíz.	3
Tabla 2. Actividad antibacteriana de algunas benzoxazinonas y benzoxazolinonas.	19
Tabla 3. Actividad antifúngica de algunas benzoxazinonas y benzoxazolinonas observadas a distintas concentraciones.	20
Tabla 4. Actividad antifúngica de las benzoxazolinonas y algunos de sus productos de degradación.	21
Tabla 5. Primers utilizados en este estudio.	40
Tabla 6. Parámetros del integrador utilizados en HPLC.	42
Tabla 7. Concentraciones y cantidades utilizadas para suplementar el medio PDA.	83

I. RESUMEN

Fusarium verticillioides es un hongo hemibiótrofo que causa varias enfermedades en maíz (*Zea mays* L.), provocando pérdidas de rendimiento y de la calidad del grano. Este microorganismo patógeno ha evolucionado para adaptarse y superar los mecanismos constitutivos de defensa del maíz, pues es capaz de metabolizar a las benzoxazolinonas, que son compuestos con actividad antimicrobiana producidos por la planta. Para su metabolismo, requiere del gen, *MBL1*, que codifica para una metalo- β -lactamasa que hidroliza las benzoxazolinonas para formar el intermediario 2-aminofenol (2-AP), y del gen *NAT1* que codifica para una arilamina-*N*-aciltransferasa generando ácido *N*-(2-hidroxifenil) malonámico (HPMA) que es un compuesto no tóxico.

Dado que el objetivo principal es estudiar la función de las benzoxazolinonas en la interacción *Fusarium verticillioides* –*Zea mays*, y determinar si hay una asociación entre la virulencia de *F. verticillioides* con su tolerancia a las benzoxazolinonas, se evaluó la existencia de diferencias en la tolerancia y metabolismo de BOA (2-benzoxazolinona), MBOA (6-metoxi-2-benzoxazolinona) y 2-AP (2-aminofenol) entre cuatro cepas de *F. verticillioides* aisladas de mazorcas de maíz que difieren en cuanto a su agresividad y producción de fumonisina B1 (MY3, MY5, FQZR-76 y FQH135-1). Se determinó que existe diversidad en la capacidad de tolerancia y biotransformación a las benzoxazolinonas (BOA y MBOA) y al intermediario con mayor toxicidad 2-AP, por parte de *F. verticillioides* mediante la comparación de la capacidad de metabolizar y tolerar estos compuestos de defensa constitutivos del maíz en distintas cepas de *F. verticillioides*. Más adelante se determinó si se veía afectada la biotransformación por el ácido ferúlico (FA) que es un compuesto presente en el maíz. Además se estableció un ensayo preliminar de infección de *F. verticillioides* en raíces de plántulas de maíz, para determinar si la infección por las mismas cuatro cepas de *F. verticillioides* mencionadas con anterioridad inducían la producción de benzoxazolinonas en tejidos de maíz.

Además, se identificó una cepa con alta capacidad para tolerar y metabolizar BOA, MBOA y 2-AP.

II. INTRODUCCIÓN

1. Maíz

1.1. Características generales

El maíz (*Zea mays*) es uno de los principales cultivos a nivel mundial, junto con el arroz y el trigo, debido a que son los cereales con mayor extensión de área cultivada y son fuentes esenciales de calorías para grandes segmentos de la población. Los principales países productores de maíz son EEUU., China, Brasil y México. La aceptación del maíz como cultivo se debe principalmente a sus diversas funcionalidades, ya que representa una fuente crucial de alimentos, combustible y fibras (Arendt & Zannini, 2013). El cultivo de este cereal se ha extendido a todas las regiones tropicales, semitropicales y templadas del mundo, debido a su amplia diversidad genética que permite su adaptación (Skoufogianni *et al.*, 2020).

Estudios taxonómicos y morfológicos indican que el teosinte (*Zea perennis*) es el antecesor silvestre del maíz. Además de que se reporta que el maíz fue domesticado en México hace al menos 8700 años, ya que evidencia molecular indica que el ancestro silvestre del maíz es nativo del bosque tropical estacionalmente seco de la cuenca del Balsas Central, al oriente de Michoacán, suroeste del estado de México y norte de Guerrero (Ranere *et al.*, 2009).

Zea mays agrupa cuatro subespecies que son: *Zea mays L. ssp. huehuetenangensis*, *Zea mays L. ssp. mexicana*, *Zea mays L. ssp. parviglumis* y *Zea mays L. ssp. mays* (Kato *et al.*, 2009). El maíz cultivado (*Z. mays L.*), es una planta diploide con 10 cromosomas y es miembro de la familia de las gramíneas (*Poaceae*). El maíz al ser una planta monoica cuenta con inflorescencia masculina y femenina, separadas pero en el mismo individuo. En las ramas, se desarrollan los órganos femeninos, que son estructuras vegetativas denominadas espádices; mientras que la parte masculina, presenta una panícula o espiga, que produce una alta cantidad de polen y se encuentra en la parte superior de la planta. Una planta puede ser fecundada por el polen proveniente de otras plantas, transportado por el viento, pero también puede ser autopolinizada (CONACyT, 2011; Skoufogianni *et al.*, 2020).

Durante el crecimiento del maíz, se distinguen dos fases: una vegetativa y otra reproductiva. La fase vegetativa comienza con la germinación de la semilla de maíz y culmina con la aparición de la inflorescencia masculina. A partir de una semilla se desarrolla una planta de porte robusto y anual, que generalmente mide entre 2.0 y 3.5 m de altura, con pocas

ramificaciones en el tallo que presenta nudos y entrenudos, y hasta 21 hojas. La fase reproductiva comienza con la aparición de la inflorescencia femenina que son mechones de estilos largos y finos, así como el desarrollo de la inflorescencia masculina, que son las anteras en el extremo superior del tallo (Dinolfo *et al.*, 2022). Por lo general, una planta de maíz alcanza la madurez fisiológica en 125 días; sin embargo, este tiempo varía con el genotipo, la ubicación, la fecha de siembra, etc. (Kato *et al.*, 2009; Arendt & Zannini, 2013).

Las raíces primarias son fibrosas y presentan raíces adventicias que nacen en los primeros nudos por encima de la superficie del suelo, y ambas tienen la función de mantener a la planta erecta (Kato *et al.*, 2009). El sistema radicular, altamente ramificado, está ubicado en la sección superior entre 0.8 – 1.0 m del suelo y alrededor del 80% de la absorción de agua se da desde esta profundidad. Este sistema de raíces alcanza su mayor profundidad en la mitad de la etapa reproductiva, y en suelos profundos pueden alcanzar una profundidad de 2.0 m (Arendt & Zannini, 2013).

Los componentes principales del grano de maíz son los polisacáridos, las proteínas y los lípidos, de los cuales el almidón es el componente principal debido a que los carbohidratos son de los principales constituyentes químicos de la cariopsis del maíz (Tabla 1). Un grano de maíz típico se compone de 70 a 75 % de almidón (del peso seco del grano) y se encuentra principalmente en el endospermo. Mientras que el embrión es particularmente rico en lípidos, minerales y azúcares, pero este también contiene vitaminas, especialmente las vitaminas liposolubles A y E. Entonces el maíz contiene una proporción de todas las vitaminas importantes en la dieta humana con excepción de la vitamina B12 (Arendt & Zannini, 2013).

Tabla 1. Composición aproximada del grano de maíz.

Constituyente	Rango (por 100 g)
Humedad (g)	7–23
Almidón (g)	61–78
Proteína (g)	6–12
Lípidos (g)	3.1–5.7
Ceniza (g)	1.1–3.9
Fibra (g)	8.3–11.9
Pentosanos (g)	5.8–6.6

Celulosa + Lignina (g)	3.3–4.3
Azúcar (g)	1.0–3.0
Carotenoides totales (mg)	0.5–4.0

Nota. Tomada de Arendt & Zannini, 2013.

1.1.1. Microorganismos patógenos como limitantes en la producción de maíz

El maíz, como cualquier cultivo, está expuesto a plagas de insectos y microorganismos patógenos diversos que incluyen a virus, bacterias y hongos, parásitos como nematodos, así como también organismos pluricelulares como moluscos, artrópodos y vertebrados (Agrios, 2005; Anaya-Lang & Espinosa-García, 2006; Camacho-Escobar *et al.*, 2020). Las plantas cuentan con mecanismos de defensa que constan de barreras físicas y químicas que tienen funciones estructurales y tóxicas para impedir la entrada de patógenos; o para limitar infecciones mediante una respuesta rápida y eficiente, evitando su propagación en la planta (Plasencia, 2016).

1.2. Mecanismos de defensa

Los mecanismos de defensa en plantas van desde adaptaciones anatómicas hasta compuestos químicos particulares de cada especie, que permiten contender con los microorganismos fitopatógenos. Estas defensas tienen propiedades particulares y se pueden clasificar en dos tipos, que son mecanismos de defensa constitutivos (también llamados pasivos o preexistentes) e inducibles (García-Montalvo, 2016; Camacho-Escobar *et al.*, 2020). Las defensas constitutivas se refieren a barreras y moléculas estructurales, así como también a numerosos compuestos preformados (fitoanticipinas) integrados por las características estructurales de la pared celular que funcionan como defensas en los tejidos de las plantas (García-Montalvo, 2016). Entre estos se encuentra, además de la pared celular, la epidermis, fibras, resinas, corteza gruesa, fenoles, lignina, terpenoides, alcaloides, saponinas, glicósidos cianogénicos y otros metabolitos secundarios. Mientras que los mecanismos de defensa inducibles son respuestas activadas al percibir la presencia de un patógeno o alguno de sus productos. Entre los mecanismos inducibles están la respuesta de hipersensibilidad, que es una forma de muerte celular programada, la formación de nuevas estructuras morfológicas y compuestos con actividad biológica (fitoalexinas), así como también cambios en las estructuras o en la concentración de los

compuestos ya existentes, como la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) y la acumulación de proteínas relacionadas con la patogénesis (Anaya-Lang & Espinosa-García, 2006; Plasencia, 2016).

Los mecanismos de defensa de las plantas no son excluyentes, por lo que las plantas son capaces de utilizarlos en combinación para lograr sobrevivir a ataques por distintos patógenos, aunque puedan sufrir daños en menor o mayor medida. Además, las combinaciones de estrategias de defensa pueden variar dentro de la misma interacción planta-patógeno, esto puede depender de la edad de la planta, el tipo de órgano y tejido vegetal atacado, el estado nutricional e incluso de las condiciones ambientales (Agrios, 2005). Por consiguiente, es fundamental conocer estos mecanismos de defensa, ya que aportan mucho a estudios de interacciones planta-patógeno.

1.2.1. Mecanismos constitutivos

Estos mecanismos son defensas estructurales y químicas preexistentes que representan una primera línea de defensa de las plantas contra los patógenos en su superficie, evitando que el patógeno sea capaz de adherirse para posteriormente penetrar y causar una infección.

Las barreras estructurales que presentan las plantas incluyen a la pared celular que es una barrera dinámica y está compuesta principalmente por celulosa, ésta puede engrosarse por la deposición de microfibrillas en su cara interna y también puede expandirse. Otras barreras estructurales son la epidermis que está cubierta de una cutícula cerosa, así como también la estructura de las paredes celulares epidérmicas, el grosor, la ubicación y las formas de los estomas y las lenticelas. La cutícula cerosa evita el contacto directo del patógeno con las células y debido a su naturaleza hidrofóbica previene la pérdida de agua y su acumulación en la superficie, evitando la germinación de esporas, reduciendo la posibilidad de infección. También, la estructura de los estomas representa una barrera estructural, ya que al ser células de guarda anchas y elevadas dan lugar a una entrada muy estrecha y confieren resistencia frente a algunos patógenos (Agrios, 2005; Plasencia, 2016).

La importancia de la pared celular de las plantas radica en que ésta da forma y fuerza a las células, uniéndolas y dando rigidez a toda la planta, debido a que se compone principalmente de microfibrillas de celulosa incrustadas en una matriz de hemicelulosas, pectinas, proteínas y compuestos fenólicos. La composición de la pared celular de las plantas varía significativamente entre tejidos de una misma planta y de una especie a otra, así como entre variedades dentro de una misma especie (Santiago *et al.*, 2013). Por ejemplo, la pared celular de una especie de cereales típica contiene 25% de celulosa, 55%

de hemicelulosa (arabinoxilanos, xiloglucano y, en algunos tejidos, glucanos de enlaces mixtos) y solo 10% de pectina. Los xilanos de estos están sustituidos con cadenas laterales de arabinosa y ácido glucurónico, y se denominan arabinoxilanos (AX) y glucurono arabinoxilanos (GAX) respectivamente (Figura 1); y una proporción de las cadenas laterales de arabinosa se sustituyen además con residuos de ácido fenólico, en particular ácidos ferúlico, *p*-cumárico y 4-*O*-metilglucurónico. En la pared celular también pueden haber macromoléculas adicionales como la lignina, que están introducidas entre las microfibrillas de una pared primaria haciéndola más fuerte (Pollard *et al.*, 2008). Estas ligninas son heteropolímeros aromáticos complejos derivados principalmente de tres monómeros de alcohol hidroxicinámico que son los alcoholes *p*-cumarílico, coniferílico y sinapílico (Boerjan *et al.*, 2003).

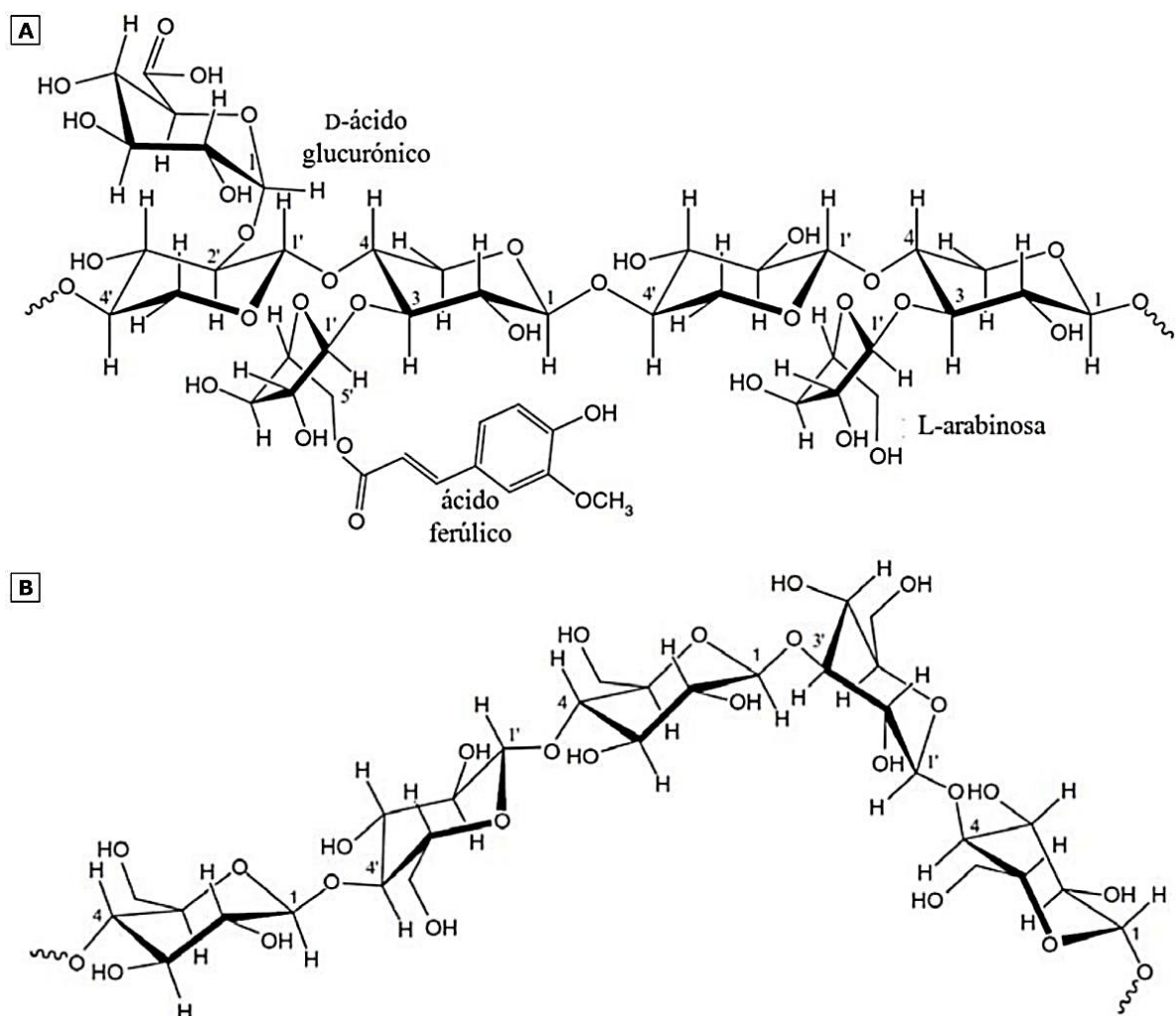


Figura 1. Estructura de las hemicelulosas. (A) Glucurono arabinoxilanos (GAX) principales polisacáridos hemicelulósicos del maíz, que consisten en una cadena de xilanos, con sustituciones de arabinosa, ácido glucurónico y ácido ferúlico; (B) β -glucanos con enlaces mixtos, integrados por unidades de celotriosa y celotetraosa unidas por enlaces $\beta(1-4)$ que se entrelazan por enlaces $\beta(1-3)$. Tomada de Barros-Ríos *et al.*, 2011.

Es destacable el papel de los arabinoxilanos en las gramíneas, ya que desempeñan una función estructural importante al unirse a las microfibrillas de celulosa y entrecruzarse oxidativamente entre sí y con ligninas mediante la actividad de peroxidasa o lacasa para formar una variedad de dímeros (cadenas de polisacáridos entrecruzadas con ligninas). Esta unión de los arabinoxilanos con las microfibrillas de celulosa se dan mediante compuestos fenólicos (Figura 2) (Santiago *et al.*, 2013).

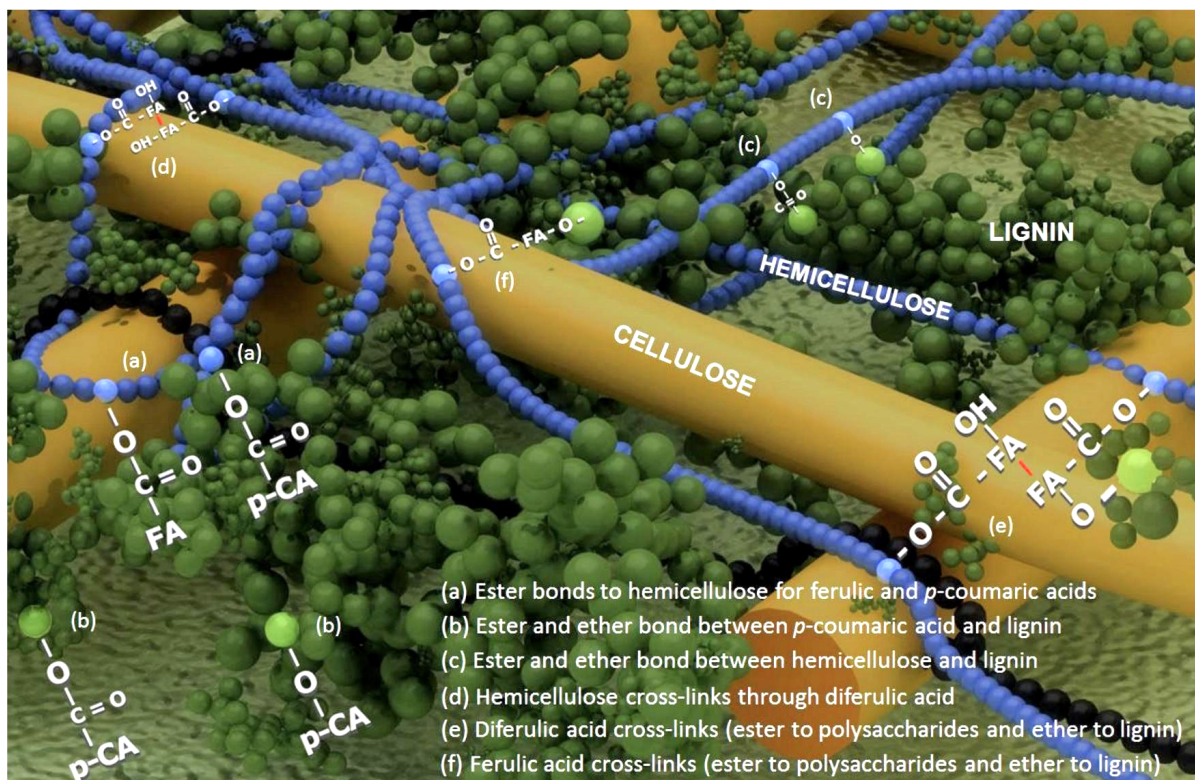


Figura 2. Representación de la estructura de la pared celular secundaria en maíz. Unión entre componentes de la pared celular, hemicelulosa y ligninas por esterificación de ácidos fenólicos, (a) enlaces éster entre hemicelulosa y ácido ferúlico, y entre hemicelulosa y ácido *p*-cumárico; (b) enlaces éster y éter entre ácido *p*-cumárico y lignina; (c) enlaces éster y éter entre hemicelulosa y lignina; (d) enlaces cruzados de hemicelulosa a través del ácido diferúlico; (e) enlaces cruzados del ácido diferúlico (éster con polisacáridos y éter con lignina); (f) enlaces cruzados del ácido ferúlico (éster con polisacáridos y éter con lignina). Tomada de Santiago *et al.*, 2013.

Además de este componente estructural, las plantas también cuentan con mecanismos químicos de defensa constitutivos conformados por una amplia gama de metabolitos secundarios de bajo peso molecular que tienen diversas actividades biológicas (Dixon, 2001). Estos compuestos naturales derivados de plantas, además de tener funciones

ecológicas amplias y de participar en el crecimiento y desarrollo de las plantas, tienen un papel relevante de defensa. Se sugiere incluso que algunos fitoquímicos pueden servir no solo como barreras químicas, sino también podrían tener funciones en los procesos de señalización relacionados con la defensa (Bednarek & Osbourn, 2009).

Los compuestos constitutivos de defensa de las plantas están presentes en las células vegetales antes de la infección, pero de igual manera pueden ser liberados en el entorno de la planta. Las fitoanticipinas están preformadas y almacenadas en las células vegetales, estas confieren protección a las plantas y se conoce que algunas (p. ej. compuestos fenólicos, taninos y algunos compuestos similares a los ácidos grasos) están presentes en altas concentraciones en las células de tejidos jóvenes de la planta, siendo responsables de la resistencia a microorganismos patógenos, pero a medida que los tejidos envejecen, su concentración va disminuyendo (Agrios, 2005). Las saponinas (compuestos esteroideos o triterpenoides glicosilados), así como los glicósidos cianogénicos, son fitoanticipinas caracterizadas, de las cuales las primeras mencionadas tienen características surfactantes y las segundas pueden producir ácido cianhídrico (HCN) en caso de daño tisular (Plasencia, 2016).

Las saponinas se producen como barreras químicas básicas, formando parte del ciclo normal del crecimiento y desarrollo de las plantas para mecanismos de defensa contra hongos e insectos patógenos. Estas muestran una actividad antifúngica eficaz, debido a que presentan caracteres anfífilos debido a la presencia de un aglicón triterpénico lipofílico (sapogenina) unido a cadenas de azúcar hidrofílicas (Figura 3A), que facilitan la actividad de unión de la saponina a la membrana fúngica. Aunque los mecanismos detallados del modo de acción antifúngico de las saponinas no están bien establecidos, se cree que la estructura aglicona-azúcar de las saponinas están interrelacionadas principalmente con su capacidad para unirse al componente de esteroides de la membrana celular de los hongos, para formar complejos, lo que provoca la pérdida de la membrana celular y la formación de poros y, en consecuencia, la pérdida de la integridad de la membrana (Abdelrahman & Jogaiah, 2020).

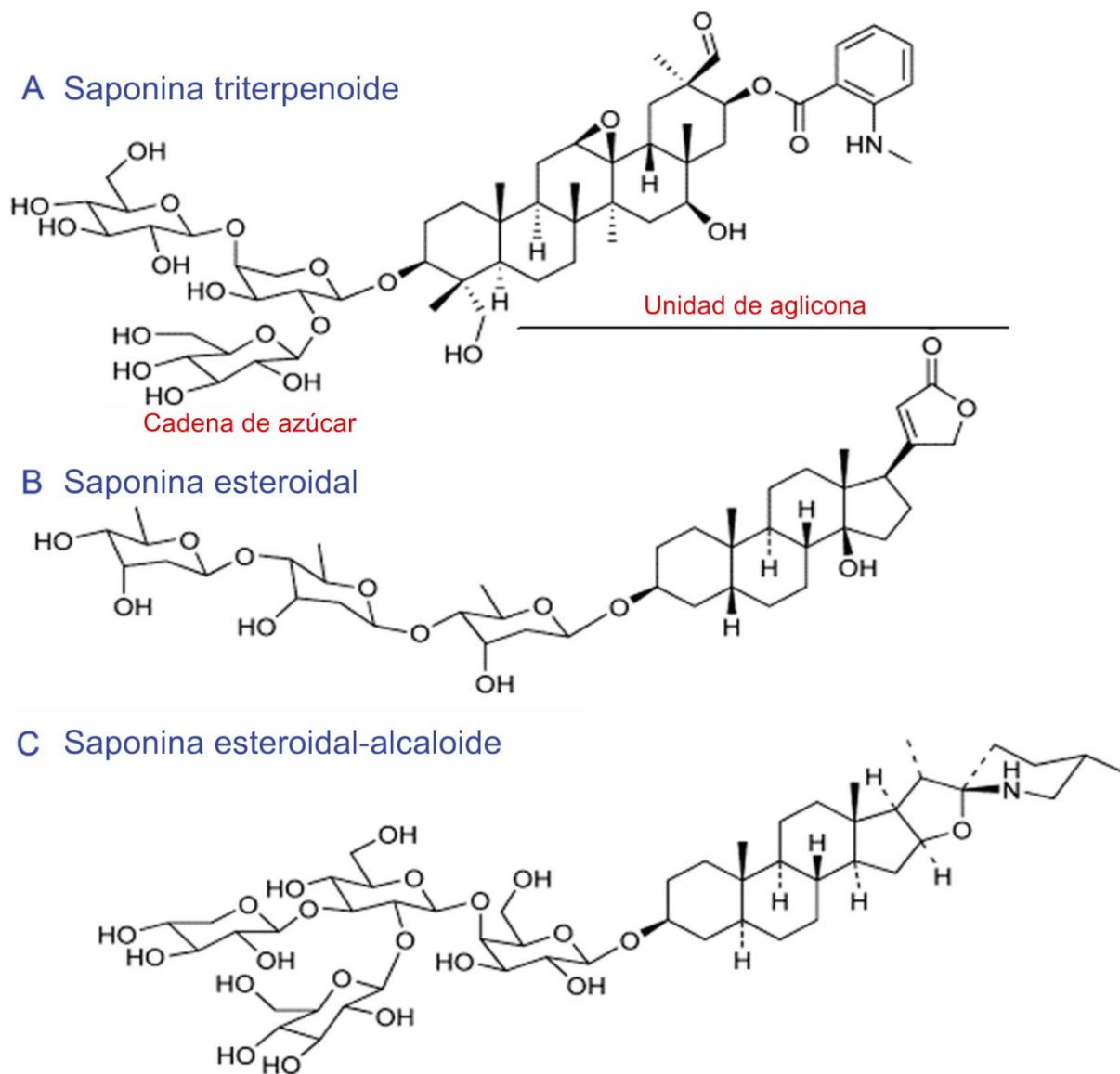


Figura 3. Clasificación de los compuestos saponínicos. (A) Triterpénicos; (B) esteroides y (C) esteroideo-alcaloideos, en función de la estructura de su unidad aglicona que representa el núcleo de la estructura (Abdelrahman & Jogaiah, 2020).

Además, varias proteínas vegetales preformadas pueden actuar como inhibidores de las proteasas de los patógenos o de las enzimas hidrolíticas implicadas en la degradación de la pared celular del huésped, para así inactivar ribosomas extraños o para aumentar la permeabilidad de las membranas plasmáticas de los hongos (p. ej. las fitocistatinas). Otro tipo de compuestos constitutivos son las lectinas, que son proteínas que se unen específicamente a determinados azúcares y provocan lisis e inhibición del crecimiento de muchos hongos. Por otro lado, las plantas también son capaces de exudar una variedad de sustancias a través de la superficie de sus partes aéreas, así como a través de la superficie

de sus raíces y algunos de los compuestos liberados también parecen tener una acción inhibidora contra determinados patógenos (Agrios, 2005).

1.2.2. Mecanismos inducibles

Además de los mecanismos de defensa constitutivos, están los mecanismos de defensa inducibles que se activan en presencia del patógeno y permiten una respuesta rápida y eficiente para prevenir la colonización y diseminación en el tejido. La eficacia de estos mecanismos depende de la detección temprana del microorganismo invasor a través de la percepción de Patrones Microbianos Asociados a Patógenos (PAMPs) y la activación de la respuesta de defensa en la planta. Este reconocimiento por receptores en la superficie de la célula vegetal enciende cascadas de señalización que derivan en la activación transcripcional de genes asociados a defensa (Plasencia, 2016).

Una consecuencia de la activación de los mecanismos de defensa es la respuesta de hipersensibilidad, que es una forma de muerte celular programada localizada en el sitio de infección que limita la colonización por patógenos biótropos. Asimismo, generan especies reactivas de oxígeno (ROS), que tienen actividad antimicrobiana y se expresan genes de proteínas relacionadas con la patogénesis, como se ha mencionado anteriormente. Muchas de estas últimas codifican enzimas con actividad hidrolítica, como quitinasas, glucanasas y proteasas, que actúan sobre la pared celular fúngica (Agrios, 2005; Plasencia, 2016).

Otro de los productos de la respuesta inducible de defensa son las fitoalexinas, que son compuestos de bajo peso molecular que tienen actividad antimicrobiana (Agrios, 2005). Estos metabolitos incluyen varios tipos diferentes de sustancias como terpenoides, alcaloides, flavonoides, entre otras y la clase depende del tipo de planta que las sintetiza (Chripkova *et al.*, 2016).

En el entorno natural de las plantas hay una gran variedad de hongos patógenos que durante la infección, producen algunos PAMPs que pueden ser reconocidos por receptores específicos para activar la inmunidad innata o basal de la planta, incluyendo PTI (inmunidad desencadenada por PAMP) y ETI (inmunidad desencadenada por efectores). La quitina, un polímero estructural de la pared celular fúngica formado por unidades de N-acetilglucosamina, constituye un PAMP fúngico conservado en plantas que puede ser reconocida por receptores específicos (p. ej. LysM). Las plantas no contienen quitina, pero contienen enzimas degradadoras de quitina, que pueden degradar la pared celular de los hongos, y los productos resultantes, oligosacáridos de quitina, que pueden actuar como elicitores para activar el sistema inmunitario de la planta, induciendo flujos de iones, aumento de la actividad quitinasa, síntesis de fitoalexinas, producción de ROS y expresión

de genes de defensa. Otras moléculas reconocida como PAMPs son los glucanos (α -glucano y β -glucano), que son los polisacáridos estructurales más abundantes en la pared celular de los hongos, de los cuales el fragmento de glucano obtenido de la hidrólisis tiene actividad de elicitor. El reconocimiento de este depende de su origen y de la especie de las plantas. Se conoce que el β -glucano podría aumentar la resistencia en las plantas como un PAMP promoviendo la acumulación de fitoalexinas y mejorando su actividad contra la infección por patógenos, observando respuestas inmunes como la producción de ROS, la activación de MAPKs y la expresión de genes de defensa (Guo & Cheng, 2022). El ergosterol, que es el esteroide predominante en las membranas celulares de los hongos, también es un PAMP de interés debido a que es un elicitor lipofílico, aunque se desconoce el mecanismo de reconocimiento por parte de células vegetales. El ergosterol contiene dos dobles enlaces adicionales (en las posiciones C7-C8 y C22-C23) y un grupo metilo en C24 de la cadena lateral, en comparación con el colesterol, que le permite a la célula vegetal reconocerlo como no propio debido a esta diferencia estructural (Klemptner, *et al.*, 2014).

En el maíz, las fitoalexinas están representadas por terpenoides, que incluyen zealexinas y kauralexinas y benzoxazinoides (Figura 4). Aunque los benzoxazinoides han sido descritas como fitoanticipinas la síntesis de algunas de ellas, como el DIMBOA se induce tras la infección por patógenos (Poloni & Schirawski, 2014).

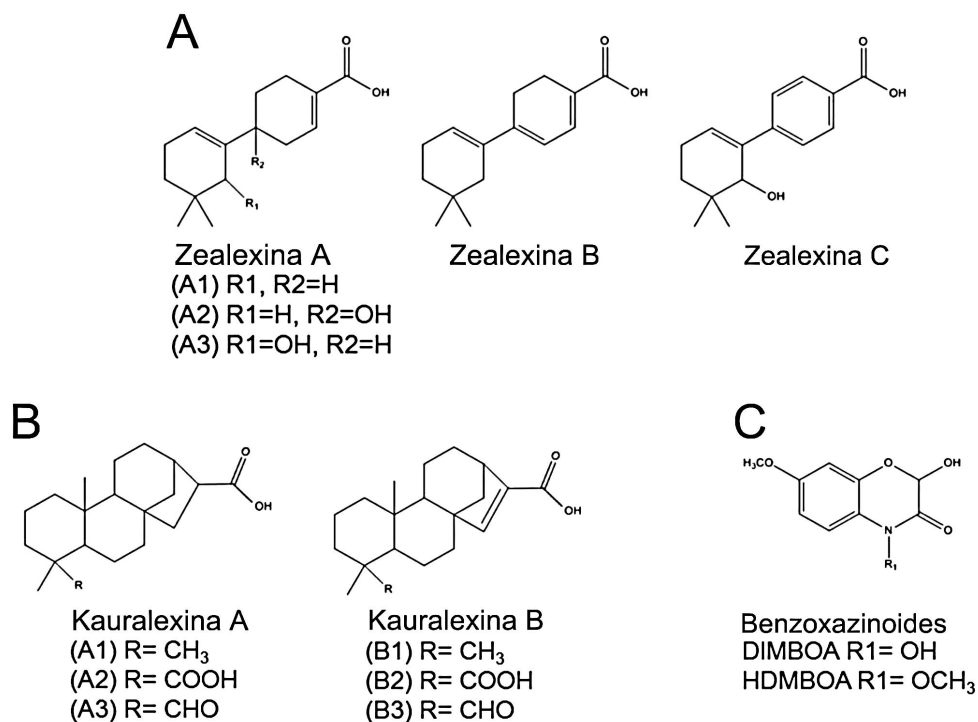


Figura 4. Fitoalexinas producidas por el maíz. (A) Zealexinas; (B) Kauralexinas; (C) Benzoxazinoides. Adaptada de Poloni & Schirawki, 2014.

2. Benzoxazolinonas

2.1. Características generales

Para los cereales, la interacción con especies endofíticas de *Fusarium* spp., como ya se mencionó anteriormente, es relevante debido a que causa pérdida de rendimiento y contaminación con toxinas fúngicas, por esto los benzoxazinoides se describieron por primera vez como factores anti-*Fusarium* en plántulas de centeno (benzoxazolinonas y benzoxazinonas) (Niculaes, *et al.*, 2018).

El maíz tiene la capacidad de producir estos compuestos constitutivos, que son sustancias biológicamente activas con propiedades repelentes de insectos o tóxicos, incluso para otros patógenos. Estos ácidos orgánicos fueron de los primeros aleloquímicos encontrados para mediar la antibiosis a los insectos en variedades de maíz (Franeta *et al.*, 2019).

Los benzoxazinoides (derivados de la 1,4-benzoxazina-3(4H)-ona, BXs) son fitoanticipinas ampliamente distribuidas entre la familia *Poaceae* y tienen propiedades antifúngicas, antibacterianas e insecticidas. Estos fitoquímicos derivados del indol, son metabolitos secundarios de las plantas y por lo tanto no son esenciales para el crecimiento, el desarrollo y la reproducción de las plantas, pero facilitan esos procesos, principalmente a través de la señalización y la regulación del metabolismo primario; así como también proporcionan defensas contra plagas y patógenos (Richter *et al.*, 2021; Zhou *et al.*, 2018; Ahmad *et al.*, 2011).

Los benzoxazinoides son de los metabolitos especializados de las plantas más relevantes en la agricultura y están presentes en mayores concentraciones en plantas de gramíneas jóvenes, ya que se sintetizan al inicio de la germinación de la semilla. Los benzoxazinoides pueden representar el 1% o más del peso seco en raíces jóvenes constitutivamente, aunque como se mencionó previamente su acumulación puede ser inducida localmente por ataques de plagas o patógenos. En plantas como el maíz, los benzoxazinoides pueden llegar a representar del 0.1 al 0.3% del peso fresco en algunos tejidos, particularmente en plántulas jóvenes, ya que la concentración va disminuyendo con el tiempo (Zhou *et al.*, 2018).

DIMBOA y DIBOA son los principales benzoxazinoides en maíz, se sintetizan durante la germinación y se acumulan en los tejidos y en las plántulas en crecimiento. Estos compuestos se almacenan en la vacuola como glucósidos sin actividad biológica pero en caso de daño celular, los glucósidos de DIMBOA y DIBOA, son liberados por acción de una β -glucosidasa presente en los plastidios, que da a lugar a una hidrólisis enzimática de la que se producen los metabolitos libres (DIMBOA y DIBOA), que son inestables bajo

condiciones fisiológicas acuosas por lo que son transformadas de manera espontánea en las agluconas que son estables y biológicamente activas, las benzoxazolinonas, BOA y MBOA (Figura 5) (Glenn & Bacon, 2009; Niemeyer, 2009; Saunders & Kohn, 2008).

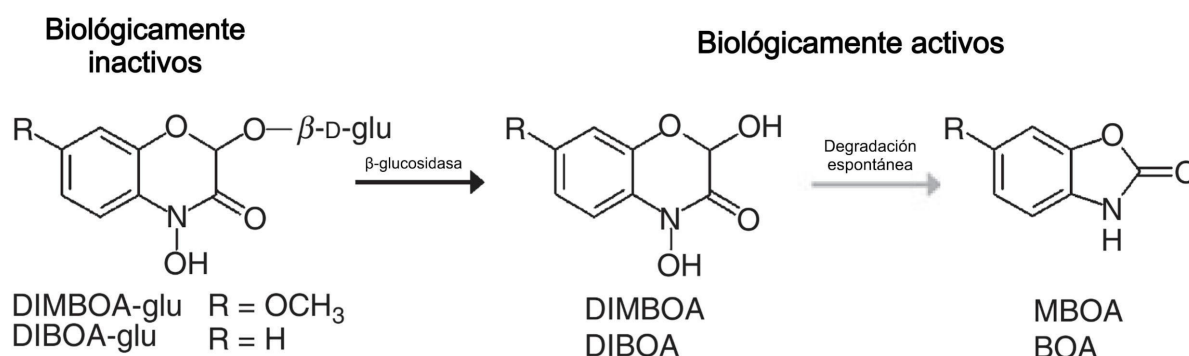
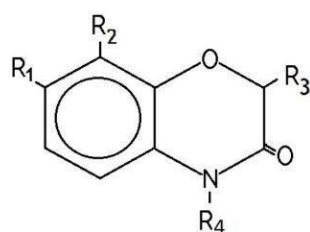


Figura 5. Vía de producción de benzoxazolinonas. Las benzoxazolinonas se sintetizan como glucósidos, que tras daño celular son liberadas por una β -glucosidasa, estos benzoxazolinoides son inestables y se convierten en benzoxazolinonas de manera espontánea. Adaptada de Glenn & Bacon, 2009.

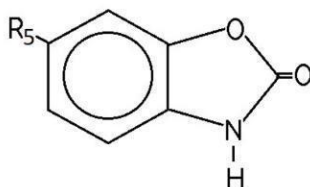
2.2. Estructura

Los benzoxazolinoides son una familia de compuestos que comparten un esqueleto de 2-hidroxi-2H-1,4-benzoxazolinoides-3(4H)-ona (HBOA). Estos se clasifican químicamente en tres grupos: ácidos hidroxámicos ($R_4 = OH$); lactamas denominadas colectivamente como benzoxazolinonas ($R_4 = H$), que existen tanto como glucósidos (biológicamente inactivos) y como agluconas (biológicamente activas); y en benzoxazolinonas (Figura 6) (Pedersen *et al.* 2017; Wouters *et al.*, 2016).

En comparación con los ácidos hidroxámicos, las lactamas carecen del grupo hidroxilo en la posición C-4, mientras que las benzoxazolinonas se caracterizan por tener una amida cíclica de 5 átomos (Mikić & Ahmad, 2018). También se puede mencionar otra clasificación de acuerdo a su grupo sustituyente, que son los derivados de N-O-metilados ($R_4 = OCH_3$) (Figura 6). Los sustituyentes, así como también los grupos funcionales son los responsables de modular la estabilidad, reactividad y actividad biológica de estos compuestos (Wouters *et al.*, 2016).



R1	R2	R3	R4	Abreviatura	Nombre	Clase
-OCH3	-H	-OH	-OH	DIMBOA	2,4-dihidroxi-7-metoxi-1,4-benzoxazin-3-ona	Ácidos hidroxámicos
-OCH3	-OCH3	-OH	-OH	DIM2BOA	2,4-dihidroxi-7,8-dimetoxi-1,4-benzoxazin-3-ona	
-H	-H	-OH	-OH	DIBOA	2,4-dihidroxi-1,4-benzoxazin-3-ona	
-OH	-H	-OH	-OH	TRIBOA	2,4,7-trihidroxi-1,4-benzoxazin-3-ona	
-OH	-OCH3	-OH	-OH	TRIMBOA	2,4,7-trihidroxi-8-metoxi-1,4-benzoxazin-3-ona	
-OCH3	-H	-OH	-H	HMBOA	2-hidroxi-7-metoxi-1,4-benzoxazin-3-ona	Lactamas
-OCH3	-OCH3	-OH	-H	HM2BOA	2-hidroxi-7,8-dimetoxi-1,4-benzoxazin-3-ona	
-H	-H	-OH	-H	HBOA	2-hidroxi-1,4-benzoxazin-3-ona	
-OH	-H	-OH	-H	DHBOA	2,7-dihidroxi-1,4-benzoxazin-3-ona	
-OCH3	-OCH3	-OH	-OCH3	HDM2BOA	2-hidroxi-4,7,8-trimetoxi-1,4-benzoxazin-3-ona	Derivados N-O-metilados
-OCH3	-H	-OH	-OCH3	HDMBOA	2-hidroxi-4,7-dimetoxi-1,4-benzoxazin-3-ona	



R5	Abreviatura	Nombre	Clase
-OCH3	MBOA	6-metoxibenzoxazolin-2-ona	Benzoxazolinonas
-H	BOA	2-benzoxazolin-2(3H)-ona	

Figura 6. Derivados de benzoxazinoides y su estructura química. Adaptada de Mikić & Ahmad, 2018.

2.3. Biosíntesis

Se han mapeado dieciséis genes responsables de la biosíntesis de los benzoxazinoides en el maíz, de los cuales 14 son denominados *BENZOXAZINELESS(1-14)* o *Bx (1-14)*, que codifican las enzimas (BX1-BX14) que están involucradas en esta síntesis. Estos genes están distribuidos en los cromosomas 1, 2 y 4 de maíz (Figura 7); mientras que los otros dos restantes, son genes *Glu(1-2)*, que codifican glucosidasas que actúan sobre el glucósido para liberar la aglucona (Mikić & Ahmad, 2018).

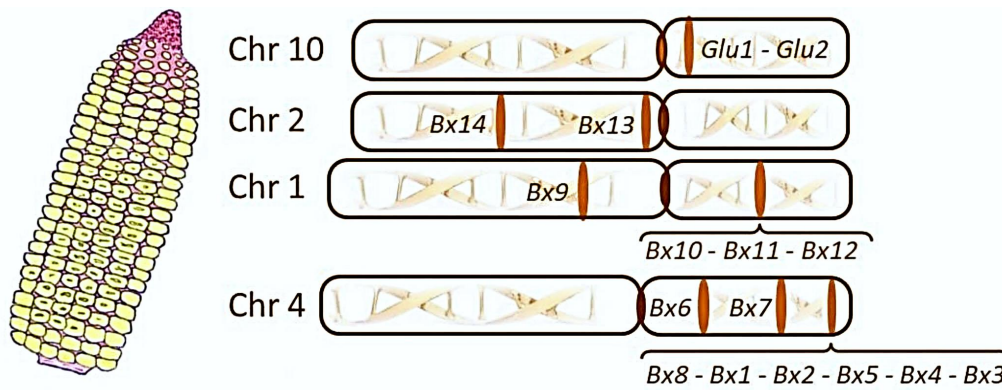


Figura 7. Genes involucrados en la biosíntesis de benzoxazinoides en maíz. Tomada de Mikić & Ahmad, 2018.

La vía biosintética de las benzoxazinonas se estudió y dilucidó por primera vez en el maíz. La biosíntesis comienza a partir del indol-3-glicerolfosfato (IGP), que se convierte en HBOA, el primer benzoxazinoide. El primer paso, catalizado por BX1, una enzima cloroplástica con actividad de indol glicerol fosfato liasa, produce indol. Este indol libre se convierte en DIBOA por la acción de cuatro monooxigenasas (BX2, BX3, BX4 y BX5) que catalizan oxidaciones dependientes del citocromo P450 de la subfamilia CYP71C; estas cuatro enzimas se localizan en el retículo endoplásmico, son sustrato-específicas y regio-selectivas para la introducción secuencial de átomos de oxígeno. La aglucona de DIBOA producida, es reactiva por lo que en el citoplasma se da una glucosilación para dar a lugar a un intermediario más estable por acción de BX8 y BX9 que son UDP-glucosiltransferasas, y tanto BX8 como BX9 de maíz son capaces de glicosilar HBOA. A continuación, una hidroxilación conduce a DIBOA-Glc a ser el punto de partida para la biosíntesis de los ácidos hidroxámicos, esta hidroxilación se da por una dioxigenasa dependiente de 2-oxoglutarato (BX6), que posteriormente es O-metilada por la O-metiltransferasa (BX7), formando DIMBOA-Glc, que puede transformarse en HDMBOA-Glc mediante una O-metilación catalizada por tres O-metiltransferasas homólogas (BX10, BX11 y BX12). Incluso se ha descrito una rama adicional en la vía, donde el gen *Bx13*, codifica para una dioxigenasa dependiente de 2-oxoglutarato, la BX13 que cataliza la conversión de DIMBOA-Glc en TRIMBOA-Glc que puede ser O-metilado por BX7 para formar DIM2BOA-Glc. DIMBOA-Glc y DIM2BOA-Glc pueden ser metilados nuevamente por otra O-metiltransferasa (BX14) para generar HDBOA-Glc y HDM2BOA-Glc respectivamente (Figura 8) (De Bruijn *et al.*, 2018; Wouters *et al.*, 2016; Dutartre *et al.*, 2012).

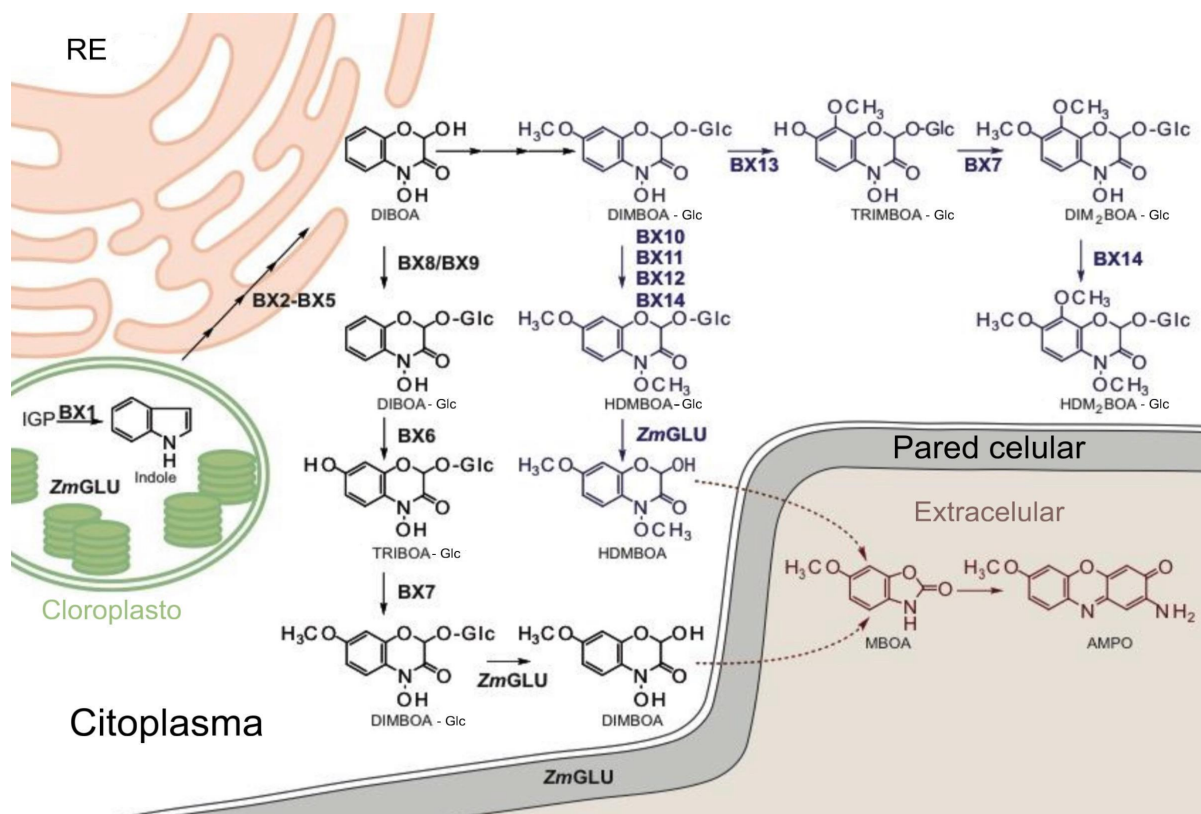


Figura 8. Biosíntesis de benzoxazinoides en maíz. Los compuestos y enzimas de la vía principal se representan en negro, los compuestos resultantes y las enzimas inducibles están marcados en color en azul, y los compuestos resultado de la transformación enzimática inducida por microbios y la transformación espontánea en solución acuosa están representadas en color rojo. Adaptada de Niculaes, *et al.*, 2018.

Los glucósidos de las benzoxazinonas, que son estables, se transportan y almacenan en vacuolas, que tras daño celular o cuando se exudan de las raíces, entran en contacto con β -glucosidasas que están codificadas en dos genes, *Glu1* y *Glu2*. Estas β -glucosidasas están presentes en el citoplasma, la pared celular y en maíz principalmente en los plástidos. Esto conduce a la liberación de las agluconas de las benzoxazinonas, que son menos estables y más reactivas en condiciones fisiológicas acuosas (Wouters *et al.*, 2016). Los mecanismos sugeridos para la reactividad de las agluconas de las benzoxazinonas, que viene determinada principalmente por su sustituyente N (R1), que actúa como grupo saliente, incluyen complejación por metales y también tautomerismo del heterociclo nitrogenado. Esta última da a lugar a la configuración de anillo abierto, que es un intermediario que tiene reactividad de α -dicarbonil, que podría permitir reacciones subsiguientes que transformen de manera espontánea a sus benzoxazolinonas correspondientes. También se han propuesto varios pasos para esta transformación y en todos se implica un paso de desprotonación que conduce a la pérdida del sustituyente (R1), donde los derivados

metoxilados (N-metoxi) son más reactivos que los ácidos hidroxámicos (N-hidroxi), mientras que las lactamas (N-hidro) prácticamente no reaccionan (De Bruijn *et al.*, 2018).

2.4. Actividad biológica

Las propiedades tóxicas de los benzoxazinoides se han confirmado en muchos estudios a pesar de que los mecanismos de acción molecular y fisiológicos responsables no se comprenden por completo. Pero se ha demostrado que el DIBOA y su derivado metoxilado, el DIMBOA, que se encuentra en mayor proporción en el maíz, son los benzoxazinoides más eficaces contra insectos, hongos, bacterias, nemátodos y malezas, al igual que sus productos de descomposición BOA y MBOA pero estos presentan menor toxicidad (Mikić & Ahmad, 2018).

2.4.1. Fitosideróforos

Los benzoxazinoides también pueden actuar como fuertes agentes quelantes, denominados fitosideróforos, que son compuestos quelantes de plantas que tienen una gran afinidad para unir micronutrientes, como el hierro, el zinc, el cobre y el manganeso (Dakora & Phillips, 2002). Los benzoxazinoides se unen al Fe^{3+} , aumentando la disponibilidad de este micronutriente para las plantas y mitigando así la deficiencia de hierro (Bais *et al.*, 2006).

2.4.2. Alelopatía

La actividad alelopática de los benzoxazinoides se ha documentado en plantas de centeno, que suprimen el crecimiento. Se han estudiado las actividades diferenciales del BOA y DIBOA utilizando varias especies vegetales y de malezas, donde el DIBOA mostró mayor toxicidad al inhibir más el crecimiento de las raíces y el crecimiento de los brotes que el BOA (Figura 9). También se ha observado que DIBOA y BOA tienen potencial para el control de malezas de semillas pequeñas a medianas (Burgos & Talbert, 2000).

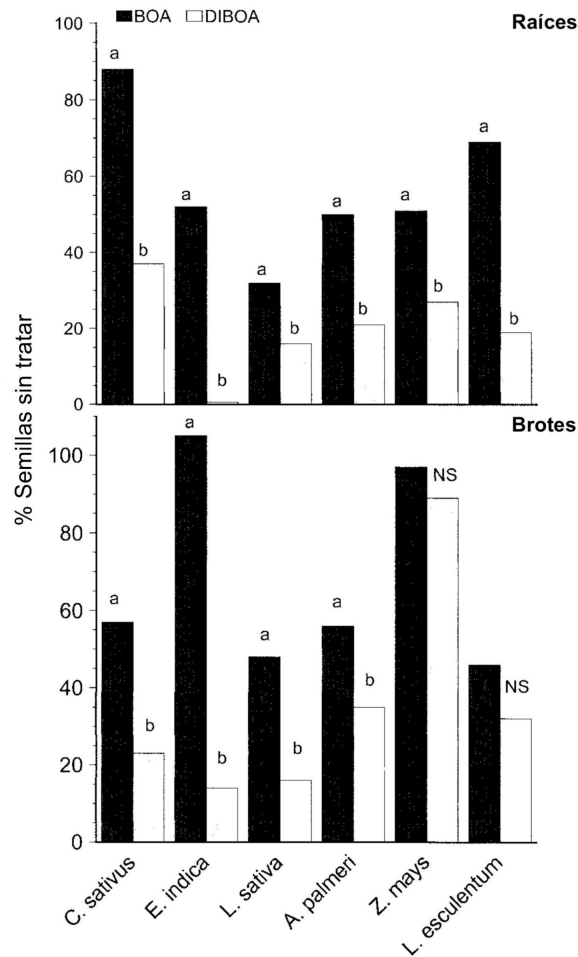


Figura 9. Comparación de los efectos alelopáticos de BOA y DIBOA. Resultados en la elongación de brotes y raíces de plántulas de 3 días de edad en bioensayos en placas de cultivo cuando se aplican 0.1 mg/mL de BOA y DIBOA en agua desionizada a *Cucumis sativus*, *Zea mays*, *Lactuca sativa*, *Lycopersicon esculentum*, *Eleusine indica* y *Amaranthus palmeri*, donde se observa que el DIBOA fue unas siete veces más inhibidor del crecimiento de las raíces y cuatro veces más inhibidor del crecimiento de los brotes que el BOA. Los valores son las medias de dos series del experimento. Las medias se compararon mediante LSD $\alpha=0,05$. Adaptada de Burgos & Talbert, 2000.

Los mecanismos fisiológicos son difíciles de dilucidar porque se trata del suelo, pero se sabe que tras la liberación del glucósido de DIBOA por la planta en el medio, este se hidroliza a la aglucona DIBOA y a varios metabolitos incluyendo la lactama HBOA, la benzoxazolinona BOA y la aminofenoxazina APO. El grado de toxicidad de estos compuestos varía en el siguiente orden: APO > DIBOA/DIMBOA > BOA/MBOA > HBOA/HMBOA (Teasdale *et al.*, 2012).

2.4.3. Insecticida

Tanto el DIMBOA como el DIBOA disminuyen la actividad de endoproteasas en el sistema digestivo de las larvas de los insectos, como *Ostrinia nubilalis*, barrenador europeo del maíz, limitando la disponibilidad de aminoácidos y reduciendo el crecimiento y peso de las larvas, llevándolas a la inanición. Además de esta actividad anti-alimentaria, afecta otras enzimas como la glutatión-S-transferasa en los áfidos (*Rhopalosiphum padi*), lo que les impide metabolizar los insecticidas, haciéndolos más susceptibles a estos plaguicidas (Houseman *et al.*, 1992; Mikić & Ahmad, 2018; Wouters *et al.*, 2016).

2.4.4. Antibacteriano

El potencial antibacteriano de los benzoxazinoides ha sido demostrado por la benzoxazolinona del maíz MBOA, que inhibe el crecimiento de la bacteria Gram negativa *Xanthomonas stewartii* (*Pantoea stewartii*), el agente causal de la marchitez de Stewart (Whitney y Mortimore, 1961). Asimismo, el DIMBOA, le confiere resistencia al maíz inhibiendo el crecimiento de *Erwinia spp.* prolongando su fase de latencia (Corcuera *et al.*, 1978). Aunque se ha visto que cepas de *Erwinia chrysanthemi* que son patógenas para el maíz, muestran resistencia al DIMBOA, probablemente porque se está ejerciendo una presión selectiva (Lacy *et al.*, 1979).

También se ha mostrado que las benzoxazinonas y benzoxazolinonas inhiben el crecimiento de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* (Bravo *et al.*, 1997), aunque para estas bacterias se requieren concentraciones relativamente altas de los compuestos, comparadas con otros productos naturales (Tabla 2) (Gleńsk *et al.*, 2016).

Tabla 2. Actividad antibacteriana de algunas benzoxazinonas y benzoxazolinonas.

Abreviación	Clase	Actividad antibacteriana, CMI (µg/mL)	
		<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
DIMBOA	Benzoxazinona	250-500	666
DIBOA	Benzoxazinona	500	1250
MBOA	Benzoxazolinona	>1000	>1000
BOA	Benzoxazolinona	>1000	>1000

CMI = Concentración Mínima Inhibitoria. *Nota.* Adaptada de De Bruijn, *et al.*, 2018.

2.4.5. Antifúngico

La actividad antifúngica de los benzoxazinoides se ha estudiado más ampliamente y se le confieren en el maíz resistencia a varios hongos patógenos, aunque el modo de acción molecular no se conoce. Se ha visto que MBOA y DIMBOA son los más eficaces contra los hongos, mientras que los glucósidos tienen una actividad muy limitada (De Bruijn *et al.*, 2018).

Tabla 3. Actividad antifúngica de algunas benzoxazinonas y benzoxazolinonas observadas a distintas concentraciones.

Especie	BXs	Efecto	Concentración	Ref.
<i>Setosphaeria turcica</i>	DIMBOA	Inhibición del crecimiento de las hifas de manera dosis-dependiente.	250-750 µg/mL (~1200-3500 µM)	Rostás, 2007.
<i>Fusarium graminearum</i>		Disminuye la producción de micotoxinas.	250 µM	Etzerodt, <i>et al.</i> , 2015.
<i>Bipolaris maydis</i>		MBOA	Inhibición del crecimiento micelial.	20 µg/mL (~100 µM)
	40 µg/mL (~270 µM)			
<i>Curvularia lunata</i>	MBOA	Inhibición de la germinación de conidias y del crecimiento de tubos de germinación.	10 mM (~10000 µM)	Oikawa, <i>et al.</i> , 2004.
<i>Alternaria alternata</i>				

Para *Bipolaris maydis*, *Curvularia lunata* y *Alternaria alternata* se ha visto que MBOA influyen significativa y negativamente en la germinación de las conidias (Oikawa, *et al.*, 2004). Para *S. turcica*, se encontraron fuertes efectos perjudiciales de DIMBOA extracelular en el crecimiento micelial del patógeno que es el agente causal del tizón de la hoja de maíz del norte, así como también que podía inducir la formación de calosa y la expresión del gen Bx, reduciendo el porcentaje de esporas y la longitud de las hifas (Rostás, 2007). Asimismo, cuando se induce la síntesis *in vivo* por tratamiento de las raíces de maíz con elicitores de *P. capsici* y exudados de raíz de pimiento, se observa un efecto protector

contra el hongo patógeno *Bipolaris maydis* (Tabla 3) (Ding *et al.*, 2015). Se ha visto un potencial antifúngico más significativo contra *Fusarium graminearum* donde se ha demostrado que DIMBOA es capaz de abolir la biosíntesis de micotoxinas (tricotecenos) mediante la supresión de genes involucrados en su vía biosintética (Tabla 3) (Etzerodt, *et al.*, 2015).

En contraste a *F. graminearum*, *F. verticillioides*, puede tolerar concentraciones de benzoxazolinonas que inhiben el crecimiento de otros hongos. La mayoría de las cepas de *F. verticillioides* contienen dos loci genéticamente funcionales (*FDB1* y *FDB2*) que incluyen genes que codifican dos enzimas que catalizan la biotransformación de las benzoxazolinonas en compuestos no tóxicos, y que se describirá con detalle más adelante (Glenn & Bacon, 2009).

En otros estudios se examinó la actividad antifúngica in vitro de las benzoxazolinonas (BOA y MBOA) así como también la de algunos de sus productos de degradación (2-amino-3*H*-fenoxazin-3-ona (APO), 2-acetilamino-3*H*-fenoxazin-3-ona (AAPO) y *o*-aminofenol (*o*-AP)), y mostraron que BOA y MBOA redujeron el crecimiento micelial de *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, *Cephalosporium gramineum*, y *Fusarium culmorum* en un 50% a diferentes concentraciones. Mientras que APO, AAPO y *o*-AP mostraron mayor inhibición del crecimiento de *C. gramineum* y *G. graminis* var. *tritici* en comparación con las benzoxazolinonas, sin embargo, no afectaron significativamente al crecimiento micelial de *F. culmorum* (Tabla 4) (Martyniuk *et al.*, 2006).

Tabla 4. Actividad antifúngica de las benzoxazolinonas y algunos de sus productos de degradación.

Especie	EC ₅₀ (µg/mL)				
	BOA	MBOA	APO	AAPO	<i>o</i> -AP
<i>Cephalosporium gramineum</i>	189	134	0.58	4.57	1.4
<i>Gaeumannomyces graminis</i> var. <i>tritici</i>	111	77	0.78	2.18	0.80
<i>Fusarium culmorum</i>	456	271	-	-	-

CE₅₀ = Concentración efectiva media. Nota. Adaptada de Martyniuk, *et al.*, 2006.

Otra benzoxazolinona, denominada zeaoxazolinona, que es un dímero de la 7-metoxi-2-benzoxazolinona aislada del maíz, ha exhibido una potencial actividad antifúngica contra *Aspergillus flavus*, *Fusarium oxysporum* y *Candida albicans* (Mohamed *et al.*, 2014).

3. *Fusarium verticillioides*

3.1. Taxonomía y características generales

Fusarium spp. es un género de hongos filamentosos y septados, que crecen en una variedad de sustratos, que incluyen plantas así como también sus raíces, alimentos y suelos. Este hongo se desarrolla a partir de macroconidias, que son las esporas asexuales características de este género, y que germinan para formar un micelio haploide en la planta y colonizar el tejido vegetal mediante fases de crecimiento biotrófico y necrótrofo (Kant *et al.*, 2011; Pitt, 2014).

Este género comprende varias especies que son patógenos en cultivos de plantas mono- y dicotiledóneas teniendo efectos devastadores en el rendimiento y la calidad (Curtis, 2020). *Fusarium spp.* pertenece al *phylum* Ascomycota y a la subdivisión Deuteromycota, su taxonomía es muy compleja y se han adoptado los conceptos de especies morfológicas (tipos de colonia y descripción de conidias), especies biológicas (cruzas entre cepas durante el estadio sexual) y especies filogenéticas (secuencia de DNA de regiones de ciertos genes como del factor de elongación de la traducción 1 α ; EF-1 α) (Leslie y Summerell, 2013).

El genoma de *Fusarium verticillioides* es de aproximadamente 42 Mbp distribuidos en 11 cromosomas, y con unos 14,179 genes anotados; además algunas cepas contienen un cromosoma supernumerario, que no contribuye a algún fenotipo particular (Blacutt *et al.*, 2018). *F. verticillioides* (anteriormente *F. moniliforme*; teleomorfo *G. fujikuroi*) es un patógeno importante para los cereales, como el trigo, el arroz, el sorgo y el maíz. Este hongo es miembro del complejo de especies *F. fujikuroi* (FFSC), que comprende un grupo de 40 especies de *Fusarium spp.* que están estrechamente relacionadas entre sí y definidas por rasgos morfológicos, compatibilidad sexual y análisis filogenéticos basados en ADN (Blacutt *et al.*, 2018; Beccari *et al.*, 2020).

F. verticillioides crece como endófito asintomático en los tejidos vegetativos y reproductivos del maíz, sin embargo, en condiciones climáticas favorables para el hongo (alta humedad y temperatura), o como resultado del estrés generado por el ataque de insectos u otros hongos, *F. verticillioides* puede convertirse en patógeno del maíz y causar enfermedades como lo son el tizón de las plántulas, la pudrición del tallo o la pudrición de la mazorca. *F. verticillioides* ha sido reportado en todo el mundo pero particularmente en las regiones

climáticas templadas, semitropicales y tropicales (Beccari *et al.*, 2020), y se conoce pero es menos común en las zonas más frías. Este hongo causa tanto la podredumbre del tallo como la de la mazorca, y aparece en todas las etapas del desarrollo de la planta, por lo que puede considerarse como el principal patógeno del maíz (Pitt, 2014).

F. verticillioides, además de reducir la calidad y el rendimiento de los cultivos también produce micotoxinas, principalmente fumonisinas, cuyo consumo causa distintas enfermedades en animales y se ha asociado a la mayor incidencia de cáncer esofágico en humanos (Kant *et al.*, 2011; Vandicke *et al.*, 2019). Las fumonisinas pueden dividirse en cuatro grupos principales, de las cuales las fumonisinas del grupo B son las más abundantes en la naturaleza, que incluyen a la fumonisina B1 (FB1), fumonisina B2 (FB2) y fumonisina B3 (FB3), que tienen un esqueleto de 20 carbonos, con un amino en el C-2 y residuos de ácidos tricarbóxicos esterificados en C-14 y C-15, y se diferencian por la ausencia o presencia de un grupo hidroxilo en los C-5 y C-10 (Figura 10) (De la Torre-Hernández *et al.*, 2014). Esta molécula es estructuralmente similar a la base esfingoidea de los esfingolípidos complejos que son importantes constituyentes de las membranas (Pitt, 2014). Entre los análogos del grupo B, la FB1 es la fumonisina predominante, con una fórmula molecular de $C_{34}H_{59}NO_{15}$, y es la de mayor incidencia en el maíz, así como la más activa desde el punto de vista toxicológico (Beccari *et al.*, 2020).

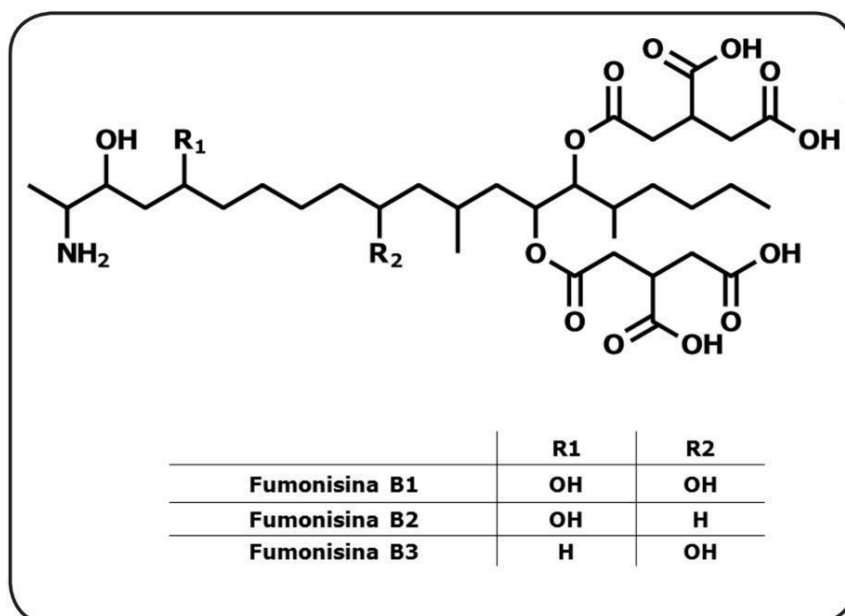


Figura 10. Estructura general de las fumonisinas del grupo B. Tomada de De la Torre-Hernández, *et al.*, 2014.

Se conoce que el maíz, así como también alimentos basados en maíz, se pueden encontrar contaminados por micotoxinas producidas por una variedad de hongos mohosos en todo el

mundo, y como se mencionó con anterioridad, estos metabolitos secundarios pueden tener varios efectos tóxicos, tanto agudos como crónicos, en los seres humanos así como también en animales cuando se ingieren (Blacutt *et al.*, 2018; Vandicke *et al.*, 2019). Por consiguiente *Fusarium verticillioides* cuenta con capacidad micotoxigénica y da lugar a la introducción de metabolitos nocivos en la cadena alimentaria (Stępień, 2020).

3.2. Morfología

F. verticillioides tiene una fase anamórfica en la que el micelio crecen en los residuos de los cultivos en condiciones cálidas y húmedas, y en la cual hay reproducción asexual donde abunda la producción de microconidias, que son células ovaladas, aplanadas, agrupadas en cadenas (De la Torre-Hernández *et al.*, 2014) y cortas, con una longitud de 7-10 μm de longitud (Figura 11) (Pitt, 2014). Esta especie es capaz de sobrevivir en los residuos de los cultivos, pero este no produce clamidoesporas, sino que produce hifas engrosadas que prolongan su supervivencia (Kant *et al.*, 2011).

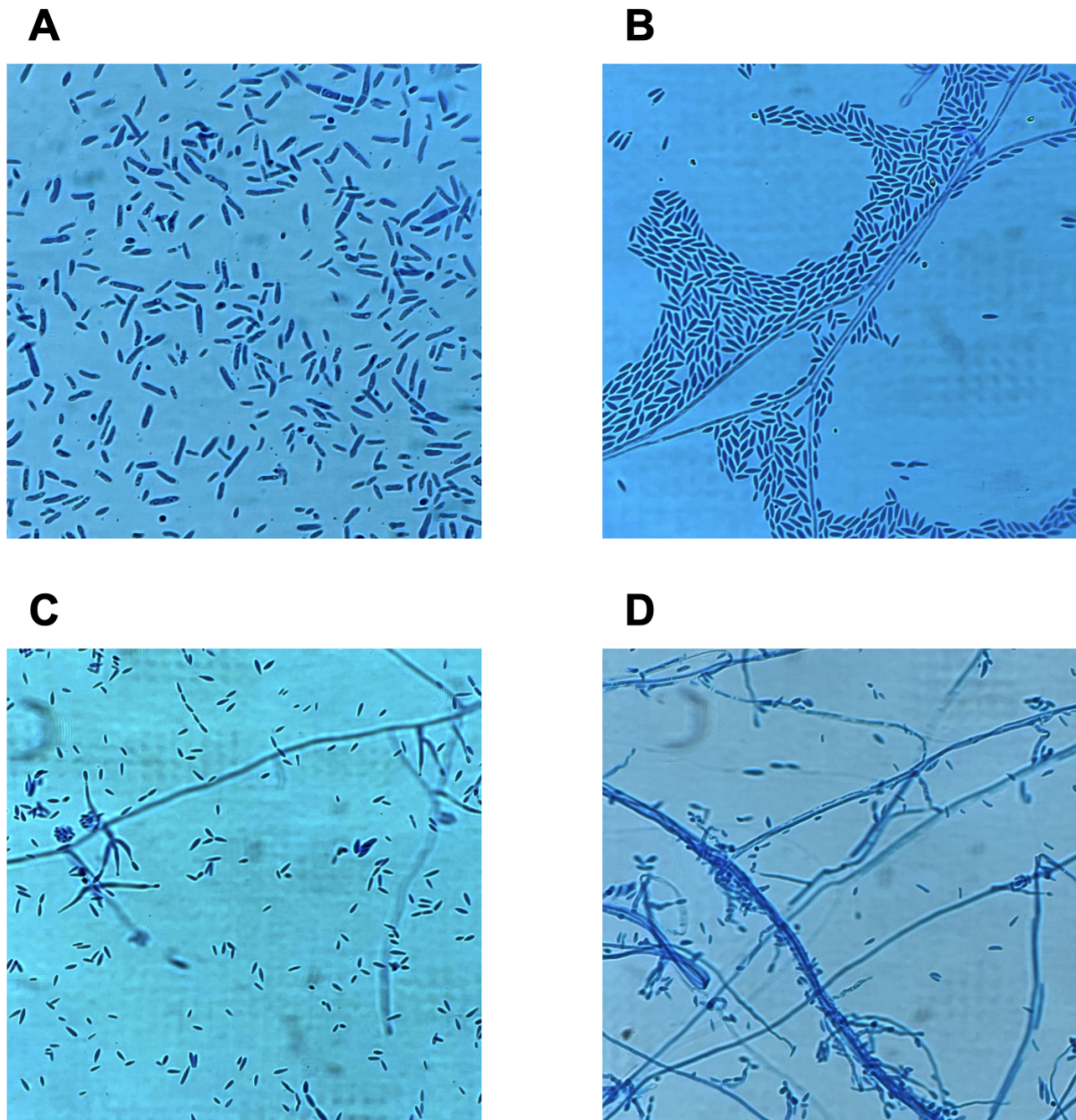


Figura 11. Aspecto microscópico de *Fusarium verticillioides*. Se presentan fotografías de microconidias teñidas con azul de lactofenol a 40X de 4 cepas distintas de esta especie (A) MY5 (B) MY3 (C) FQH135-1 (D) FQZR-76. Laboratorio 101, Departamento de Bioquímica, UNAM.

F. verticillioides tiene la capacidad de crecer entre 3 y 37 °C, con un crecimiento óptimo entre 25°C – 28°C, y puede crecer bajo condiciones de oxígeno reducidas, pero no en su completa ausencia. Las colonias de *F. verticillioides* son de color blanco a salmón pálido, con un micelio de aspecto rugoso y una textura polvorienta debido a la producción de cadenas de microconidias. Por otra parte, la apariencia que suele tener el micelio vegetativo

de *F. verticillioides* en medio PDA, es variable, puede tener una coloración desde salmón pálido, violeta grisáceo, violeta parduzco a púrpura intenso (Figura 12) (Pitt, 2014).

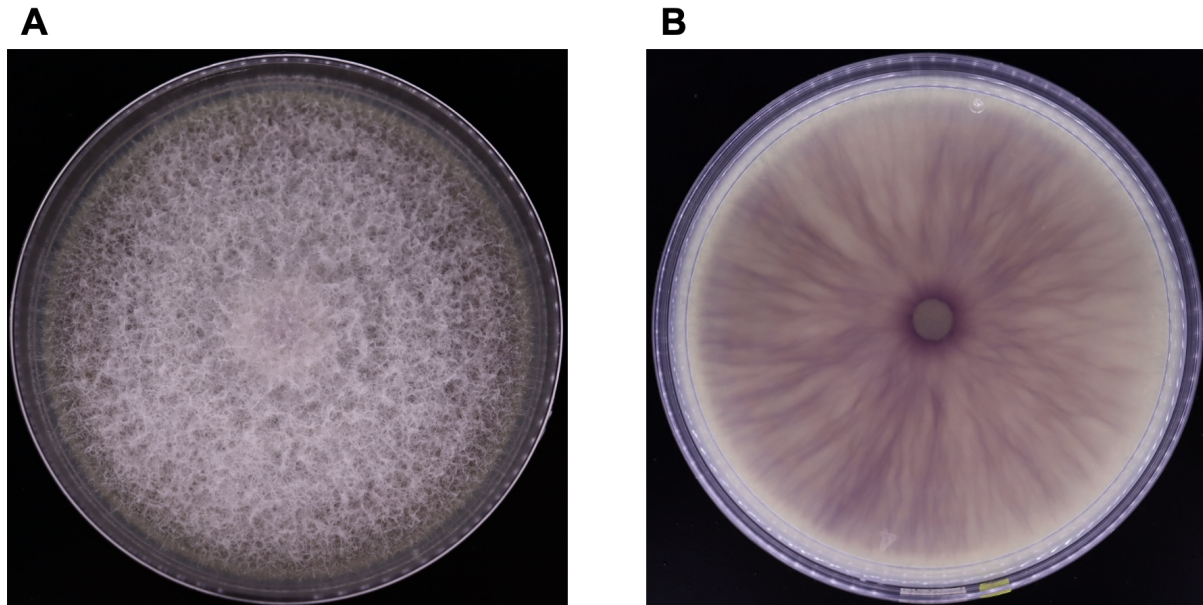


Figura 12. Cultivos de *Fusarium verticillioides* cepa MY3 en agar papa dextrosa. Se muestra (A) micelio aéreo y (B) micelio vegetativo. Laboratorio 101, Departamento de Bioquímica, UNAM.

3.3. *F. verticillioides* como patógeno del maíz

3.3.1. Mecanismos de penetración de *F. verticillioides* en maíz

Se ha observado que *F. verticillioides* tiene la capacidad de colonizar los suelos, pero únicamente esta especie representa el 10% o menos del total pertenecientes al género *Fusarium spp.* lo que sugiere que *F. verticillioides* es colonizador pero no es competitivo. Se sabe que *F. verticillioides* se encuentre con mayor frecuencia en residuos de maíz y se ha demostrado que persiste por al menos 630 días tanto en tallos que se encuentran sobre la superficie como por debajo del suelo (≤ 30 cm de profundidad). También se observó que *F. verticillioides* es capaz de colonizar raíces de plantas de maíz y alcanzar hasta 6×10^4 CFU/g de tejido. Esto muestra el potencial y relevancia de su presencia en el suelo y en residuos de la planta de maíz, ya que estos funcionan como reservorio para su posterior inoculación (Blacutt *et al.*, 2018).

Cuando *F. verticillioides* se encuentra como saprófito en residuos de cultivos, produce hifas engrosadas que le ayudan a prolongar su supervivencia. El principal modo de infección del grano de maíz es mediante la producción de conidias que son transportadas por el aire en

los campos de maíz e infectan los estigmas del maíz, y un modo de infección secundario común es a través de heridas en los tallos o en las mazorcas en desarrollo causadas por insectos como el barrenador europeo del maíz. Otro modo de infección es a través de la transmisión por semillas, que se presenta cuando la plántula se encuentra ya establecida a partir de una semilla infectada que puede estar albergando al patógeno y en etapas posteriores pueda causar la pudrición del tallo o de la mazorca (Kant *et al.*, 2011). La germinación de semillas de maíz en suelos infestados con *F. verticillioides* puede provocar que se desarrollen pudrición de la raíz y tizón de las plántulas o que se adquiera una infección endofítica en caso de que las condiciones no promuevan la enfermedad. Los resultados dependen de las condiciones climáticas y algunos otros factores. Además, el hongo también puede colonizar los granos de maíz a través del canal estilar, dando lugar al patrón "starburst" en los granos. Sin embargo, es importante destacar que la relación *Fusarium verticillioides-Zea mays* no ocurre de manera aislada, los insectos que están asociados a esta planta juegan un papel significativo en el ciclo de la enfermedad, como lo son el barrenador europeo del maíz antes mencionado (*Ostrinia nubilalis*) y el gusano de la raíz del maíz (*Diabrotica virgifera virgifera*) que se alimentan de las mazorcas y de tallos respectivamente, generando puntos de infección para *Fusarium spp.* Igualmente después de la cosecha, el hongo es capaz de sobrevivir y esporular en los residuos del cultivo, dando a lugar al inóculo para infecciones posteriores (Figura 13) (Blacutt *et al.*, 2018).

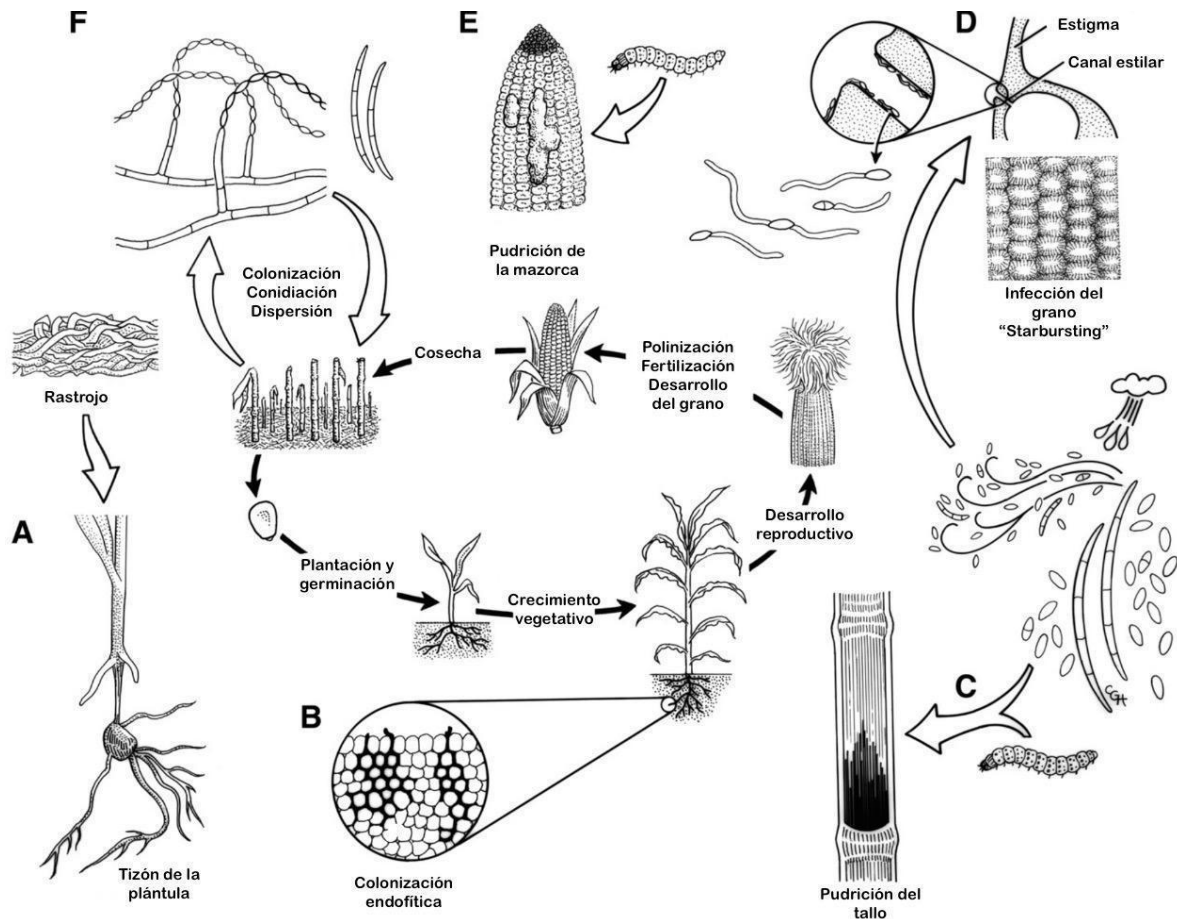


Figura 13. El ciclo de la enfermedad por *Fusarium verticillioides*, centrado en el ciclo de vida del maíz. (A) La germinación de la semilla de maíz en suelos infestados por *Fusarium spp.* pueden provocar el desarrollo de tizón o pudrición de la plántula; (B) Colonización endofítica ocurriendo en condiciones no promotoras de la enfermedad; (C) Heridas en el tallo por daño mecánico o causado por insectos da a lugar a puntos de infección para *F. verticillioides* que podría resultar en la pudrición del tallo; (D) Durante la etapa de desarrollo del estigma, *F. verticillioides* puede colonizar los granos de maíz a través del canal estilar, exhibiendo el patrón "starburst" en los granos de maíz; (E) La alimentación de *Ostrinia nubilalis* a partir de hojas, tallos y mazorcas proveen puntos de infección a *F. verticillioides* para provocar la pudrición del tallo y la mazorca; (F) Después de la cosecha, el hongo es capaz de sobrevivir y esporular en el rastrojo, proporcionando inóculo para infecciones subsecuentes. Adaptada de Blacutt, *et al.*, 2018.

3.3.2. Enfermedades causadas por *F. verticillioides* en maíz

F. verticillioides es capaz de crecer como endófito en los tejidos vegetativos y reproductivos del maíz, normalmente suele crecer sin causar síntomas de enfermedad pero en condiciones climáticas favorables para el hongo como lo son alta humedad y temperatura, o como resultado del estrés impuesto por el ataque de insectos u otros hongos, *F. verticillioides* puede infectar a la planta, provocando varias enfermedades como lo son el

tizón de las plántulas, la pudrición del tallo y la pudrición de la mazorca de maíz. Cuando se trata de crecimiento asintomático, el hongo reside en los espacios intercelulares sin dañar la célula vegetal y produce niveles relativamente bajos de micotoxinas (Kant *et al.*, 2011; De la Torre-Hernández *et al.*, 2014).

3.3.2.1. Tizón de la plántula

El tizón de las plántulas puede aparecer antes o después de que la planta emerja, o incluso puede provocar que éstas no emerjan. Las plántulas muestran síntomas como lo son una decoloración que va de amarillo claro a marrón, hasta crecimiento atrofiado (Figura 14). Cuando se ve afectado el sistema radicular otros síntomas que se pueden exhibir son la reducción del crecimiento radicular con manchas marrones en las raíces y el coleóptilo que conducen a una reducción del vigor de las plántulas o a una decoloración negra que indica una podredumbre total de las raíces (Oldenburg, *et al.*, 2017).

Ya que la producción de fumonisina FB1 causa la inhibición de la ceramida sintasa y resulta en la perturbación de la vía biosintética de esfingolípidos, se ha propuesto que esto es lo que da a lugar a que se desarrolle el tizón de la plántula debido a que se presenta una concentración celular elevada de 1-fosfatos de bases esfingoideas de cadena larga y de cadena corta (esfinganina y fitoesfingosina), lo que resulta en una muerte celular programada en la planta (Glenn, *et al.*, 2008).



Figura 14. Plántulas de maíz infectadas por *Fusarium verticillioides*. Plántulas con decoloración marrón germinadas a partir de semillas de maíz que fueron infectadas a partir de una solución de conidias. Laboratorio 101, Departamento de Bioquímica, UNAM.

3.3.2.2. Pudrición del tallo

La infección severa del maíz con *Fusarium spp.* presenta síntomas típicos de pudrición del tallo, caracterizada por decoloración marrón a rosada o salmón y desintegración del tallo (Figura 15A). En etapas posteriores, pueden verse capas fúngicas de color blanco a rosa claro o salmón fuera de los nudos de las partes infectadas del tallo, que son propensas a romperse (Figura 15B). *F. verticillioides* puede tener un papel especial debido a que como se mencionó anteriormente, puede estar creciendo como endófito y posteriormente penetrar de manera directa del tallo/raíces o a través de heridas (Oldenburg, *et al.*, 2017).

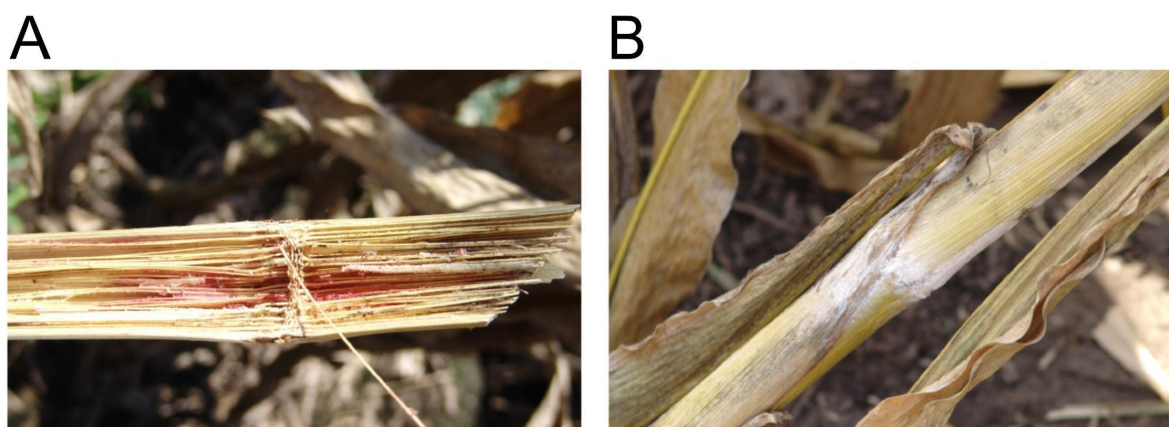


Figura 15. Pudrición del tallo provocada por *Fusarium spp.* (A) Decoloración dentro de los tallos podridos; (B) Crecimiento del hongo en el exterior del tallo. Adaptadas de Jackson-Ziems, *et al.*, 2014.

3.3.2.3. Pudrición de la mazorca y grano

La pudrición de la mazorca y grano causada por *F. verticillioides* se da principalmente en granos individuales o en zonas limitadas de la mazorca, a partir de donde pueden desarrollarse varios focos de infección independientes (Mesterhazy, *et al.*, 2020). Los granos infectados desarrollan un crecimiento algodonoso o también se puede mostrar que los granos infectados presentan el síntoma o patrón “starburst”, que se manifiesta como líneas blancas que irradian desde el punto de unión con el estigma o desde la base del grano (Figura 16) (Lanubile *et al.*, 2017). El grado de contaminación por fumonisinas es proporcional a la gravedad visual de la infección; sin embargo, los granos infectados también pueden ser asintomáticos y contener estas micotoxinas (Reid *et al.*, 2009).

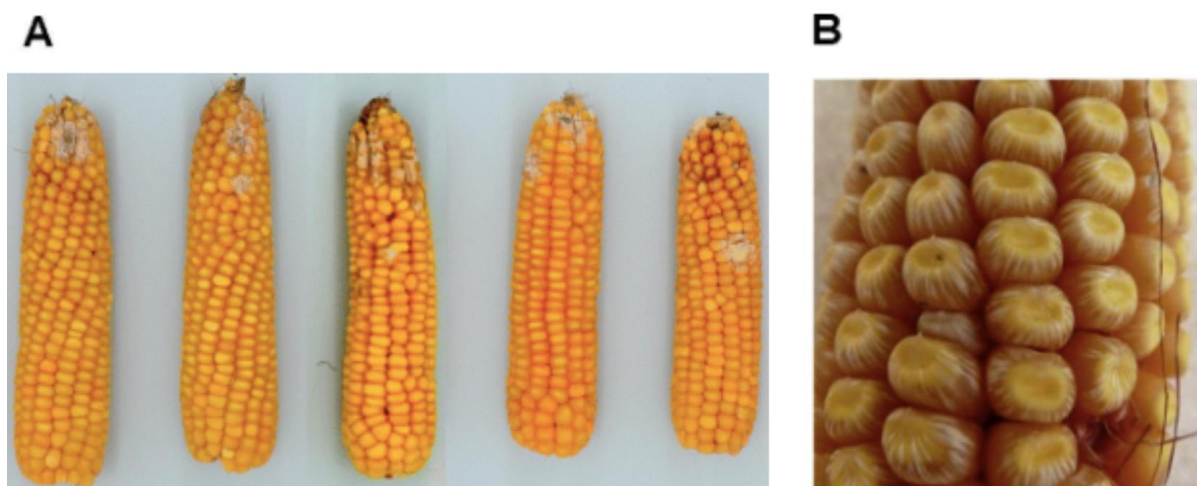


Figura 16. Pudrición de la mazorca provocada por *Fusarium spp.* (A) Pudrición de la mazorca por *F. verticillioides*; (B) Patrón “Starburst”. Adaptada de Lanubile *et al.*, 2017 y Oldenburg, *et al.*, 2017.

3.3.3. Producción de fumonisinas y su función en la virulencia

Fusarium spp., como muchos hongos fitopatógenos produce y excreta enzimas hidrolíticas que actúan sobre la pared celular vegetal, y contribuyendo a la colonización. Entre las primeras enzimas extracelulares secretadas por los hongos patógenos durante la infección, se encuentran las pectinasas y galacturonasas que facilitan la colonización del espacio apoplástico (Alconada y Kikot, 2013).

Una vez establecida la infección, se liberan las micotoxinas como las fumonisinas, que contribuyen a su virulencia (Kant *et al.*, 2011). La acción de la fumonisina sobre la ceramida sintasa causa un desbalance en el contenido de esfingolípidos que pueden conducir a muerte celular (Kant *et al.*, 2011). La producción de fumonisinas es variable entre las mismas cepas de esta especie y los niveles de toxina generados se han asociado a la agresividad del hongo (Galeana *et al.*, 2017). Además de fumonisinas, *F. verticillioides* es capaz de producir otras toxinas como el ácido fusárico, la fusarina, la moniliformina y la hormona vegetal ácido giberélico (Kant *et al.*, 2011).

La asociación *F. verticillioides*-maíz suele dar a lugar a que exista presión evolutiva en ambas partes, en el hospedero y en el patógeno. Por lo tanto, *F. verticillioides* es la especie más importante asociada a la contaminación por fumonisinas de los granos de maíz, y su acumulación puede producirse en el campo, tras las infecciones previas a la cosecha, y posiblemente continuar durante el almacenamiento del grano. La contaminación perjudica fuertemente la calidad del grano de maíz debido al impacto negativo en la salud animal y humana (Galeana *et al.*, 2017; Blacutt *et al.*, 2018; Beccari *et al.*, 2020).

4. Biotransformación de las benzoxazolinonas por *Fusarium verticillioides*

F. verticillioides ha coevolucionado con maíz y es capaz de metabolizar las benzoxazolinonas que este produce como defensa constitutiva, esto mediante dos pasos enzimáticos, que dan como resultado la tolerancia a estas fitoanticipinas, por la pérdida del grupo carbonilo del oxazol presente en las benzoxazolinonas (BOA y MBOA).

Para la detoxificación, las benzoxazolinonas son hidrolizadas por una β -lactamasa, codificada por el gen (*MBL1*) que forma parte del locus *FDB1*, para generar el intermediario 2-aminofenol (2-AP). Este es acilado por una arilamina N-acetiltransferasa, codificada por el gen *NAT1*, dentro del locus *FDB2*, dando lugar al ácido N-(2-hidroxifenil)malonámico (HPMA) que carece de toxicidad (Figura 17) (Glenn & Bacon, 2009).

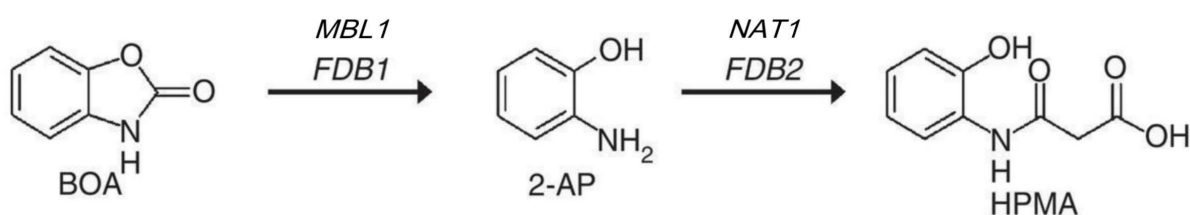


Figura 17. Biotransformación de las benzoxazolinonas por *Fusarium verticillioides*. BOA es transformada por *F. verticillioides* en el compuesto no tóxico HPMA a través de dos enzimas codificadas en los locus *FDB1*(*MBL1*) y *FDB2* (*NAT1*). Adaptada de Glenn & Bacon, 2009.

4.1. Actividad de β -metalolactamasa

Las β -lactamasas, son enzimas que hidrolizan amidas β -lactámicas y son producidas tanto por bacterias Gram-positivas como Gram-negativas. También existen metalo- β -lactamasas (*MBL*), con uno o dos iones de zinc catalíticamente funcionales (Bush, 2018; Tooke, *et al.*, 2019). Las β -lactamasas abundan en el suelo ya que son producidas por diversas especies bacterianas, por esto el suelo puede ser considerado un reservorio de genes de resistencia a antibióticos potencialmente peligrosos, ya que podrían transferirse del medio ambiente a bacterias de importancia clínica (Glenn, *et al.*, 2016).

F. verticillioides puede ser un componente del resistoma del suelo, ya que puede estar interaccionando de manera compleja con hospederos vegetales y microorganismos competidores en la planta y el suelo. Los antibióticos lactámicos (β -lactamas) pueden mediar en estas interacciones microbianas sin antibiosis manifiesta. Por esta razón los hongos, como *F. verticillioides* que codifica una enzima de la familia *MBL* en el locus *FDB1*, pueden utilizar estas enzimas para modular la señalización bacteriana y la expresión génica

de manera extracelular secretándolas al medio (estrategia ofensiva), así como también las puede utilizar para inactivar xenobióticos procedentes de plantas o microorganismos, hidrolizando de una serie de lactamas (estrategia defensiva) (Glenn, *et al.*, 2016).

4.2. Actividad de N-acetiltransferasa (NAT)

Las enzimas pertenecientes a la familia de las NAT (arilamina N-acetiltransferasas) son enzimas citosólicas que se encuentran tanto en procariontes como en eucariotes. En humanos estas enzimas catalizan la acetilación e inactivan una serie de xenobióticos (compuestos de arilamina, arilhidrazina e hidrazina) transfiriendo un grupo acetilo de la acetil-CoA al nitrógeno terminal de diversas aminas aromáticas y heterocíclicas del sustrato aceptor, mientras que en procariontes la especificidad de sustrato puede variar y los miembros de la familia génica se han relacionado con vías que incluyen la síntesis de amidas (Sinclair *et al.*, 2000; Sandy, *et al.*, 2005; Sim, *et al.*, 2008).

La NAT1 de *F. verticillioides* parece ser única en esta familia, ya que es una arilamina N-maloniltransferasa, con especificidad por la malonil-CoA en lugar de por la acetil-CoA (Glenn, *et al.*, 2016). Se ha dado a conocer que esta enzima homóloga a la arilamina N-acetiltransferasa en *F. verticillioides*, la (GIBMO)NAT1 con actividad de N-maloniltransferasa, tiene dos isoenzimas adicionales con afinidad diferencial por el sustrato donante, (GIBMO)NAT3 (N-acetiltransferasa) y (GIBMO)NAT2 (actividad desconocida) (Karagianni, *et al.*, 2022).

Las NAT humanas (NAT1 y NAT2) son enzimas citosólicas hepáticas cuya principal función es detoxificar aminas aromáticas. Esta actividad enzimática es inhibida por compuestos fenólicos, ya que en un estudio realizado con NAT1 citosólica de hígado se encontró que el ácido cafeico, el ácido ferúlico y el ácido gálico, entre otros, pueden inhibir a esta enzima (Figura 18) (Kukongviriyapan *et al.*, 2006). Esto es relevante para el estudio de la interacción entre *F. verticillioides* y el maíz, ya que como se mencionó en el apartado 1.2.1 (Mecanismos constitutivos), en la pared celular del maíz se encuentran compuestos fenólicos como el ácido ferúlico.

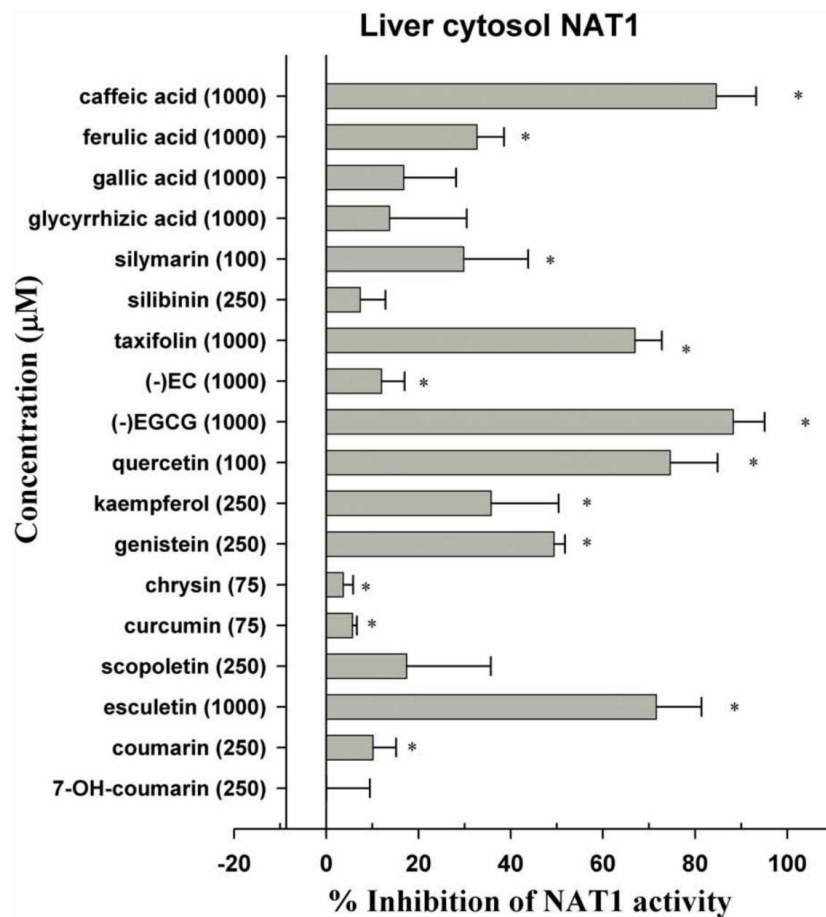


Figura 18. Inhibición de la actividad de NAT1 por distintos fitoquímicos. Ensayos realizados con la enzima NAT a partir de muestras de hígado (600 $\mu\text{g}/\text{mL}$), incubada con el fitoquímico probado (μM) y acetil-CoA (100 μM) por 10 min, la reacción se inició con PABA (7.5 μM) por 30 min a 37 °C. Se tomó la velocidad de reacción del control como el 100% de la actividad ($53.8 \pm 11.3 \text{ pmol min}^{-1} \text{ mg proteína}^{-1}$). Cada barra representa el promedio \pm DE, de 4 repeticiones por experimento. Tomada de Kukongviriyapan, *et al.*, 2006.

III. JUSTIFICACIÓN

Fusarium verticillioides representa una limitante en la productividad del maíz, ya que esta especie se puede encontrar con frecuencia infectando raíces, tallo y mazorca, siendo el principal patógeno del maíz y provocando varias enfermedades. Además de producir varias micotoxinas, entre éstas las fumonisinas, que al contaminar el maíz pueden provocar efectos nocivos en caso de ingesta por parte de animales y humanos, es capaz de biotransformar compuestos de defensa constitutivos de la planta como lo son las benzoxazolinonas lo que favorece su colonización.

Las fumonisinas son las principales micotoxinas producidas por *F. verticillioides* que contribuyen a su virulencia, y su producción es altamente variable entre las mismas cepas. Se han caracterizado distintas cepas de *F. verticillioides* mediante varios ensayos tanto en plántulas como en plantas para evaluar su virulencia relativa, donde se encontró que las cepas con alta producción de FB1 causan síntomas y daños más severos en el tejido de maíz, así como también muestran una capacidad de colonización más eficiente (Galeana *et al.*, 2017).

Dado que la producción de fumonisina FB1 por parte de *F. verticillioides* es un factor de virulencia del patógeno, que tiene una alta capacidad de detoxificar las benzoxazolinonas, es de interés determinar si también hay diversidad en la tolerancia a estos compuestos y si está asociada a un metabolismo más eficiente de estas moléculas de defensa constitutivos de la planta de maíz. Esta información contribuirá a establecer si existe una asociación entre la virulencia de *F. verticillioides* con su tolerancia a las benzoxazolinonas y postular si existe una relación con la agresividad del patógeno.

IV. ANTECEDENTES

La tolerancia que presenta *Fusarium verticillioides* a las benzoxazolinonas, así como la variabilidad de esta entre cepas de esta especie se ha estudiado en laboratorio y ha sido clasificada por Saunders y Kohn (2008), quienes catalogaron la tolerancia a la 2-benzoxazolinona (2-BOA) de especies de hongos endófitos aislados de maíz en 5 clases, donde la clase I tiene un umbral de tolerancia de 0.25 mg/mL, la II de 0.50 mg/mL, la III de 0.75 mg/mL, la IV de 1.00 mg/mL, en donde se encuentra *F. verticillioides*, y la V de 1.10 mg/mL.

Se encontró que existe diversidad en la capacidad de tolerar BOA entre cepas de *F. verticillioides* aisladas de semillas de maíz, al hacer la comparación de los porcentajes de crecimiento de once cepas en presencia de 2-BOA (0.5 mg/mL) (Camacho-Gamiño, 2023). En la gráfica (Figura 19) se puede observar el porcentaje de crecimiento con respecto al control de solvente (Dimetilsulfóxido; DMSO) y muestra diferencias en el crecimiento entre las cepas. Estos datos indican que hay diversidad en la tolerancia a 2-BOA entre las cepas, pero no revelan si estas diferencias se deben exclusivamente a la capacidad de metabolizar el compuesto o porque la cepa en ausencia de 2-BOA tiene una tasa de crecimiento muy alta.

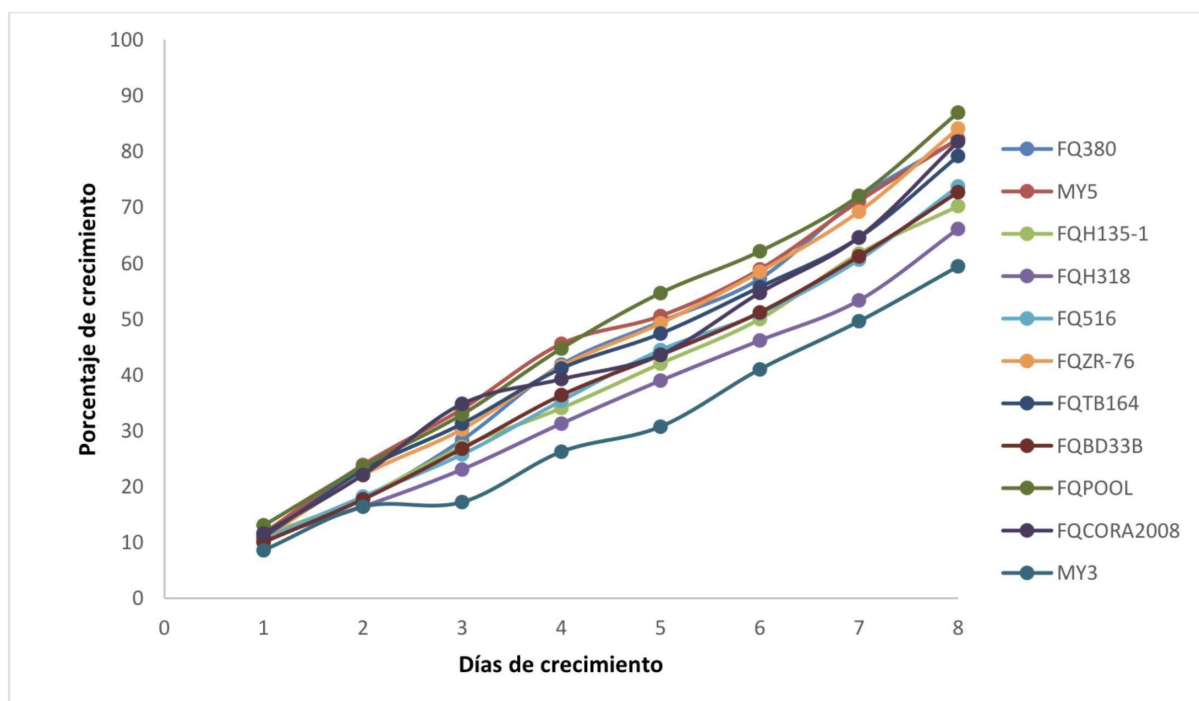


Figura 19. Patrón de crecimiento radial de distintas cepas de *Fusarium verticillioides* en medio PDA suplementado con BOA (0.5 mg/mL) durante 8 días. Tomado de Camacho-Gamiño, 2023.

V. HIPÓTESIS

Fusarium verticillioides ha coevolucionado con el maíz de tal forma que es capaz de biotransformar las benzoxazolinonas, lo que contribuyen a su virulencia, por lo que las poblaciones de este hongo mostrarán diferencias al tolerar y metabolizar estos compuestos de defensa del maíz.

VI. OBJETIVOS

Objetivo General:

Determinar si hay diversidad entre cepas de *Fusarium verticillioides* en su capacidad de tolerar y metabolizar benzoxazolinonas.

Objetivos Particulares:

1. Estudiar la presencia del gen *NAT1* en cepas de *F. verticillioides* aisladas de maíz.
2. Desarrollar métodos de cromatografía en capa fina y cromatografía de líquidos para analizar benzoxazolinonas y los productos de su metabolismo.
3. Comparar el metabolismo de 2-BOA y MBOA en cepas de *F. verticillioides*, aisladas de maíz.
4. Establecer un ensayo de infección de *F. verticillioides* en raíces de plántulas de maíz para evaluar los niveles de benzoxazolinonas.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Material biológico

1.1. Cepas de *Fusarium verticillioides*

Se utilizaron de manera inicial 10 cepas distintas de *Fusarium verticillioides* aisladas de semillas de maíz blanco, provenientes de distintas partes del país, que diferían en cuanto a su agresividad en ensayos de plántulas de maíz, en la producción de fumonisina B1 y en su capacidad de biotransformar BOA. Posteriormente se eligieron y se usaron las cepas MY3, MY5, FQZR-76 y FQH135-1, de las cuales MY3 y MY5 provienen del Valle de Yaqui, Sonora, mientras que FQZR-76 de Santiago Etlá, Oaxaca y FQH135-1 de Chalco, Estado de México (Sánchez-Rangel *et al.*, 2005).

Las cepas mencionadas anteriormente se sembraron en medio PDA 0.5X y se incubaron a 28 °C en condiciones de oscuridad cada que se requirieron, a partir de cepas que se mantenían en glicerol (18%) a -70 °C.

1.2. Colecta y conteo de conidias

Los cultivos de las distintas cepas de *F. verticillioides* creciendo en cajas petri en PDA 0.5X fueron inundadas con agua estéril (8 – 10 mL) e incubadas con agitación por aproximadamente 1 hora. Posteriormente, con una micropipeta se desprendieron las conidias y se colectaron en tubos eppendorf de 2 mL. A partir de esta suspensión, se prepararon diluciones para realizar el conteo de conidias.

Con ayuda del hematocitómetro, se contaron las conidias bajo el microscopio (40X) de los cuatro cuadrantes externos y se calculó la concentración mediante la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Conidias}}{\text{mL}} = (\underline{x})(FD)(10^4)$$

Donde:

\underline{x} = Promedio de número de conidias por cuadrante

FD = Factor de dilución

10^4 = Volumen de cada cuadrante (10^{-4} mL)

A partir de estas suspensiones se realizaron diluciones para obtener el número de conidias requerido en cada experimento. Las suspensiones de conidias se almacenaron a 4°C por un máximo de 7 días.

1.3. Genotipo de maíz

Se usaron semillas de maíz de raza "Cacahuacintle" obtenido del mercado de Chalco, Estado de México, 2018.

2. Análisis bioinformático de la filogenia del gen *NAT1*

Se identificó el gen que codifica la enzima *NAT1* de *F. verticillioides* en el locus *FDB1* en la plataforma NCBI, usando el número de acceso EU552489.1, *Gibberella moniliformis* arylamine N-acetyltransferase family protein (*FDB2*) gene, complete cds (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/EU552489.1/>), y se hizo la traducción del cDNA resultante. La secuencia codificante de la proteína con No. Acceso ACD88491.1, arylamine N-acetyltransferase family protein [[*Gibberella*] fujikuroi var. moniliformis] (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/ACD88491.1>), se utilizó para hacer un análisis con ayuda de BLASTP, donde se hicieron dos comparaciones independientes, una con sus homólogos del género *Fusarium spp.* y la otra con hongos que no pertenecieran a este género. De las secuencias obtenidas, se tomaron las 35 primeras con mayor similitud (mejores valores de E y altos porcentajes de identidad) y se llevó a cabo un alineamiento múltiple de secuencias (MSA) a través de Clustal, con el que posteriormente se realizó un árbol filogenético mediante el método Neighbor-Joining.

3. Análisis de la presencia del gen *NAT1* en las cepas de *Fusarium verticillioides*

3.1. Extracción de DNA

Se realizó la extracción de DNA genómico a partir de conidias de 10 cepas de *Fusarium verticillioides* (FQTB164, FQH135-1, MY5, FQZR-76, FQ516, FQ380, FQCORA2008, FQBD33B, MY3 y FQH318). Las conidias fueron obtenidas de las cepas de *F. verticillioides* inoculadas en medio PDA e incubadas a 28 °C por 10 días.

De la suspensión de conidias obtenida se tomaron 2000 µL y se centrifugaron a 12,000 rpm por 15 minutos. El sedimento se resuspendió en 1000 µL de solución amortiguadora para extracción de DNA (200 mM Trizma® Base, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA disódico, 0.5 % SDS) y se calentó a 90 °C por 15 minutos. Cuando estuvo a temperatura ambiente la

suspensión se centrifugó a 12,000 rpm por 15 min. Se tomaron 700 µL del sobrenadante y se mezclaron con 700 µL de isopropanol mediante agitación manual, posteriormente se congelaron por 15 min y se centrifugaron en frío a 13,000 rpm por 10 minutos. Se decantó el sobrenadante y se dejó secar el sedimento, que posteriormente fue suspendido en 200 µL de agua estéril y almacenado en congelación (Edwards *et al.*, 1991).

3.2. Ensayos de PCR

Las reacciones para el gen *NAT1* consistieron en 0.05 U/µL de GoTaq DNA Polimerasa, Buffer de PCR 1X, 200 µM de dNTPs, 0.5 µM de primer directo (NAT1F), 0.5 µM de primer inverso (NAT4) y 10 µL de DNA molde (cantidades variables dependiendo de la cepa, entre el rango de 113-1040 ng). El ciclo térmico consistió en una desnaturalización inicial de 94 °C durante 5 min, seguida de 40 ciclos de 94 °C durante 30 s, 53 °C durante 30 s y 72 °C durante 45 s, y por último una incubación final de 72 °C por 7 min (Glenn & Bacon, 2009).

Tabla 5. Primers utilizados en este estudio.

Primer	Secuencia 5'-3'
NAT1F	GGGGTCTTTCAACACACTG
NAT4	TGGTGACACTGAACCTTC

Los productos de amplificación se analizaron por electroforesis horizontal en un gel de agarosa (2%).

3.2.1. Electroforesis horizontal en gel de agarosa

Para preparar 25 mL de gel de agarosa 2.0 %, se pesaron 0.5 g de agarosa que se fundieron en 25 mL de solución amortiguadora TAE (1X) calentando en el microondas y agitando constantemente, posteriormente se le agregaron 25 µL de una solución de bromuro de etidio (0.5 mg/mL). El gel fundido se vació en el molde con el peine y se dejó gelificar.

El gel se colocó en la cámara de electroforesis y se llenó con solución amortiguadora TAE (1X), después se cargaron 15 µL de cada muestra, así como también 15 µL del marcador de peso molecular (escalera de 100 pb). El gel se corrió a 85 V entre 35 - 45 minutos y al terminó se realizó la observación de este con el sistema de imagen ChemiDoc MP (Bio-Rad).

4. Evaluación de la capacidad de biotransformación de BOA y MBOA por *Fusarium verticillioides*

En un ensayo preliminar se evaluó la capacidad de metabolizar BOA por 10 cepas distintas de *Fusarium verticillioides*, de la misma manera en la que se explica a continuación, con la única diferencia de que el inóculo no fue controlado, ya que se inoculó el medio con un cuadro de $\approx 1 \text{ cm}^2$ de PDA en el que fue crecido el hongo. A partir de estos resultados se eligieron las cepas para evaluar en este estudio.

4.1. Inoculación, condiciones de incubación y muestreo

Para suplementar el medio Czapek con 0.25 mg/mL de BOA en DMSO, se agregaron a 13 matraces con medio Czapek, 37.5 μL de una solución de BOA (100 mg/mL en DMSO) y se agitaron manualmente. Después, los matraces se inocularon con 2×10^6 conidias de 4 cepas de *F. verticillioides*, MY3, MY5, FQZR-76 y FQH135-1, a partir de suspensiones de conidias con concentraciones conocidas y fueron incubadas a 28 °C en condiciones de oscuridad. Cada cepa se hizo por triplicado y un matraz fue suplementado únicamente con BOA (no se inoculó) que fue el control negativo. Este procedimiento se realizó de la misma manera y con las mismas concentraciones y volúmenes para el experimento con MBOA.

El muestreo, que fue idéntico para ambos experimentos, con BOA y MBOA, se realizó en la campana de flujo laminar cada 24 h, los 4 días posteriores a la inoculación, tomando 500 μL del contenido del matraz que se colocaba en un tubo Eppendorf, luego se centrifugaba por 10 minutos a 12,000 rpm y se colocaba el sobrenadante en un tubo Eppendorf limpio. El sobrenadante se almacenó en el congelador a -20 °C.

4.2. Análisis por Cromatografía en Capa Fina

Se realizó cromatografía en capa fina (TLC) en placas de sílica gel (Sigma-Aldrich) de 4 cm \times 8 cm con indicador fluorescente verde (254 nm). Se marcaron las placas y se colocaron 5 μL de estándar de BOA o MBOA (10 mg/mL en MeOH) y 5 μL de cada muestra tomada a las 24, 48, 72 y 96 h. Posteriormente se metieron las placas en una cámara saturada que contenía la fase móvil tolueno-acetato de etilo-ácido acético (50:40:10 v/v) y se dejaron correr. Cuando las cromatoplasmas estaban secas se observaron bajo una lámpara de luz UV de onda corta (254 nm).

4.3. Cuantificación por HPLC

4.3.1. Condiciones de análisis

Para la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) se empleó una bomba Shimadzu modelo LC-10AD y un detector UV-VIS (Shimadzu, SPD-10AV) programado a una longitud de onda de 260 nm. Los compuestos se separaron en una columna hidrofóbica C18 (15 cm × 4.6 mm, 5 µm) con buffer de fosfatos-metanol (50:50 v/v, con pH entre 2 y 3) como fase móvil y con un flujo de 1 mL/min. Los cromatogramas se recopilaron en un integrador (Shimadzu, C-R5A) ajustado a los siguientes parámetros:

Tabla 6. Parámetros del integrador utilizados en HPLC.

Parámetro	Valor
Width	1
Slope	700
Drift	0
Min. Area	5000
T. Dbl	0
Stop. Tm	8
Atten	3
Speed	3
Method	0021
Format	0
Spl. Wt	100
Is. Wt	1

5. Evaluación del HPMA como producto de la biotransformación de BOA por *Fusarium verticillioides*

5.1. Obtención del estándar de HPMA

A partir de muestras de 96 h de *F. verticillioides* inoculadas con BOA corridas mediante TLC, se separó el compuesto producto de la biotransformación de BOA, el HPMA.

Como paso inicial se hizo una partición de la muestra con acetato de etilo, mediante 3 lavados y se separó la fase orgánica que fue evaporada entre 50 - 60 °C a sequedad con nitrógeno, posteriormente se le agregaron 100 µL de MeOH. A partir de este concentrado se hizo una cromatoplaque que se eluyó con la fase móvil Tolueno: Acetato de etilo: Ácido acético 50:40:10, de la cual mediante el raspado de la sílica gel se obtuvo el HPMA observado con luz UV de onda corta. En una columna empacada con fibra de vidrio en una pipeta Pasteur, se colocó la sílica gel obtenida y se eluyó con 4 mL de MeOH, luego se evaporó a sequedad, entre 50 - 60 °C bajo flujo de nitrógeno. Por último se le agregaron 200 µL de MeOH y se almacenó en congelación.

5.2. Cuantificación de HPMA por HPLC

5.2.1. Condiciones de análisis

Se realizó la cuantificación mediante cromatografía de líquidos de alta resolución empleando la misma fase móvil y parámetros que para la cuantificación de 2-BOA y MBOA detalladas en el apartado anterior. Se utilizaron únicamente las muestras de las cuatro cepas de *F. verticillioides* (MY3, MY5, FQZR-76 y FQH135-1) inoculadas con 2-BOA de 24 h y 72h.

6. Efecto del 2-Aminofenol (2-AP) sobre el crecimiento radial de *Fusarium verticillioides*

6.1. Inoculación y condiciones de incubación

Se empleó PDA (0.5X) suplementado con 2-AP a 3 distintas concentraciones (0.1, 0.2 y 0.4 mg/mL de 2-AP disuelto en DMSO), se inocularon los medios de cultivo en un ambiente estéril, colocando un disco de papel filtro, de 0.7 cm de diámetro, en el centro de la caja sobre el medio, posteriormente, sobre el disco se pusieron 5 µL de una suspensión de conidias con concentración de 5×10^5 conidias/mL de las cepas MY3 y FQZR-76, que se hicieron por triplicado para cada concentración y se incubaron a 28 °C bajo condiciones de oscuridad.

6.2. Medición del diámetro del crecimiento de las colonias

La medición del diámetro se llevó a cabo cada 24 horas por los 10 días consecutivos a su inoculación, para esta, se marcaron las cajas petri en la parte reversa, de extremo a extremo, y se midió el diámetro de las colonias de igual manera todos los días, de acuerdo a estas marcas.

7. Evaluación de la capacidad de biotransformación de 2-Aminofenol (2-AP) por *Fusarium verticillioides*

7.1. Inoculación, condiciones de incubación y muestreo

Para este experimento se suplementó el medio Czapek con 0.15 mg/mL de 2-AP, en el que se agregaron 22.5 µL de una solución de 2-AP con concentración de 100 mg/mL a 13 matraces con medio Czapek, y se agitaron suavemente. Después, los matraces se inocularon con 2×10^6 conidias de 4 cepas de *Fusarium verticillioides*, MY3, MY5, FQZR-76 y FQH135-1, a partir de suspensiones de conidias con concentraciones conocidas. Cada cepa se hizo por triplicado y se hizo un control negativo únicamente con 2-AP (no se inoculó). Se incubaron a 28 °C bajo condiciones de oscuridad. El muestreo se realizó del mismo modo que para los ensayos de la evaluación de la capacidad de biotransformación de BOA y MBOA.

7.2. Evaluación por TLC

Se realizó cromatografía en capa fina (TLC) en placas de sílica gel de 4 cm × 8 cm con indicador fluorescente verde (254 nm). Se marcaron las placas y se colocaron 5 µL de estándar de 2-AP (10 mg/mL en MeOH) y 5 µL de cada muestra tomada a las 24, 48, 72, 96 y 120 h. Posteriormente se corrió la cromatografía con butanol saturado con agua como fase móvil. Cuando la cromatoplaqueta estaba seca fue revelada con luz UV de onda corta (254 nm).

7.3. Cuantificación por HPLC

La cuantificación de 2-AP por cromatografía de líquidos de alta resolución se realizó usando el sistema descrito arriba con el detector programado a una longitud de onda de 260 nm, con fase móvil de buffer de fosfatos-metanol (90:10 v/v, con pH entre 4-5) y con un flujo de 1 mL/min. Los parámetros utilizados en el integrador fueron los mismos enlistados en la Tabla 6, a excepción del tiempo de término del análisis, que fue de 5 minutos para este caso.

8. Efecto del Ácido Ferúlico (FA) sobre el metabolismo de BOA y en el crecimiento radial de *Fusarium verticillioides*

8.1. Ensayo de crecimiento radial

El ensayo se hizo en placas con medio PDA 0.5X suplementado con BOA (0.5 mg/mL) y FA a 2 concentraciones diferentes (0.25 y 0.50 mM de acuerdo a lo descrito en la Tabla 5), se inocularon los medios de cultivo en un ambiente estéril, de la misma manera que para el ensayo de crecimiento radial con 2-AP, colocando un disco de papel filtro sobre el que se pusieron 5 µL de una suspensión de conidias con concentración de 5×10^5 conidias/mL de la cepa MY3. Igualmente se hicieron por triplicado para cada concentración y se incubaron a 28 °C bajo condiciones de oscuridad. La medición del diámetro se llevó a cabo cada 24 horas durante los 8 días siguientes a su inoculación.

8.2. Evaluación por TLC y cuantificación de BOA por HPLC

El medio Czapek se suplementó con 75 µL de BOA (100 mg/mL en DMSO) y con 15 o 30 µL de ácido ferúlico para tener concentraciones finales de 1 y 2 mM respectivamente. Luego, los matraces se inocularon con 2×10^6 conidias de la cepa MY3, a partir de una suspensión de conidias con concentración conocida. Se incubaron a 28 °C en condiciones de oscuridad. Cada concentración se hizo por triplicado. El muestreo, que fue idéntico que el realizado para ambos experimentos, con BOA y MBOA, se realizó en la campana de flujo laminar a las 96 horas. La cromatografía en capa fina y la cromatografía de líquidos de alta resolución se realizaron del mismo modo y bajo las mismas condiciones que se describieron en los apartados 5.2 y 5.3.

9. Ensayo de infección de raíces de maíz por *Fusarium verticillioides* y evaluación de la producción de benzoxazolinonas

9.1. Desinfección de semillas

Se sumergieron las semillas de maíz en una solución de hipoclorito de sodio al 1 % en un frasco estéril y se agitó vigorosamente por 2 minutos, luego se decantó la solución y se hicieron 3 lavados con agua estéril. Se dejaron secar las semillas en papel absorbente entre 10 y 15 minutos.

9.2. Inoculación y condiciones de incubación

Las semillas desinfectadas fueron germinadas a 28 °C en agar al 1.2 % por 48 horas bajo condiciones de oscuridad y posteriormente fueron inoculadas con las cepas MY3, MY5, FQZR-76 y FQH135-1 de *F. verticillioides*. Para la inoculación, se sumergieron las raíces primarias por dos minutos en suspensiones de conidias de cada cepa con concentración de 10^7 conidias/mL y luego se regresaron a la caja petri con agar 1.2 %. Se incubaron nuevamente a 28 °C por 24 h. La metodología implementada para el ensayo de infección de raíces de maíz por *Fusarium verticillioides* se muestra en la Figura 20.



Figura 20. Inoculación de raíces primarias con *Fusarium verticillioides*. Se muestran las raíces primarias de semillas de maíz con 48 h de germinación inoculadas a partir de suspensiones de conidias.

9.3. Tinción histoquímica de benzoxazinoides en raíces primarias

Las radículas de las semillas que se inocularon con las suspensiones de conidias, se tiñeron con una solución de cloruro férrico ~ 0.4 M (1.0 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ en una mezcla de 10 mL EtOH al 95% con 100 μL de HCl 1.5 M), sumergiéndolas entre 10 y 20 segundos, seguidos de un lavado con agua destilada, este procedimiento se hizo de acuerdo con el método descrito por Park *et al.*, 2004. Después de la tinción, las radículas fueron observadas con ayuda del microscopio estereoscópico.

VIII. RESULTADOS

1. Análisis bioinformático de la filogenia del gen *NAT1* en *Fusarium verticillioides*

Las secuencias homólogas del gen *NAT1* de *F. verticillioides* en especies de hongos distintas a *Fusarium spp.* y pertenecientes a este, mostraron que las especies del mismo género tenían mayor similitud que las de los hongos que no corresponden a este, con un mayor número de residuos conservados entre las secuencias de las especies del mismo género que *Fusarium verticillioides*.

Los resultados de los análisis filogenéticos, uno para las especies pertenecientes al género *Fusarium spp.* (Figura 21) y otro para las especies de hongos no pertenecientes a este género (Figura 22) muestran que no todos los nodos tienen un buen soporte, ya que el *bootstrap* es menor a 70, indicando que no son tan fiables. Aun así, se puede ver que los taxones del árbol de especies de *F. verticillioides* muestran mayor relación entre ellos, observando más nodos a lo largo de las ramas que llegan a cada taxón indicando que comparten más ancestros recientes, en comparación con los obtenidos en el árbol de género distintos a *Fusarium spp.* que muestran mayor divergencia a lo largo de las ramas.

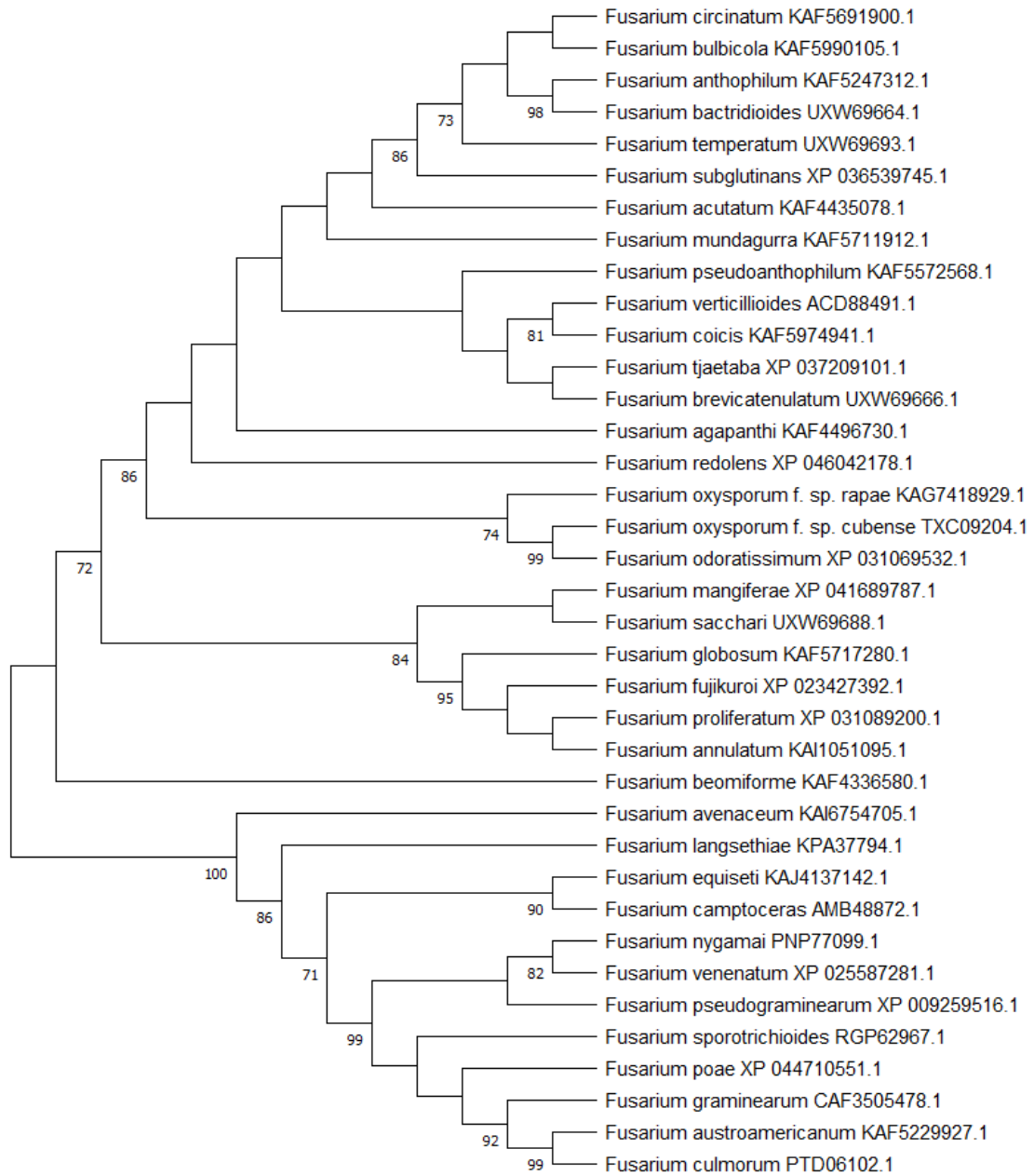


Figura 21. Árbol filogenético que muestra la relación entre las secuencias de la posible proteína NAT1 codificada en el locus *FDB2* con sus homólogos presentes en *Fusarium spp.* Se muestran en los nodos únicamente valores de *bootstrap* >70.

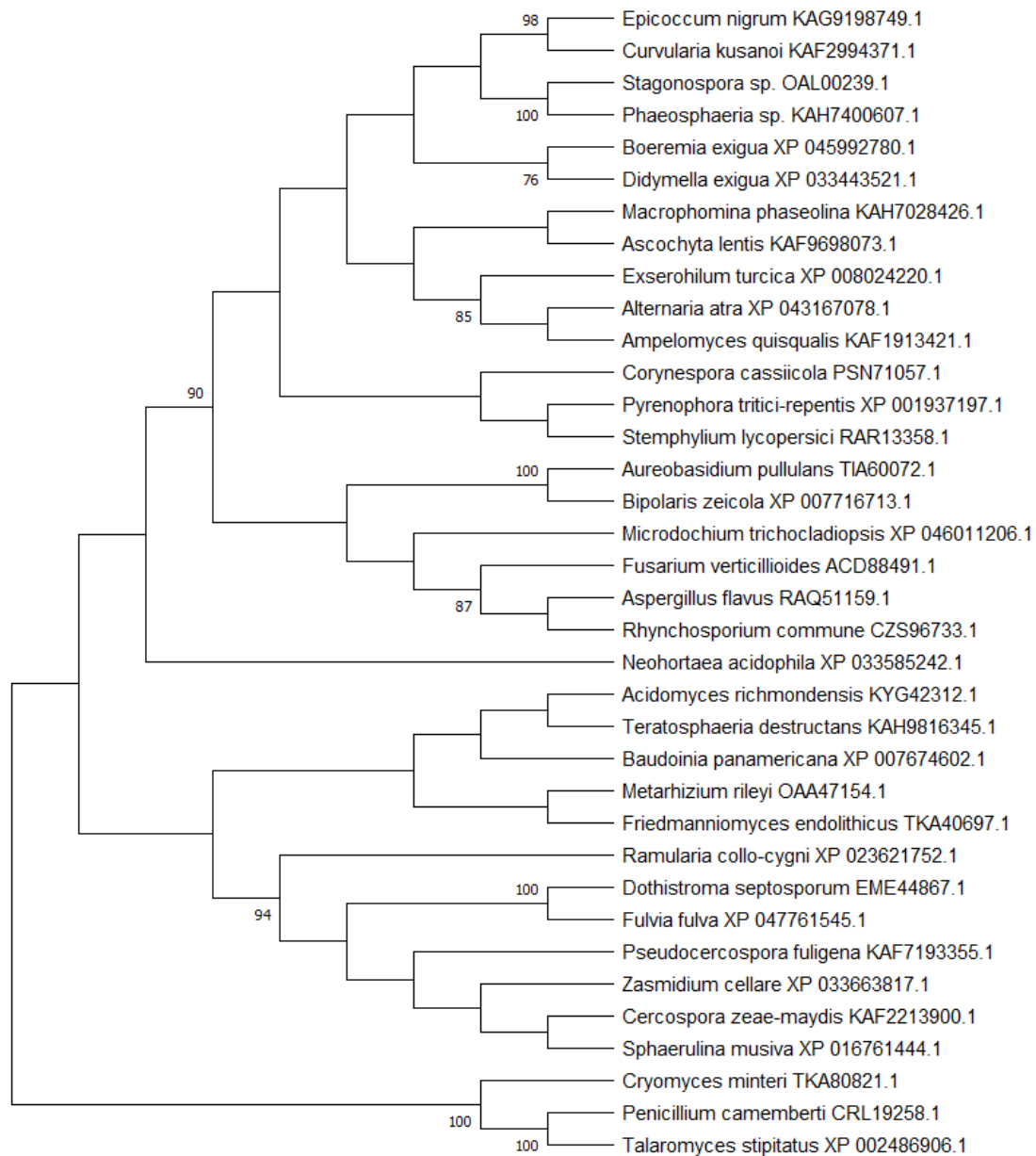


Figura 22. Árbol filogenético que muestra la relación entre las secuencias de la posible proteína NAT1 codificada en el locus *FDB2* con sus homólogos presentes en especies de hongos no pertenecientes a *Fusarium spp.* Se muestran en los nodos únicamente valores de *bootstrap* > 70.

2. Análisis de la presencia del gen *NAT1* en cepas de *Fusarium verticillioides*

Todas las cepas probadas mostraron la presencia de este gen amplificado (Figura 23) y se puede deducir, a partir de marcador de peso molecular, que las bandas obtenidas se encuentran cerca de los 600 pb.

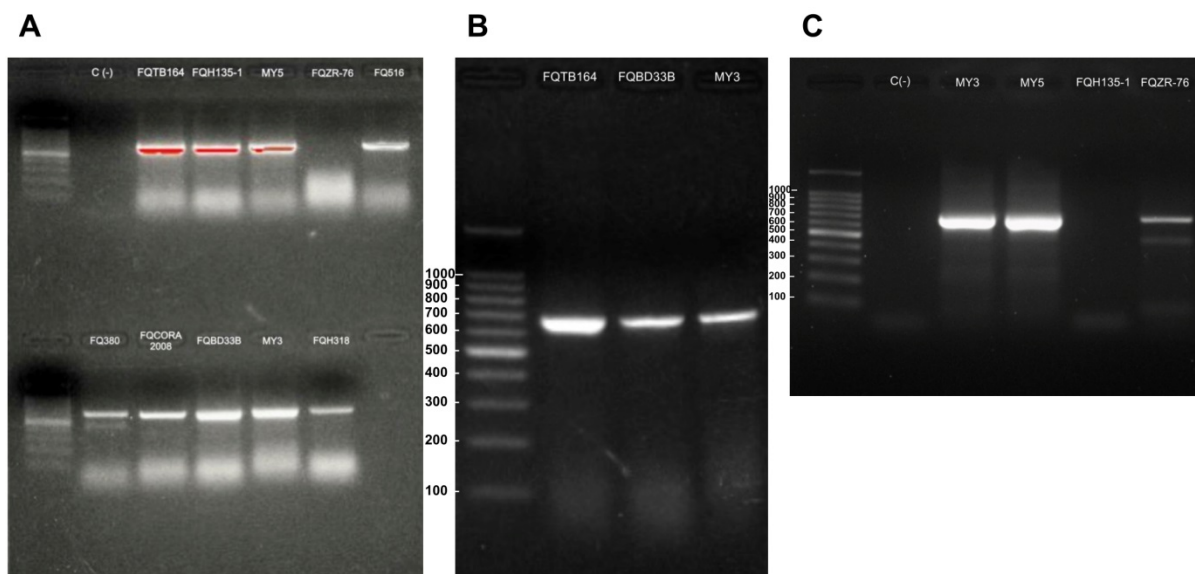


Figura 23. Amplificación del gen *NAT1* a partir de cepas de *F. verticillioides* mediante PCR. El corrimiento electroforético se realizó en gel de agarosa 2.0% y 1.2% con bromuro de etidio, en el cual se muestra un marcador con una escalera de 100 pb en el primer carril de cada fila. (A) Amplificación del gen *NAT1* en 9 de las 10 cepas de *F. verticillioides* probadas; (B) Amplificación del gen *NAT1* de 3 cepas de *F. verticillioides* donde se observan bandas entre 600 y 700 pb; (C) Amplificación del gen *NAT1* en 3 de las 4 cepas seleccionadas de *F. verticillioides*.

3. Evaluación de la capacidad de biotransformación de 2-BOA y MBOA por *Fusarium verticillioides*

3.1. Diversidad en el metabolismo de 2-BOA por *F. verticillioides*

La Figura 24 muestra el análisis preliminar de biotransformación de 2-BOA de las 10 cepas de *F. verticillioides* y se observa que hay una diferencia en esta capacidad entre ellas; para las cepas FQZR-76, MY5 y FQ380 ya no se detecta 2-BOA ($R_f = 0.7$) a las 72 h o 96 h, mientras que en el resto de las cepas todavía muestran trazas del compuesto, y entre éstas, la cepa FQH135-1 parece ser la que tuvo la menor tasa de transformación. Concomitante a la conversión del 2-BOA, se observó la acumulación de una mancha con $R_f = 0.5$, presumiblemente corresponde a HPMA (Glenn, *et al.*, 2001). Igualmente, se observan diferencias entre las cepas en su capacidad para producir este compuesto.

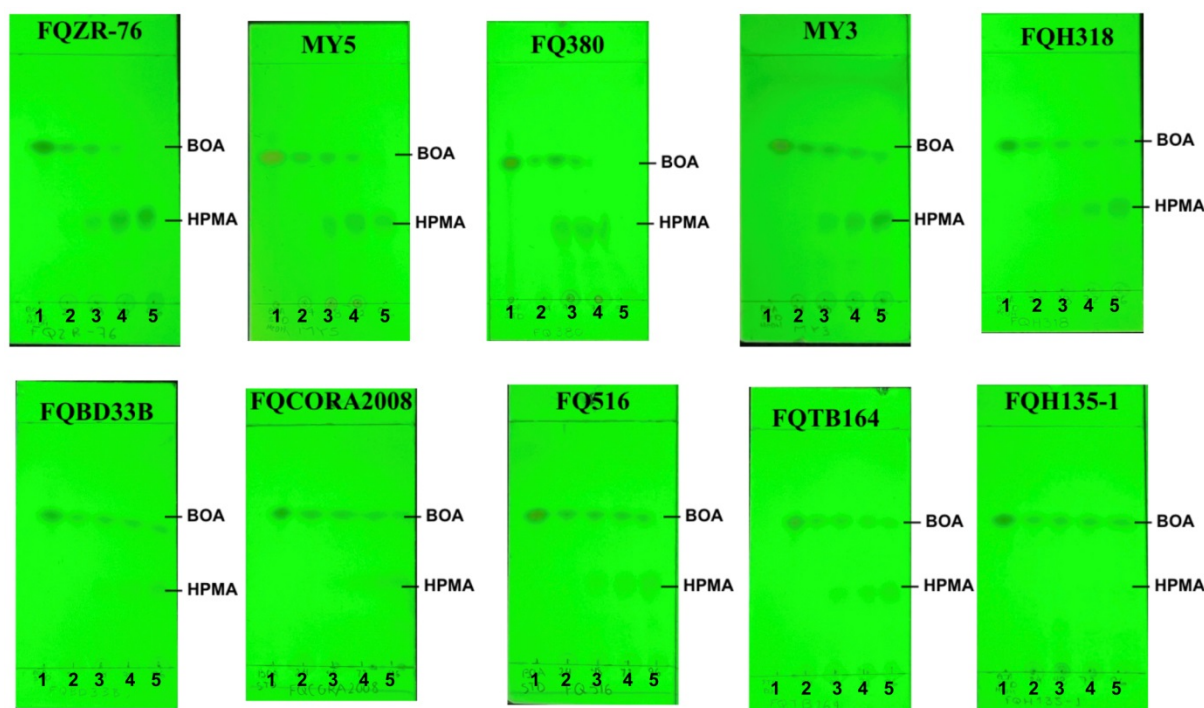


Figura 24. Biotransformación de 2-BOA por 10 cepas de *Fusarium verticillioides* analizadas por TLC. Con STD de BOA (carril 1) y con muestras de 24 (carril 2), 48 (carril 3), 72 (carril 4) y 96 (carril 5) horas de incubación en medio Czapek suplementado con BOA (0.5 mg/mL).

A partir de estos resultados, para continuar con el estudio, se eligieron 4 cepas que mostraban diferencias en su capacidad para detoxificar esta benzoxazolinona, que fueron FQZR-76, MY3, MY5 y FQH135-1. Para asegurarnos que la diversidad observada en el metabolismo del BOA se debía a diferencias entre las cepas y no a la cantidad de inóculo inicial, en el resto de los experimentos realizados se controló este parámetro y para cada cepa se inocularon 2×10^6 conidias.

La observación previa sobre la capacidad diferencial de las cepas de metabolizar 2-BOA se reprodujo en otro experimento, en el que se observa que la cepa FQZR-76 fue la más eficiente para metabolizar a BOA, y generar HPMA, seguidas de las cepas MY3 y MY5, que mostraron un comportamiento similar entre sí (Figura 25). En contraste, la cepa FQH135-1 mostró ser más lenta metabolizando a BOA.

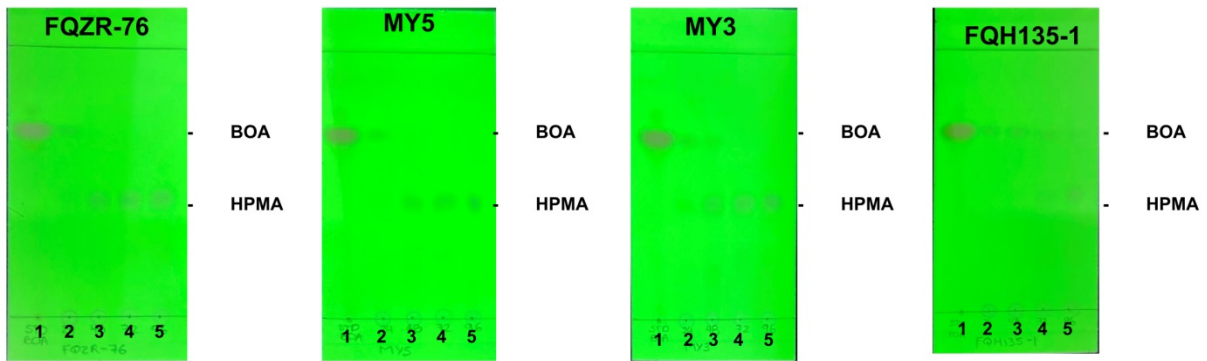


Figura 25. Evaluación de la biotransformación de BOA por 4 cepas de *Fusarium verticillioides* (MY3, MY5, FQZR-76 y FQH135-1) mediante TLC. Con STD de BOA (carril 1) y con muestras de 24 (carril 2), 48 (carril 3), 72 (carril 4) y 96 (carril 5) horas de incubación en medio Czapek suplementado con BOA (0.25 mg/mL).

El análisis cuantitativo de esta biotransformación se realizó como se detalla en Materiales y Métodos y la Figura 26 muestra un cromatograma representativo de la separación de 2-BOA, MBOA y HPMA. De igual manera se construyeron curvas de calibración que se muestran en el ANEXO.

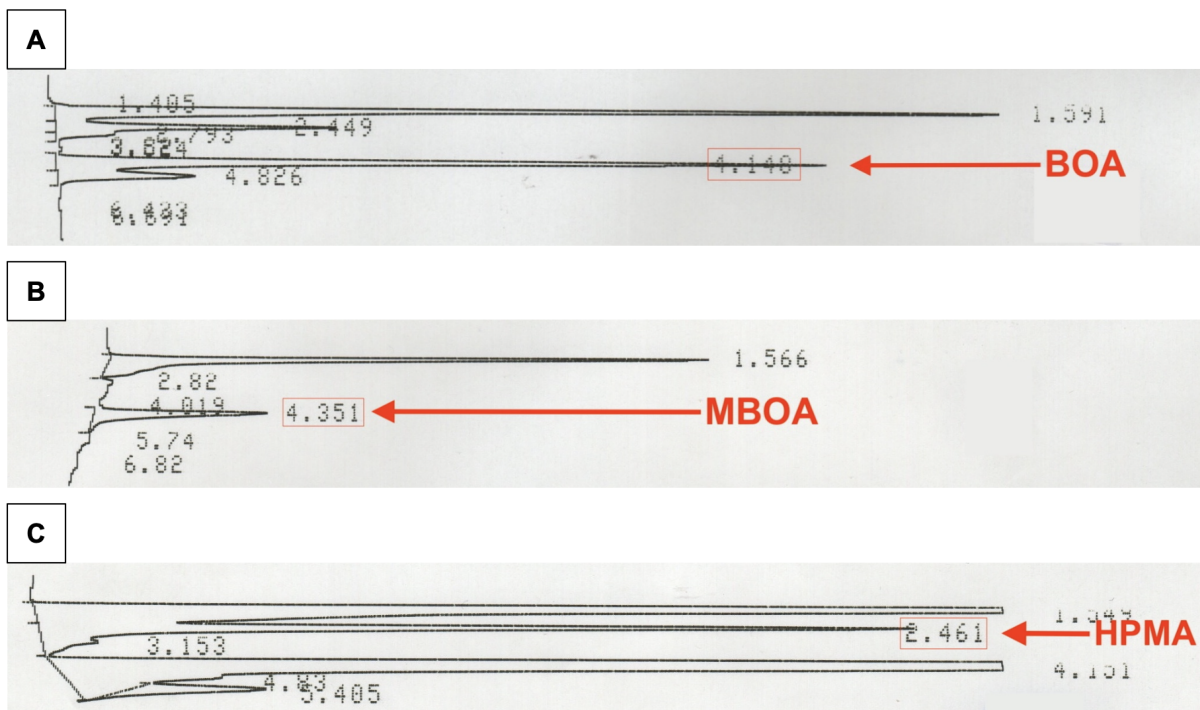


Figura 26. Cromatograma representativo de las benzoxazolinonas y de los productos de la biotransformación cuantificados por HPLC. Se muestran cromatogramas de (A) 2-BOA, (B) MBOA y (C) HPMA en la fase móvil metanol: amortiguador de fosfatos 50 : 50, cuantificados a partir de disoluciones del medio Czapek adicionado con las benzoxazolinonas, en el que se encontraba inoculado *F. verticillioides*.

Los resultados del TLC (Figura 25) se mostraron reflejados al evaluar la biotransformación de manera cuantitativa mediante HPLC (Figura 27), ya que se observó el mismo patrón en ambos experimentos. La Figura 27 muestra que la cepa más rápida en metabolizar BOA fue FQZR-76, pues a los 3 días post-inoculación ya no se detectó el compuesto. Las cepas MY5 y MY3 mostraron una cinética similar, mientras que la cepa FQH135-1 mostró un perfil claramente distinto pues después de 4 días todavía había BOA en el medio.

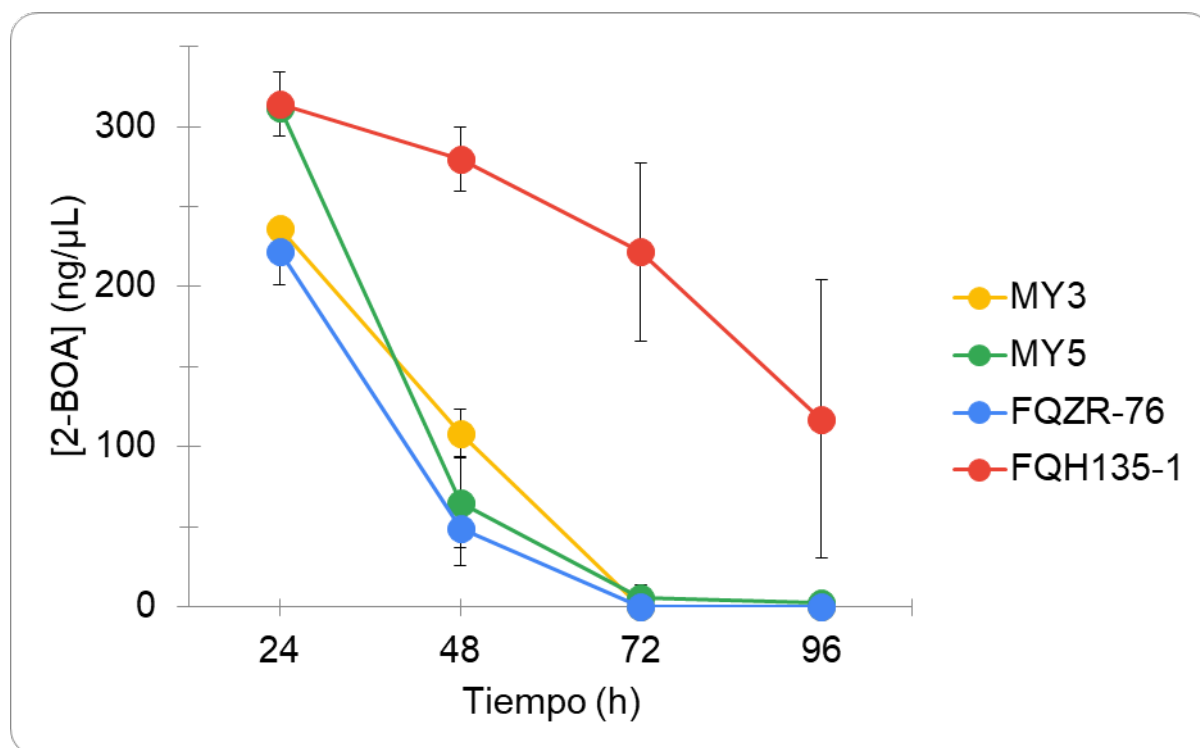


Figura 27. Biotransformación de BOA por cuatro cepas de *Fusarium verticillioides* (MY3, MY5, FQZR-76 y FQH135-1). Se muestra el valor promedio (n=3) ± DE.

3.2. Diversidad en el metabolismo de MBOA por *F. verticillioides*

El ensayo para evaluar la biotransformación de la benzoxazolinona metoxilada, mostró el mismo patrón que con BOA, FQZR-76, MY5 y MY3 fueron capaces de metabolizar por completo a MBOA a los 3 días post-inoculación y de dar a lugar a su producto de metabolización, el ácido *N*-(2-hidroxi-4-metoxifenil) malonámico (HMPMA). Mientras que la cepa FQH135-1 fue la más lenta al metabolizar MBOA, pues a los a los cuatro días posteriores a su inoculación, todavía se detectó el compuesto (Figuras 28 y 29).

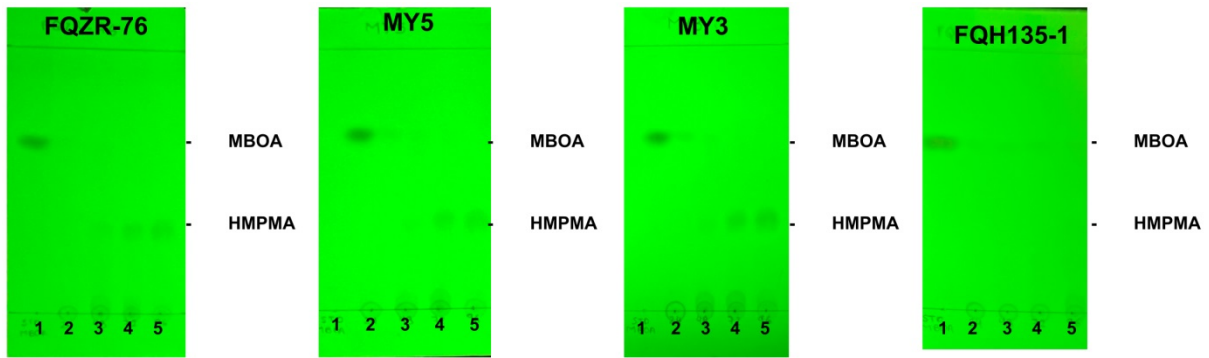


Figura 28. Evaluación de la biotransformación de MBOA por 4 cepas de *Fusarium verticillioides* (MY3, MY5, FQZR-76 y FQH135-1) mediante TLC. Con STD de MBOA (carril 1) y con muestras de 24 (carril 2), 48 (carril 3), 72 (carril 4) y 96 (carril 5) horas de incubación en medio Czapek suplementado con MBOA (0.25 mg/mL).

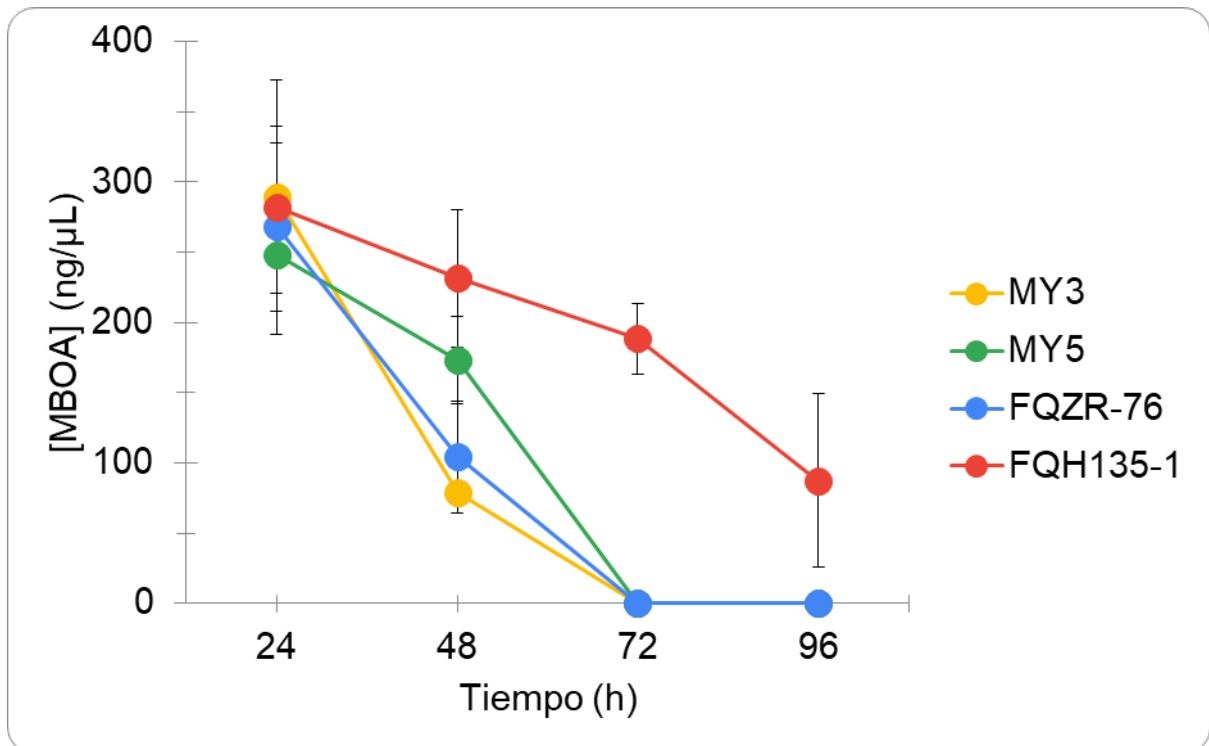


Figura 29. Biotransformación de MBOA por cuatro cepas de *Fusarium verticillioides* (MY3, MY5, FQZR-76 y FQH135-1). Se muestra el valor promedio ($n=3$) \pm DE.

4. Evaluación del HPMA como producto de la biotransformación de BOA por *Fusarium verticillioides*

La evaluación del producto acumulado purificado de la biotransformación de BOA, presuntamente HPMA, muestra que las cepas FQZR-76 y MY3 generaron el producto de transformación de manera muy eficiente y sus niveles fueron aproximadamente 3 veces mayores que para la cepa MY5 (Figura 30). En tanto, que este metabolito no se detectó en la cepa FQH135-1 a este tiempo. A las 72 h, los niveles del compuesto aumentaron y fueron similares entre las dos cepas (FQZR-76 y MY3), y ya se detectaron en la cepa FQH135-1 (Figura 31). En las dos gráficas se reporta el Área Bajo la Curva (ABC) obtenida de los cromatogramas pues fue a partir del compuesto purificado (HPMA) y no de un estándar primario.

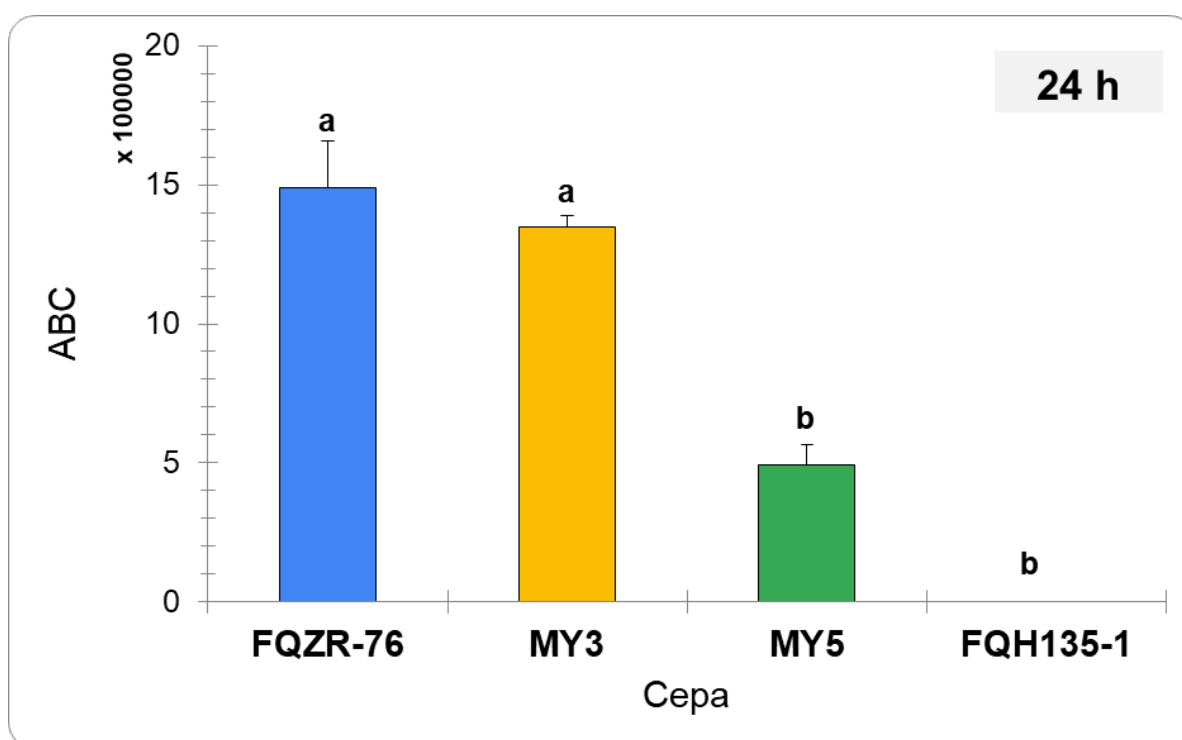


Figura 30. Evaluación a las 24 horas de la producción de HPMA por 4 cepas de *F. verticillioides*. Niveles de HPMA, reportado como Área Bajo la Curva (ABC) en muestras de 24 h de *F. verticillioides* inoculadas en medio Czapek suplementado con 0.25 mg/mL de BOA. Se muestra el valor promedio (n=3) \pm DE. Letras distintas indican diferencias estadísticas significativas entre los grupos experimentales analizados mediante una prueba T-Student pareada ($p < 0.05$).

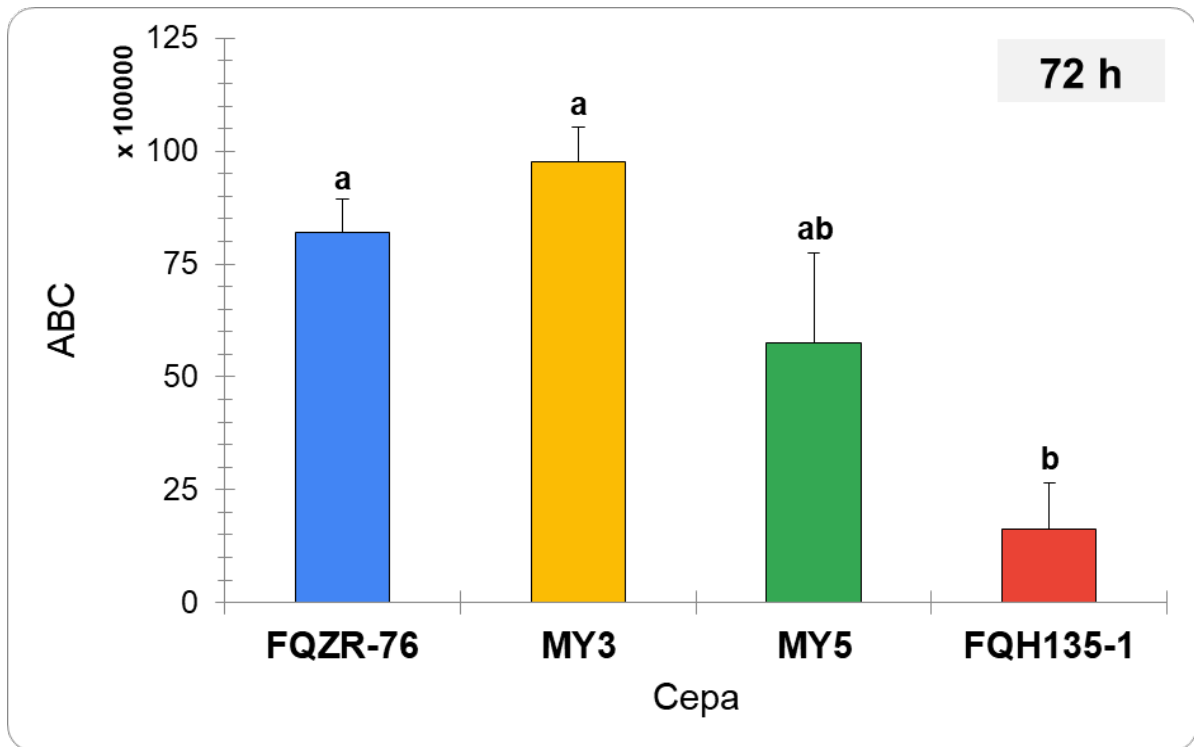


Figura 31. Evaluación a las 72 horas de la producción de HPMA por 4 cepas de *F. verticillioides*. Niveles de HPMA reportado como Área Bajo la Curva (ABC) en muestras de 72 h de *F. verticillioides* inoculadas en medio Czapek suplementado con 0.25 mg/mL de BOA. Se muestra el valor promedio (n=3) \pm DE. Letras distintas indican diferencias estadísticas significativas entre los grupos experimentales analizados mediante una prueba T-Student pareada ($p < 0.05$).

5. Efecto del 2-Aminofenol (2-AP) sobre el crecimiento radial de *Fusarium verticillioides*

Debido a que el metabolismo del BOA implica dos pasos enzimáticos, en el que se genera el intermediario 2-AP (Figura 17), que resulta más tóxico que las mismas benzoxazolinonas, se evaluó la tolerancia a este compuesto mediante ensayos de crecimiento radial en medios suplementados con concentraciones crecientes de 2-AP (0.10, 0.20 y 0.40 mg/mL).

En la Figura 32 se muestra el crecimiento de las colonias de dos cepas de *F. verticillioides* (MY3 y FQZR-76) en medio PDA 0.5X suplementando con 3 concentraciones distintas de 2-AP, donde se observa que la cepa FQZR-76 fue más tolerante al 2-AP que la cepa MY3 a las dos concentraciones menores (0.10 y 0.20 mg/mL), puesto que la concentración más alta (0.40 mg/mL) inhibió por completo el crecimiento de ambas cepas. Incluso al determinar el porcentaje de crecimiento en comparación con el control, la cepa FQZR-76 mostró que al día 8 post-inoculación, era capaz de recuperar su capacidad de crecimiento, alcanzando

aproximadamente 90 y 80 % del crecimiento del control para 0.10 mg/mL y 0.20 mg/mL de 2-AP respectivamente (Figura 34), en tanto que la cepa MY3 no lo logró, ya que al día 10 continuaba mostrando una velocidad de crecimiento disminuida, alcanzando aproximadamente un 80 y 60 % del crecimiento del control para 0.10 mg/mL y 0.20 mg/mL de 2-AP respectivamente (Figura 33).

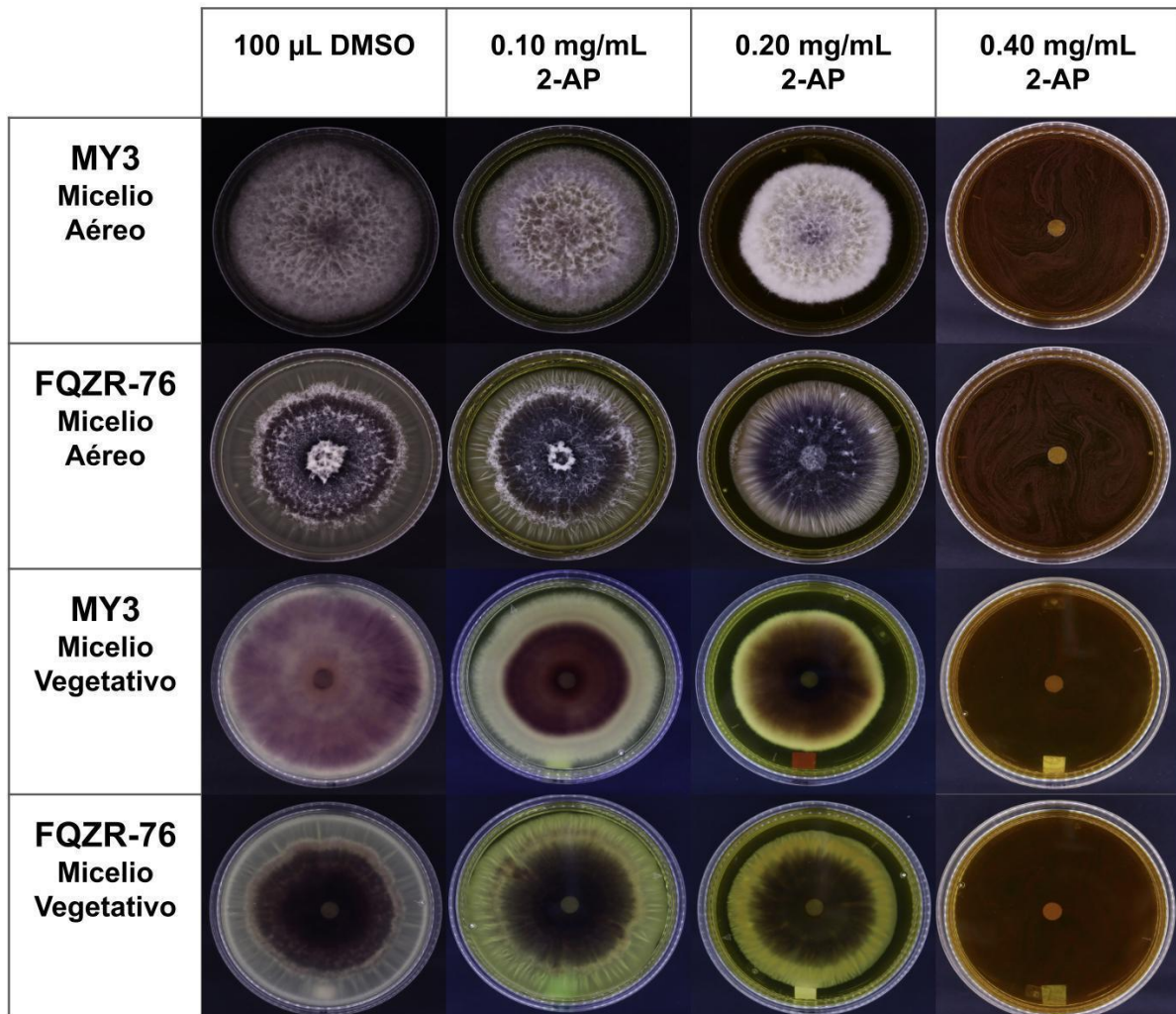


Figura 32. Crecimiento radial de dos cepas de *Fusarium verticillioides* (MY3 y FQZR-76) en medio PDA 0.5X suplementado con distintas concentraciones de 2-Aminofenol. Se muestra el micelio aéreo en las primeras dos filas y el micelio vegetativo en las dos últimas filas de cada cepa después de 11 días de crecimiento. La primera columna corresponde al control de cada cepa utilizando DMSO.

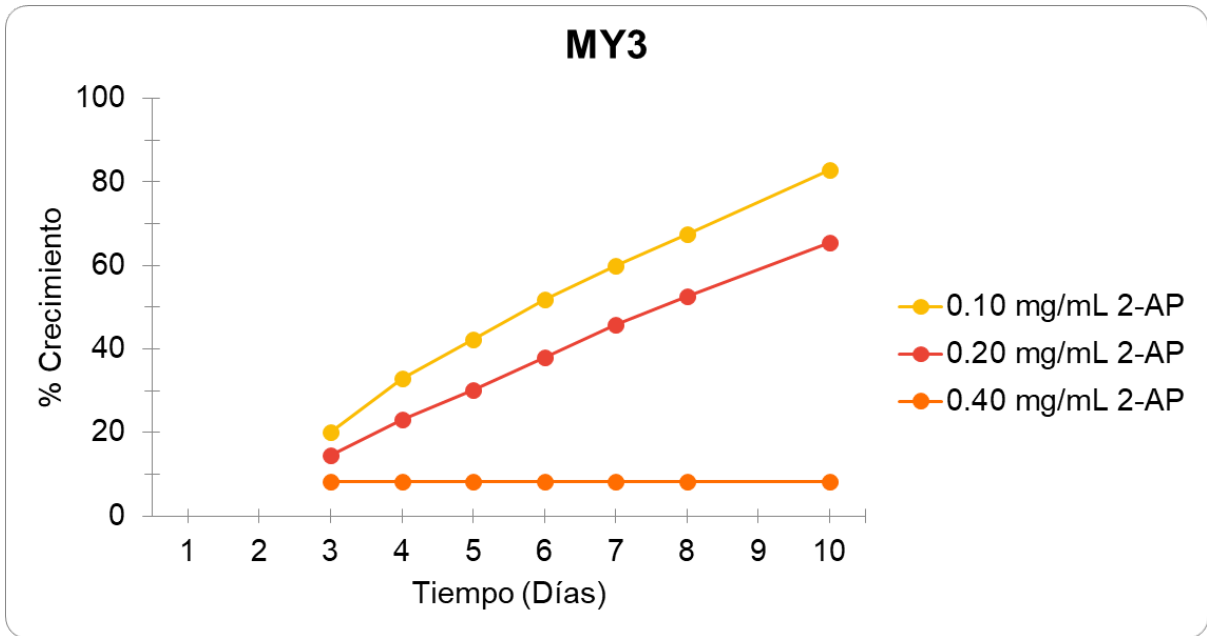


Figura 33. Efecto de concentraciones crecientes de 2-Aminofenol (2-AP) en el crecimiento radial de la cepa MY3 de *Fusarium verticillioides*. Se muestra el valor promedio (n=3) \pm DE.

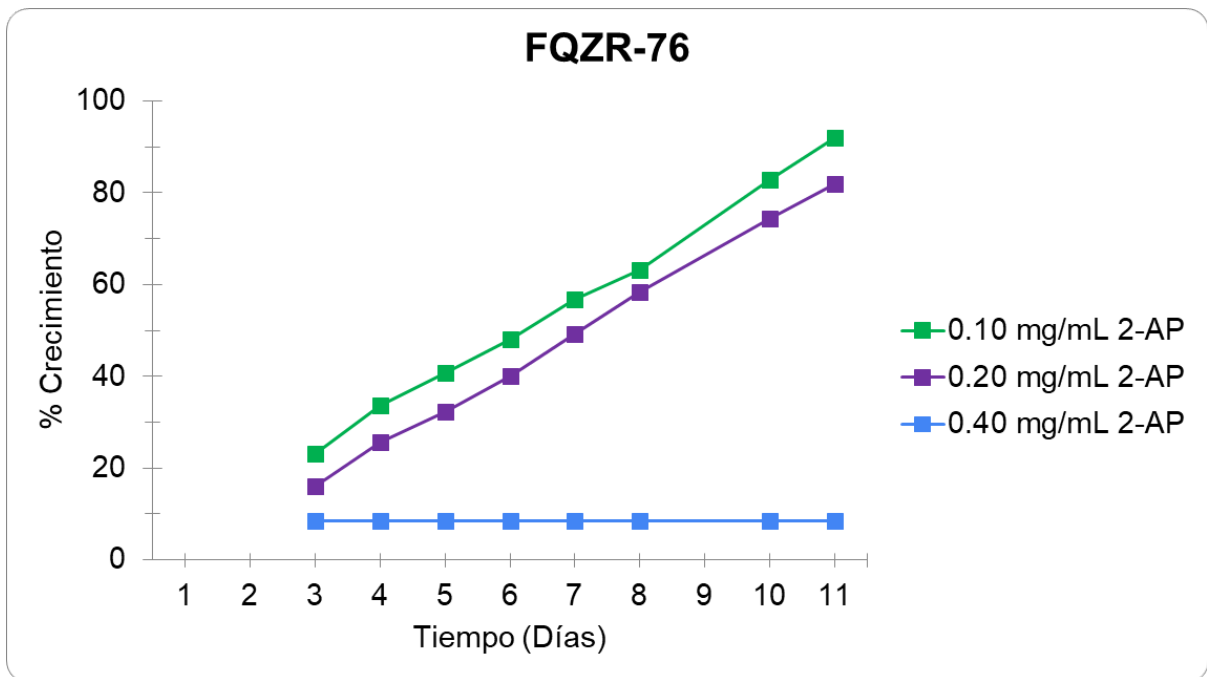


Figura 34. Efecto de concentraciones crecientes de 2-Aminofenol (2-AP) en el crecimiento radial de la cepa FQZR-76 de *Fusarium verticillioides*. Se muestra el valor promedio (n=3) \pm DE.

6. Evaluación de la capacidad de biotransformación de 2-Aminofenol (2-AP) por *Fusarium verticillioides*

La cromatografía en capa fina mostró un comportamiento diferencial entre las cepas, de las cuales FQZR-76, MY3 y MY5 fueron capaces de metabolizar a 2-AP ($R_f = 0.8$), sin embargo, para la cepa FQH135-1 todavía se detectó el compuesto en el medio hasta los 5 días post inoculación, que se veía como marcas de intensidad similar a todas las horas a las que se muestreo, indicando que no fue capaz de metabolizar a 2-AP (Figura 35). En estas cromatoplasmas, además se detectó el producto HPMA ($R_f = 0.4$), lo que indica que el 2-AP es transformado por la acción de la NAT1.

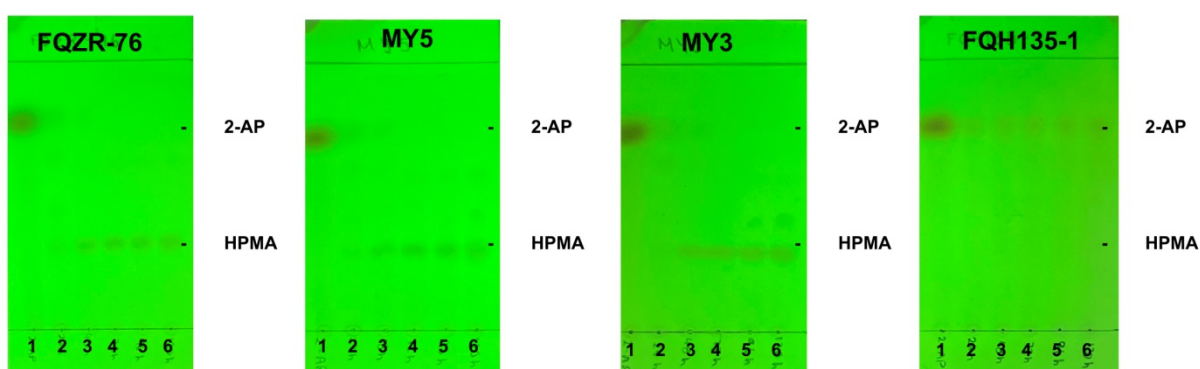


Figura 35. Evaluación de la biotransformación de 2-AP por 4 cepas de *Fusarium verticillioides* (MY3, MY5, FQZR-76 y FQH135-1) mediante TLC. Con STD de 2-AP (carril 1) y con muestras de 24 (carril 2), 48 (carril 3), 72 (carril 4), 96 (carril 5) y 120 (carril 6) horas de incubación en medio Czapek suplementado con 2-AP (0.15 mg/mL).

Para el análisis cuantitativo de esta biotransformación, mediante HPLC, se realizó una curva de calibración (ANEXO). La Figura 36 muestra un cromatograma representativo de la separación de 2-AP bajo las condiciones descritas en el apartado 8.3 de Materiales y Métodos.

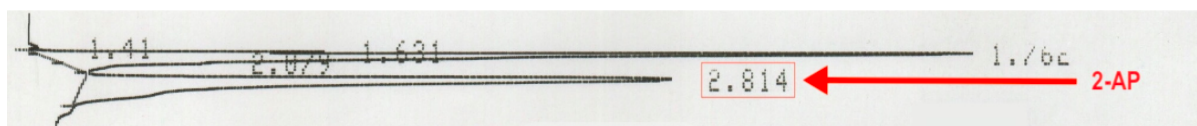


Figura 36. Cromatograma representativo 2-AP cuantificado por HPLC. Se muestran 2-AP en la fase móvil Amortiguador de fosfatos: metanol 80: 20, cuantificado a partir de una disolución del medio Czapek adicionado con las 2-aminofenol, en el que se encontraba inoculado *F. verticillioides*.

Este análisis mostró que ninguna cepa fue capaz de eliminar al compuesto por completo del medio, pero se notó que las cepas FQZR-76, MY5 y MY3, que fueron capaces de metabolizar por completo a BOA, también transformaron entre 70 y 80 % el 2-AP con el que se les inoculó. En cambio, la cepa FQH135-1 mostró un comportamiento diferente, ya que no fue capaz de metabolizar 2-AP de igual manera que el resto de las cepas. (Figura 37).

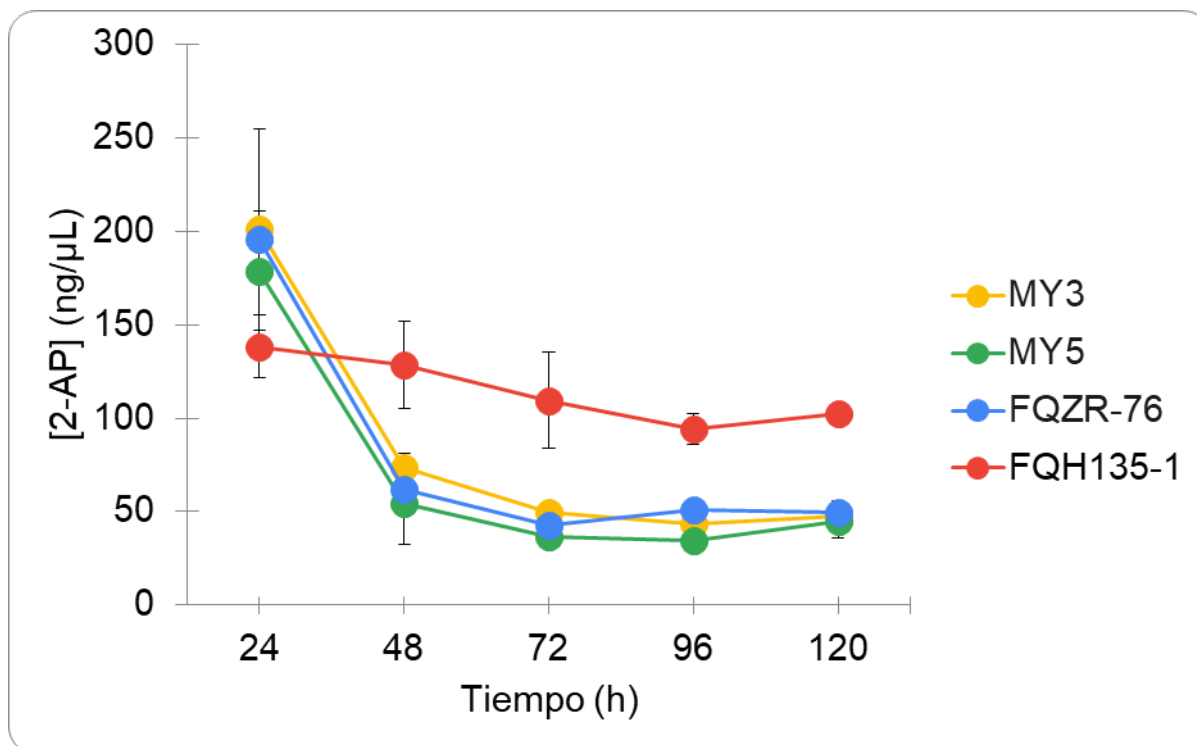


Figura 37. Biotransformación de 2-AP por cuatro cepas de *Fusarium verticillioides* (MY3, MY5, FQZR-76 y FQH135-1). Se muestra el valor promedio ($n=3$) \pm DE.

7. Efecto del ácido ferúlico sobre el metabolismo de BOA y en el crecimiento radial de *Fusarium verticillioides*

Con los resultados anteriormente presentados, se hizo la evaluación de otros factores que podrían intervenir en el metabolismo de las benzoxazolinonas en la interacción *F. verticillioides*-maíz. Se evaluó si el ácido ferúlico tenía un efecto sobre el crecimiento radial de *Fusarium verticillioides*, ya que este compuesto antioxidante está presente en el maíz y se ha documentado que es un inhibidor de la actividad de NAT (Kukongviriyapan *et al.*, 2006).

Los ensayos de crecimiento radial de la cepa MY3 en medio PDA 0.5X suplementado con BOA (0.5 mg/mL) y dos concentraciones distintas de ácido ferúlico (0.25 y 0.50 mM),

mostraron una disminución del crecimiento de las colonias con patrones muy similares (Figura 38). La Figura 39 ilustra que el porcentaje de crecimiento de la cepa MY3 si fue afectado por ambos compuestos, pero se observa un efecto aditivo entre el BOA y el FA pues se alcanzó una inhibición cercana al 50% en la condición de BOA (0.5 mg/mL) + FA (0.5 mM).

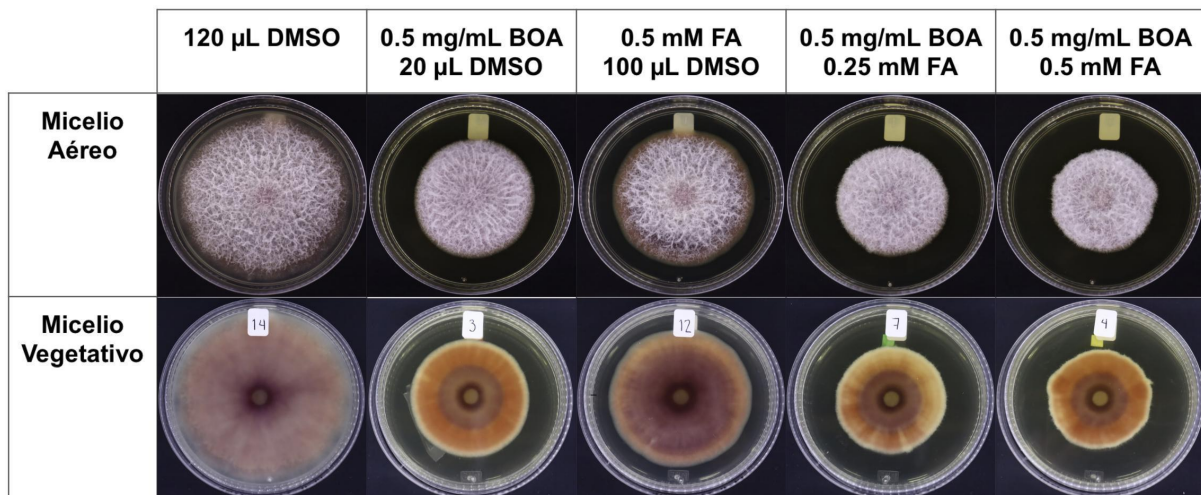


Figura 38. Crecimiento radial de la cepa MY3 de *Fusarium verticillioides* en medio PDA 0.5X suplementado con BOA y distintas concentraciones de ácido ferúlico (FA). Se muestra el micelio aéreo en la primera fila y el micelio vegetativo en la segunda fila después de 8 días de crecimiento. La primera columna muestra el control con DMSO, la segunda el control de la tolerancia a BOA, la tercera el control de la tolerancia al FA, la cuarta y quinta columna muestran el crecimiento radial de *F. verticillioides* en medio suplementado con 0.5 mg/mL de BOA y 0.25 y 0.5 mM de ácido ferúlico respectivamente.

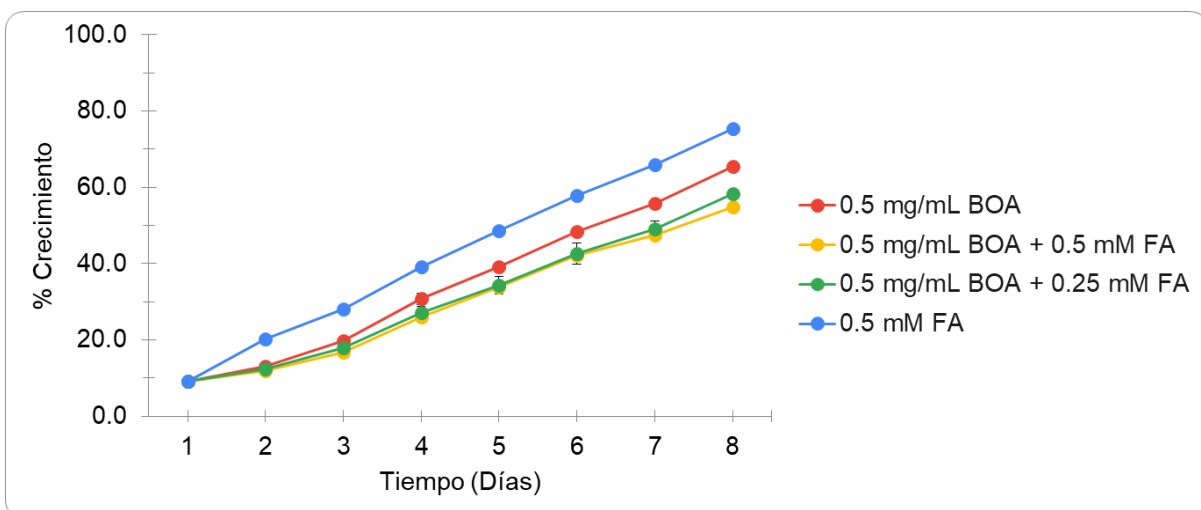


Figura 39. Efecto del ácido ferúlico (FA) en el crecimiento radial de la cepa MY3 de *Fusarium verticillioides*. Se muestra el valor promedio (n=3) \pm DE.

Para determinar el efecto del FA sobre el metabolismo del BOA, se replicó el experimento en medio líquido y se cuantificó su biotransformación por HPLC. Se observa que la concentración más alta, de 2 mM de FA, causó una inhibición de la biotransformación de BOA de aproximadamente el 40% mientras que la concentración de 1 mM de FA aproximadamente del 30%, ya que al cuantificar para ambos casos se vió una mayor concentración de BOA (Figura 40).

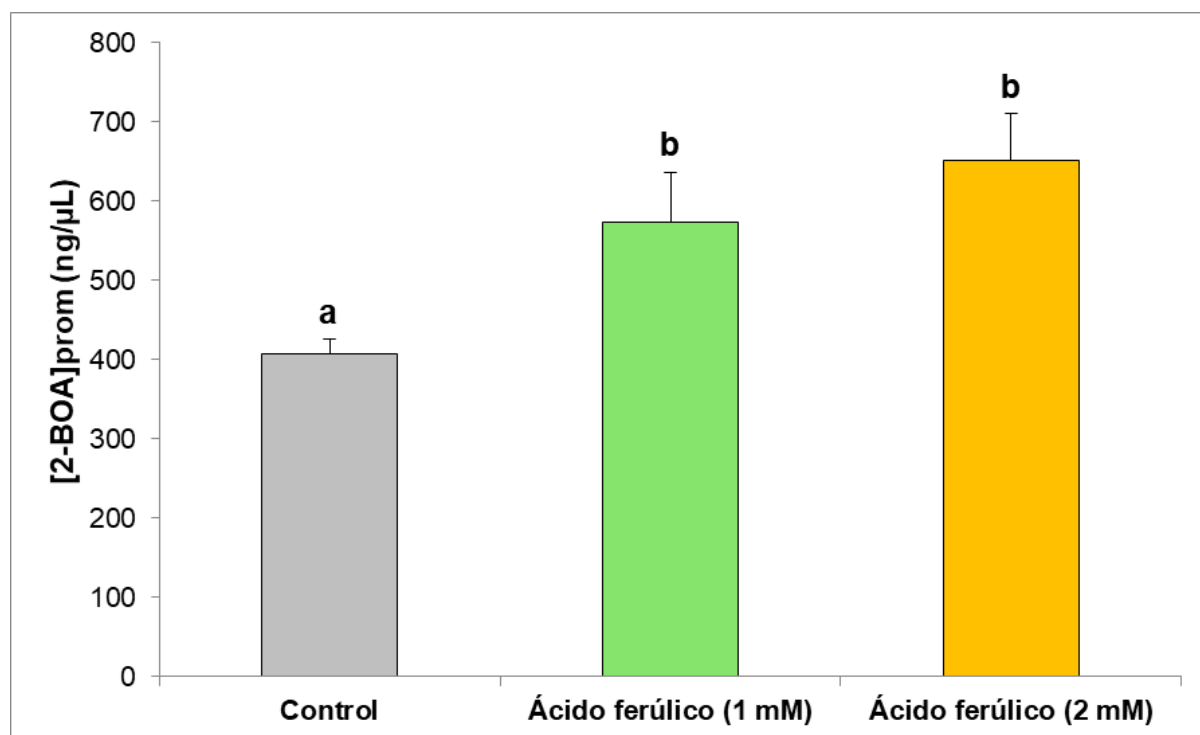


Figura 40. Efecto del ácido ferúlico en biotransformación de 2-BOA por *Fusarium verticillioides* (MY3). Se muestra el valor promedio ($n=3$) \pm DE. Para el control se muestra la concentración de 2-BOA después de 72 h de ser inoculado con *F. verticillioides* en medio Czapek y para el resto de las barras se muestran la concentración de 2-BOA bajo las condiciones antes mencionadas con la adición de ácido ferúlico (1 mM y 2 mM). Letras distintas indican diferencias estadísticas significativas entre los grupos experimentales analizados mediante una prueba T-Student pareada ($p < 0.05$).

8. Ensayo de infección de raíces de maíz por *Fusarium verticillioides* y evaluación de la producción de benzoxazolinonas

Las raíces de las plántulas inoculadas por 24 h con las cuatro cepas de *F. verticillioides* (Sección 10.2 del apartado de Materiales y Métodos) mostraron síntomas de la infección,

característica de tizón de la plántula, ya que algunas raíces primarias presentaron una coloración café (Figura 41).

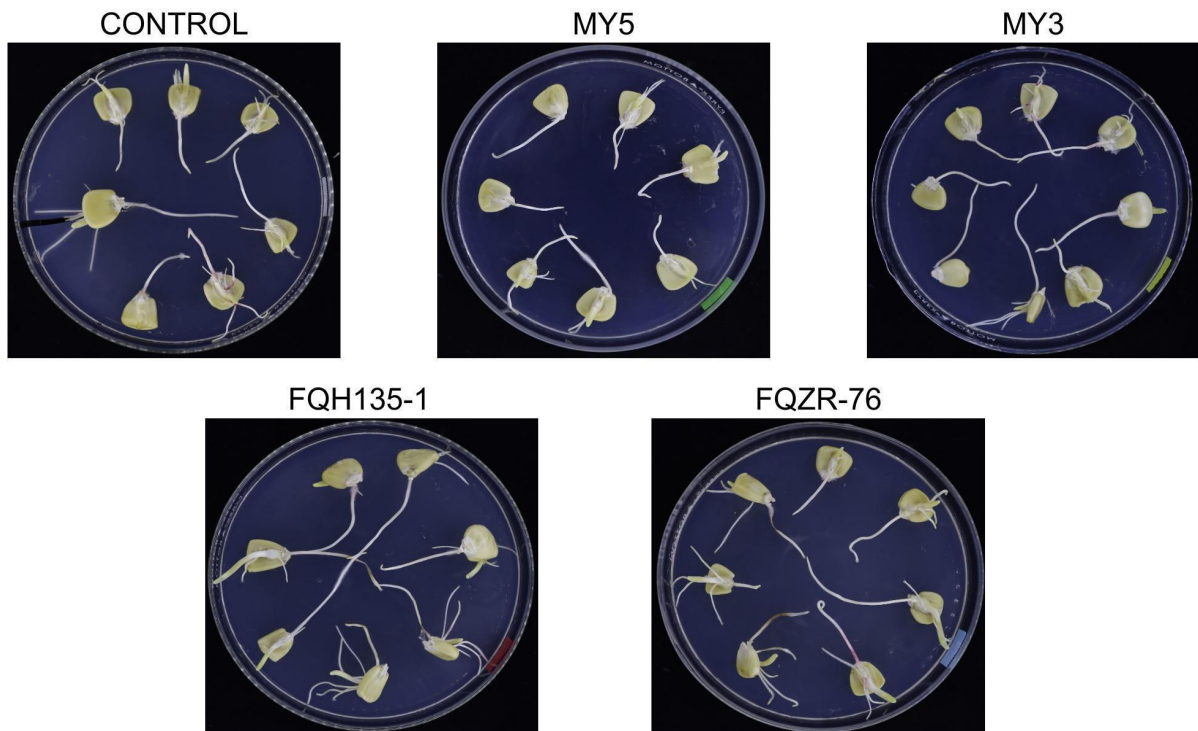


Figura 41. Infección de raíces con *Fusarium verticillioides* en agar 1.2 %. Se observan las raíces control sin infectar y raíces infectadas por 4 cepas distintas (MY5, MY3, FQH135-1 y FQZR-76).

La tinción histoquímica de benzoxazinoides (Figura 42), muestra las raíces primarias control e infectadas antes y después de la tinción. El control exhibió la presencia de benzoxazinoides únicamente en la punta de la raíz; la cepa MY5 provocó acumulación de benzoxazinoides en la punta de la raíz, mientras que la cepa MY3 causó su acumulación a lo largo de la raíz. En contraste, las cepas FQH135-1 y FQZR-76 muestran daños ya en la raíz primaria antes de la tinción y posterior a esta manifiestan la presencia de una cantidad mayor de benzoxazinoides reflejada en una mayor coloración en la zona afectada.

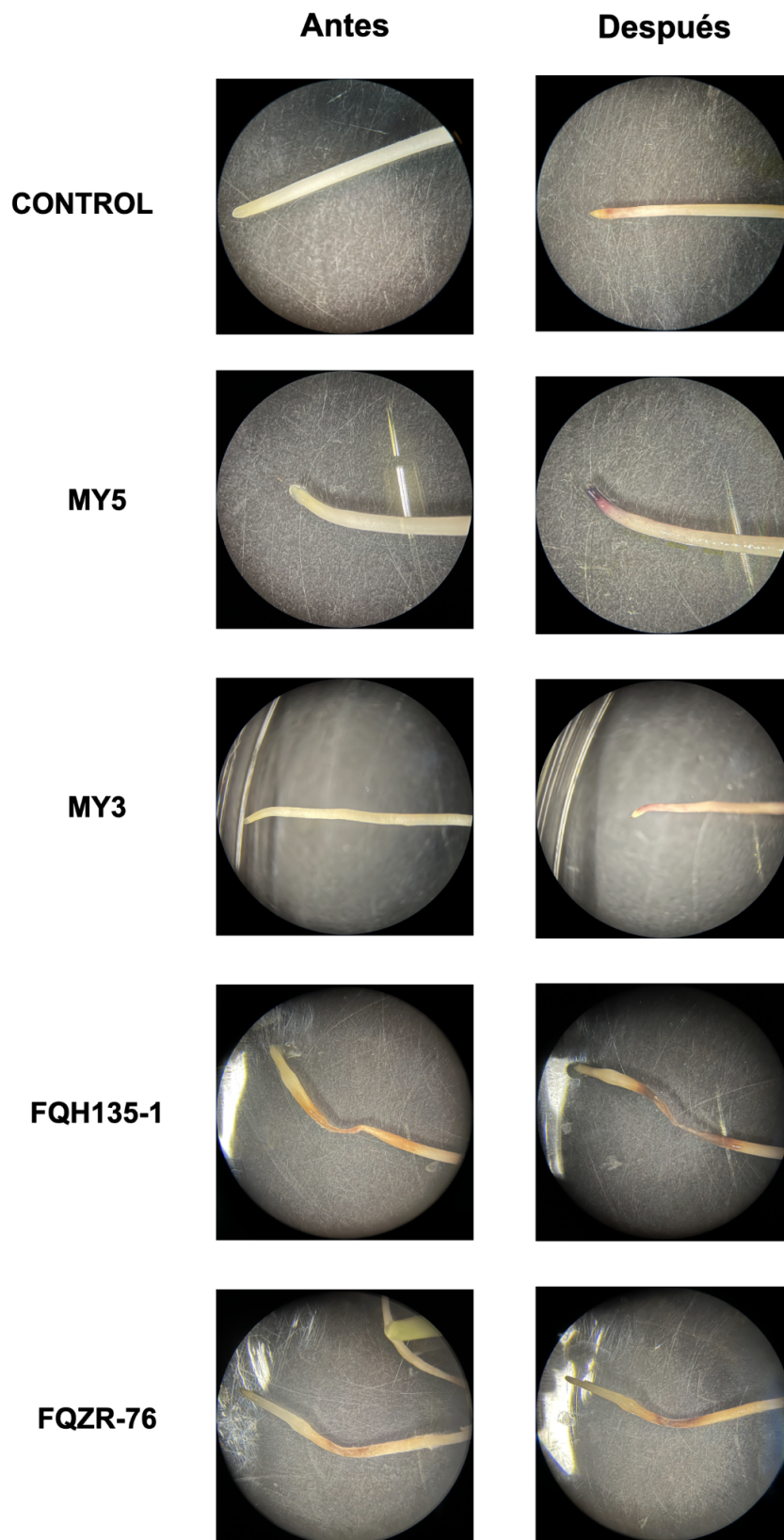


Figura 42. Tinción de benzoxazinoides en raíces primarias de maíz infectadas con *Fusarium verticillioides* (MY5, MY3, FQZR-76 y FQH135-1). En cada panel se muestra de lado izquierdo una fotografía de la raíz antes de la tinción histoquímica y de lado derecho una fotografía posterior a la tinción.

IX. DISCUSIÓN

En este trabajo se encontró que existe diversidad en la habilidad de detoxificar las benzoxazolinonas, MBOA, 2-BOA, así como también a su intermediario 2-AP, entre cepas de *Fusarium verticillioides* (MY3, MY5, FQZR-76 y FQH135-1) que difieren en agresividad y en capacidad de producción de fumonisinas. Asimismo, se aportaron evidencias preliminares sobre el potencial del ácido ferúlico, para interferir en la biotransformación de BOA por *F. verticillioides*.

1. Análisis bioinformático del gen *NAT1*

Se identificó el gen que codifica a la enzima *NAT1* (arilamina-*N*-aciltransferasa) en el locus *FDB2* del cromosoma 3 de *Fusarium verticillioides*, que agrega un grupo malonilo al intermediario 2-aminofenol, para producir el ácido *N*-(2-hidroxifenil) malonámico, compuesto no tóxico.

El MSA de especies pertenecientes al género *Fusarium spp.* mostró una mayor cantidad de aminoácidos conservados a lo largo de la alineación de la proteína *NAT1*. Esta homología entre las especies nos brinda información sobre la importancia de la función del gen *NAT1* para *Fusarium spp.* Además de esta observación, se vieron residuos de aminoácidos clave conservados a lo largo de las secuencias, que incluían a la tríada catalítica del sitio activo de esta enzima (Cys, His y Asp) (Sinclair *et al.*, 2000), esto tanto para especies de *Fusarium spp.* y de otros hongos no pertenecientes a este género.

En cuanto a lo obtenido a partir del análisis filogenético, se puede notar que ambos conjuntos de secuencias muestran cambios que indican que a lo largo del tiempo hubo eventos de especiación que involucraron mutaciones en las secuencias. Las especies del género *Fusarium spp.* muestran que estos homólogos presentan un estado derivado (apomorfía) donde las mutaciones se fueron adquiriendo a lo largo de la rama indicando que comparten ancestros en común que son más recientes, mientras que los hongos de géneros distintos a *Fusarium spp.* muestran homoplasia debido a que hubo evolución paralela, donde algún carácter pudo evolucionar de manera independiente a lo largo de ramas distintas del árbol que pueden no estar directamente relacionadas a partir del mismo estado ancestral.

2. Análisis de la presencia del gen *NAT1* en las cepas de *Fusarium verticillioides*

El gen *NAT1* se encontró de todas las cepas utilizadas de *F. verticillioides*. Donde inicialmente la cepa FQZR-76 no mostró ninguna banda producto de la PCR del gen *NAT1*/DNA extraído, pero después de realizar otra extracción de DNA de las cepas MY3, MY5, FQZR-76 y FQH135-1, sí se amplificó el gen en la cepa en la cual no se había visto en el ensayo anterior, aunque no en la cepa FQH135-1 en la que anteriormente sí se había amplificado. Estos resultados variados dentro de las mismas cepas pudieron ser causados por la calidad del DNA obtenido, ya que en la primera extracción el DNA estaba contaminado con RNA y en la segunda extracción la cantidad de DNA de la cepa FQH135-1 fue menor.

Estos resultados confirmaron que el gen estaba presente en estas 10 cepas, y concuerdan con los resultados obtenidos por Glenn & Bacon en 2009, que reportan la obtención de amplicones de 673 pb, y las bandas observadas se encontraban entre 600 y 700 pb, lo que se puede ver con mayor claridad en la Figura 23B.

3. Capacidad de biotransformación de BOA y MBOA por *Fusarium verticillioides*

De acuerdo con lo observado en el ensayo preliminar de la biotransformación de BOA se seleccionaron las cepas MY3, MY5, FQZR-76 y FQH135-1, ya que también se conocía que diferían en su agresividad en ensayos con plántulas de maíz y en la producción de la toxina fumonisina B1, que es un factor de virulencia del hongo (Galena-Sánchez, 2014).

Al evaluar si existían diferencias en la tolerancia y metabolismo de BOA (2-benzoxazolinona) y MBOA (6-metoxi-2-benzoxazolinona) entre cuatro cepas de *F. verticillioides* aisladas de mazorcas de maíz (MY3, MY5, FQZR-76 y FQH135-1), se encontró que hay diversidad entre las cuatro cepas, donde todas manifestaron la capacidad de tolerar y metabolizar las benzoxazolinonas con distintas tasas. La cepa FQZR-76 mostró ser la cepa más eficiente en transformar el compuesto, mientras que las cepas MY3 y MY5 mostraron patrones similares, logrando biotransformar a BOA y MBOA en ácido *N*-(2-hidroxifenil) malonámico (HPMA) y ácido *N*-(2-hidroxi-4-metoxifenil) malonámico (HMPMA) tres días post-inoculación. En contraste, la cepa FQH135-1, fue la más lenta al metabolizar las benzoxazolinonas, pues a los cuatro días posteriores a su inoculación, todavía se detectaron los compuestos. Estos resultados son consistentes con otros estudios que muestran que varias especies de *Fusarium spp.* asociadas con el maíz o con otros cereales

que producen benzoxazinoides, presentan una tolerancia entre moderada a significativa a BOA y MBOA (0.25 a 1.00 mg/mL), de las cuales *F. verticillioides* es la especie de este género que presenta un mayor nivel de tolerancia, lo que puede aumentar su virulencia y estar asociada con su patogenicidad (Glenn *et al.* 2001; Saunders & Kohn, 2008).

Lo observado en la cepa FQZR-76 en este ensayo denota una diferencia en su comportamiento que hace cuestionar cómo se da su capacidad de biotransformar las benzoxazolinonas de manera más eficiente que el resto de las cepas y que podría ser resultado de una actividad de *NAT1* distinta al resto de las cepas.

4. Evaluación de HPMA como producto de la biotransformación de BOA por *Fusarium verticillioides*

Los resultados obtenidos concuerdan con lo observado al cuantificar BOA, ya que se vio que la cepa FQH135-1 a las 24 horas fue incapaz de producir HPMA y después de 72 horas fue la cepa que produjo este compuesto en menor cantidad, que corresponde con el comportamiento exhibido al cuantificar la 2-benzoxazolinona, ya que esta cepa se mostró como la más lenta metabolizando. Las 3 cepas restantes, FQZR-76, MY3 y MY5, fueron capaces de producir HPMA desde las 24 horas. A las 72 horas las cepas FQZR-76, MY3 y MY5 aumentaron la cantidad de HPMA producido, alcanzando aproximadamente entre un 400% y un 600% de lo cuantificado a las 24 horas. A las 72 horas se puede observar que la cepa MY3 fue la que metabolizó y generó una mayor cantidad de HPMA, esto se podría deber a que esta cepa tiene una tasa de crecimiento más rápido que el resto de las cepas por lo que fue capaz de metabolizar la misma cantidad BOA en un menor tiempo.

5. Efecto del 2-Aminofenol (2-AP) sobre el crecimiento radial de *Fusarium verticillioides*

El metabolismo del BOA implica dos pasos enzimáticos que dan a lugar a la generación del intermediario de detoxificación, 2-AP que se transforma mediante la adición de un grupo malonilo para producir HPMA, por la *NAT1* (N-aciltransferasa especial, una N-malonitransferasa) codificada en el locus *FDB2* (Glenn *et al.*, 2003). Ya que el 2-aminofenol tiene una mayor toxicidad que las benzoxazolinonas (Martyniuk *et al.*, 2006), se evaluó la tolerancia a este compuesto.

Los resultados mostraron que *F. verticillioides* es capaz de tolerar al intermediario tóxico 2-aminofenol y se observaron diferencias entre las cepas de esta especie al hacerlo, ya que la cepa FQZR-76 fue más tolerante al 2-AP que la cepa MY3, que fueron las dos cepas que se probaron, incluso FQZR-76 manifestó la capacidad de poder recuperar su capacidad de

crecimiento después de 8 días casi llegando al 100 % del crecimiento en comparación con el control a la concentración más baja utilizada de 2-AP (0.10 mg/mL), lo que nos podría sugerir que fue capaz de metabolizar por completo el 2-AP presente en el medio, que en días anteriores podrían haber estado inhibiendo su crecimiento. La cepa MY3 también fue capaz de crecer en el medio pero su tasa de crecimiento disminuyó. También es importante mencionar que la concentración más alta (0.4 mg/mL 2-AP equivalente a ~ 3.7 mM) inhibió por completo el crecimiento de *F. verticillioides* (FQZR-76 y MY3), mientras que la concentración de BOA utilizada en los ensayos de crecimiento radial (0.5 mg/mL BOA equivalente a ~ 3.7 mM) no dio a lugar al mismo efecto sobre el crecimiento de *F. verticillioides*. Haciendo una comparación de las concentraciones utilizadas de 2-AP (0.4 mg/mL ~ 3.7 mM) y de BOA (0.5 mg/mL ~ 3.7 mM), y analizando que es una concentración más baja en comparación con las concentraciones de BOA que se han utilizado y probado en otros estudios de tolerancia que incluso llegan hasta 1.10 mg/mL (~ 8.1 mM) (Saunders & Kohn, 2008), se determinó que el 2-aminofenol presenta una mayor toxicidad en comparación con las benzoxazolinonas.

Los resultados obtenidos para la cepa FQZR-76 sobre su capacidad para tolerar a 2-AP podrían estar apuntando nuevamente a una diferencia en cuanto a su actividad de *NAT1*, sugiriendo que esta cepa tiene una mayor actividad enzimática por parte de la arilamina *N*-aciltransferasa, ya que esta enzima es la que está directamente involucrada en la transformación de 2-AP a HPMA. Algunos estudios han mostrado que esta actividad distinta de *NAT1* en *F. verticillioides*, tiene afinidad por el sustrato donador malonil-CoA, ya que presenta una mayor actividad que con el acetil-CoA y propionil-CoA, y esta actividad está atribuida a la forma dimérica de la enzima homóloga (GIBMO)*NAT1* (Karagianni, *et al.*, 2022). Además se ha determinado que esta isoenzima, la *N*-maloniltransferasa, de *F. verticillioides* ha evolucionado de manera selectiva para utilizar malonil-CoA en lugar de acetil-CoA, ya que la dimerización cambia el sitio catalítico permitiendo que el malonil-CoA pueda alcanzarlo a través de la única entrada expuesta (Karagianni, *et al.*, 2022).

6. Capacidad de biotransformación de 2-Aminofenol (2-AP) por *Fusarium verticillioides*

Los resultados obtenidos al evaluar, mediante TLC y HPLC, la capacidad de biotransformación del 2-aminofenol fueron similares a los de las benzoxazolinonas, donde igualmente la cepa FQZR-76 mostró ser la más eficiente para biotransformar este compuesto, mientras que la cepa FQH135-1 fue incapaz de hacerlo de la misma manera que el resto de las cepas probadas, disminuyendo la cantidad de 2-AP presente en el medio

de manera más lenta y sin mostrar cambios significativos en los 5 días posteriores a la inoculación.

La cuantificación del 2-aminofenol por HPLC mostró un ligero aumento no significativo entre las 96 y 120 horas, y de igual manera las muestras presentaron una mayor coloración al pasar el tiempo. Lo observado y obtenido de la cuantificación no indica que la cantidad de 2-AP está aumentando, sino que probablemente se están formando otros productos de transformación del 2-AP que interfieren con la cuantificación. Esto puede deberse a que el 2-aminofenol puede experimentar dimerización oxidativa espontánea, que genera el compuesto 2-amino-3H-fenoxazin-3-ona (2-APO), que tiene una coloración roja, así como también puede generar otro producto de detoxificación, menos común, que es el *N*-(2-hidroxifenil)acetamida (HPAA), resultado de mutantes *FDB1/fdb2* donde 2-AP únicamente se acetila (Figura 43) (Glenn *et al.*, 2003; Glenn & Bacon, 2009).

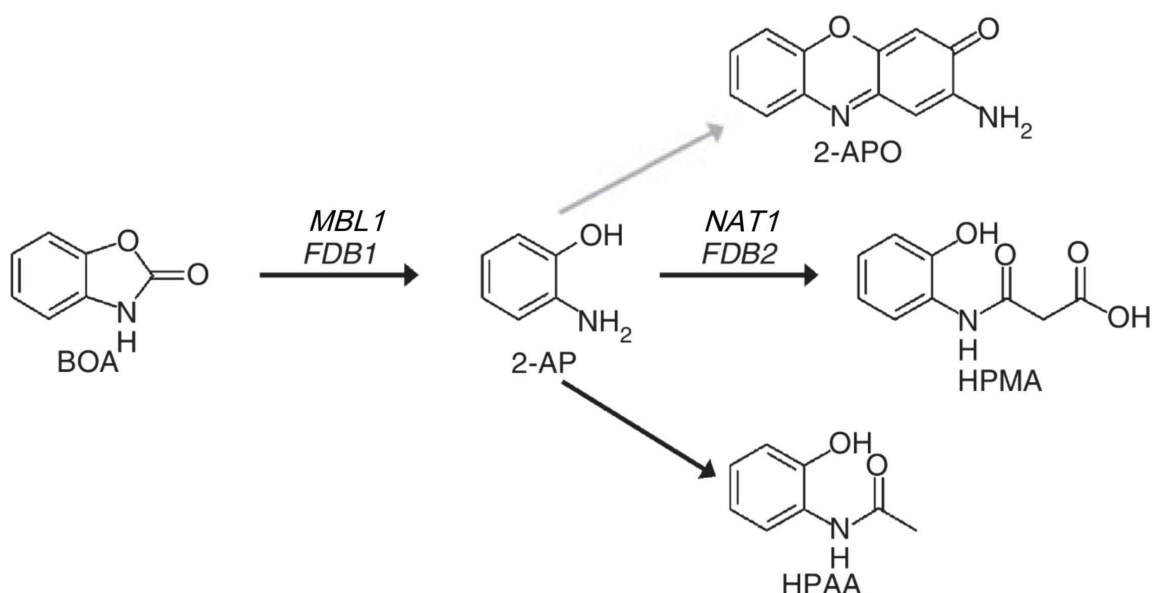


Figura 43. Biotransformación de las benzoxazolinonas por *Fusarium verticillioides* en varios metabolitos. La flecha gris indica una dimerización oxidativa no enzimática del 2-AP (2-aminofenol) que da a lugar a la 2-amino-3H-fenoxazin-3-ona (2-APO); la otra flecha de la vía de biotransformación de 2-AP en su mayoría es resultado de cepas mutantes de *fdb2*, que acumulan *N*-(2-hidroxifenil)acetamida (HPAA) por la acetilación de 2-AP (2-aminofenol). Adaptada de Glenn & Bacon, 2009.

Lo anteriormente mencionado concuerda tanto para los resultados de la cuantificación de 2-AP como para los obtenidos del TLC; ya que para la cepa FQH135-1 que se encontraba inoculada en medio Czapek, se vio que hubo un aumento en la coloración del medio, pasando a un color anaranjado intenso cuando inicialmente era amarillo, por lo que el 2-AP

del medio pudo haberse oxidado generando 2-APO que también pudo haber afectado la cuantificación de 2-AP en los últimos tiempos analizados. Al analizar las cromatoplasmas también se puede ver en éstas la aparición de otros compuestos entre el HPMA y el 2-AP, que podría ser el mismo 2-APO que se pudo generar en el medio debido a que el 2-AP no se metabolizó por completo, con excepción de la cepa FQZR-76 que no muestra presencia de otro compuesto en el medio además del HPMA y el 2-AP.

7. Efecto del ácido ferúlico sobre el metabolismo de BOA y en el crecimiento radial de *Fusarium verticillioides*

Con los resultados obtenidos hasta este punto, se evaluó otro factor que podría intervenir en el metabolismo de las benzoxazolinonas con relación a la interacción *Fusarium verticillioides* - maíz, que fue el efecto de un compuesto fenólico presente en los granos de maíz, el ácido ferúlico (ácido 4-hidroxi-3-metoxicinámico). Este compuesto presente principalmente en la pared celular de la semilla de maíz es especialmente relevante porque es el fitoquímico antioxidante que se presenta de manera mayoritaria en el maíz comparando con otros cereales (Hussain *et al.*, 2021).

Los ensayos de crecimiento radial realizados con la cepa MY3 en medio suplementado con BOA y FA mostraron que el ácido ferúlico en combinación con la benzoxazolinona utilizada, tiene mayor capacidad de inhibir el crecimiento que en los casos en los que se utilizaron estos compuestos por separado. Asimismo, al realizar el análisis por TLC y la cuantificación de BOA por HPLC, se vio que al aumentar la concentración de FA había una mayor acumulación de BOA y por lo tanto una menor capacidad de metabolizar a BOA. Esto nos podría estar indicando que *Fusarium verticillioides* podría estar sufriendo una inhibición en su capacidad de biotransformar el BOA por el ácido ferúlico, mostrando así una disminución en su porcentaje de crecimiento debido a que la benzoxazolinona, que tiene actividad antifúngica, se queda en el medio por más tiempo.

Estos resultados se relacionaron con un estudio donde se evaluó la actividad de la arilamina *N*-acetiltransferasa de hígado humano, que es inhibida por varios compuestos fenólicos, entre éstos se encontraba el ácido ferúlico. Se observó que es capaz de inhibir la actividad de la *NAT1* probada, aproximadamente en un 30 % cuando se utilizó con una concentración de 1000 µM (1 mM) (Kukongviriyapan *et al.*, 2006).

Esto sugiere que se podría estar inhibiendo la enzima *NAT1* de *F. verticillioides*, ya que se observó que se presentaba una inhibición de la capacidad de biotransformar a esta benzoxazolinona por parte de la cepa MY3, por lo que haría falta realizar más estudios que

impliquen a esta enzima únicamente, como evaluar si el FA afecta el paso del intermediario 2-AP, que es afectado por la *NAT1* de *F. verticillioides*, a HPMA.

8. Infección de raíces de maíz por *Fusarium verticillioides* y producción de benzoxazolinonas

La liberación de moléculas de defensa en la superficie de la raíz primaria de semillas de maíz fue visible al realizar este ensayo preliminar de infección de raíces de maíz por *F. verticillioides* durante la etapa temprana post-germinación y establecimiento de la plántula.

El control mostró presencia de benzoxazinoideos en la punta de la raíz, que es algo que se esperaba, ya que se conoce que en el desarrollo normal de la planta los tejidos más jóvenes presentan mayor abundancia de estos compuestos de defensa para protegerse (Agrios, 2005). Por otra parte, las raíces que fueron inoculadas con suspensiones de conidias de distintas cepas de *F. verticillioides* mostraron resultados variables, todas hicieron notar con ayuda de la tinción con FeCl_3 que los benzoxazinoideos estaban presentes, ya que con estos se forman complejos coloridos. Sin embargo, las cepas MY3 y MY5 no mostraron síntomas de la infección, ni tampoco una diferencia muy notable en cuanto a la producción de benzoxazinoideos con respecto al control; mientras que las cepas FQH135-1 y FQZR-76 mostraron ser más virulentas manifestando síntomas de infección por *F. verticillioides* en las raíces primarias bajo las mismas condiciones que las cepas mencionadas anteriormente. Además, para estas cepas (FQH135-1 y FQZR-76) la tinción exhibió que hubo una mayor producción de benzoxazinoideos que puede notarse por la coloración más oscura a lo largo de la raíz primaria.

Esta tinción histoquímica no es específica ya que el Fe(III) forma complejos con ácidos hidroxámicos, lo que hace imposible el distinguir si únicamente se trata de las benzoxazolinonas, aunque probablemente están reaccionando otros compuestos como DIMBOA y DIBOA que se encuentran en mayor cantidad en maíz (Saunders & Kohn, 2008).

Las condiciones de realización de este ensayo preliminar se podrían mejorar para que no quede únicamente como un ensayo cualitativo y se puedan hacer análisis posteriores para caracterizar mejor la interacción *F. verticillioides*-maíz en la producción de benzoxazolinonas.

X. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

1. Conclusiones

Se determinó que existe diversidad por parte de *Fusarium verticillioides* en la capacidad de tolerancia y de biotransformación de los compuestos de defensa constitutivos del maíz, las benzoxazolinonas BOA y MBOA, ya que se encontraron diferencias entre las cepas MY3, MY5, FQZR-76 y FQH135-1.

- El gen *NAT1* se puede encontrar tanto en hongos pertenecientes al género *Fusarium spp.* como en hongos distintos a éstos, puesto que se identificaron homólogos al realizar un análisis filogenético.
- Asimismo, el gen *NAT1* implicado en la tolerancia y detoxificación de benzoxazolinonas, se encontró en 10 cepas de *Fusarium verticillioides*. De las cuales se encontraron resultados diversos al evaluar la capacidad de tolerar y metabolizar benzoxazolinonas, así como también a su intermediario que es aún más tóxico, el 2-AP.
- Entre las cepas utilizadas se identificó a una cepa más eficiente, con alta capacidad de metabolizar las benzoxazolinonas, BOA y MBOA, y de igual manera al intermediario enzimático 2-AP, que fue la cepa FQZR-76.
- La evaluación del HPMA como producto no tóxico de la biotransformación de BOA mostró la capacidad de las cepas MY3, MY5 y FQZR-76 de generar este compuesto a una tasa más rápida que la cepa FQH135-1, similar a los resultados mencionados anteriormente.
- El ácido ferúlico, compuesto presente en los granos de maíz, presentó un efecto inhibitorio sobre la biotransformación de la benzoxazolinona antifúngica, BOA, en la cepa MY3, provocando una acumulación de BOA y disminuyendo su crecimiento.
- En cuanto a la evaluación de producción de benzoxazolinonas mediante un ensayo preliminar de infección de raíces primarias de maíz por *Fusarium verticillioides*, se determinó que hubo presencia de benzoxazinoïdes en plántulas de maíz e igualmente se puede señalar que hubo un incremento en la producción únicamente a causa de la infección por parte de las cepas FQZR-76 y FQH135-1 de *F. verticillioides*.

2. Perspectivas

Los resultados obtenidos en este trabajo dan pauta a continuar un estudio más extenso sobre la capacidad de metabolizar benzoxazolinonas entre cepas de *F. verticillioides*, que sería un objetivo importante para determinar su asociación con la agresividad del patógeno. De igual forma continuar con la caracterización del gen *NAT1* de la cepa FQZR-76 ayudaría a complementar los experimentos realizados y entender de una mejor manera los resultados obtenidos, ya que estos nos podrían estar sugiriendo que se trata de una arilamina-*N*-aciltransferasa distinta en *Fusarium verticillioides*.

Los resultados preliminares y cualitativos de los ensayos realizados *in vivo* para evaluar la producción de bezoxazolinonas podrían ser cuantificables, por lo que mejorar la metodología propuesta para este estudio sería fundamental para lograrlo y obtener resultados que puedan ser analizados mediante programas de análisis de imágenes.

XI. REFERENCIAS

- Abdelrahman, M., & Jogaiah, S. (2020). Saponins versus plant fungal pathogens. En *Bioactive Molecules in Plant Defense* (pp. 37-45). Springer, Cham.
- Agrios, G. N. (2005). How plants defend themselves against pathogens. En *Plant Pathology* (pp. 207-248). Elsevier.
- Ahmad, S., Veyrat, N., Gordon-Weeks, R., Zhang, Y., Martin, J., Smart, L., Glauser, G., Erb, M., Flors, V., Frey, M., & Ton, J. (2011). Benzoxazinoid metabolites regulate innate immunity against aphids and fungi in maize. *Plant Physiology*, 157(1), 317-327.
- Alconada-Magliano, T. M., & Kikit, G. E. (2013). Fungal infection and disease progression. *Fusarium* spp. Enzymes associated with pathogenesis and loss of commercial value of wheat grains. En Teresa M. Alconada Magliano y Sofía Noemí Chulze (Ed.). *Head Blight in Latin America*. (pp. 99-122). Springer.
- Anaya-Lang, A. L., & Espinosa-García, F. J. (2006). La química que entreteje a los seres vivos. *Ciencias*, (083).
- Arendt, E. K., & Zannini, E. (2013). Maize. En *Cereal grains for the food and beverage industries* (pp. 67-113). Elsevier.
- Bais, H. P., Weir, T. L., Perry, L. G., Gilroy, S., & Vivanco, J. M. (2006). The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annual Review of Plant Biology*, 57, 233-266.
- Barros-Ríos, J., Malvar, R. A., Jung, H. J., & Santiago, R. (2011). Cell wall composition as a maize defense mechanism against corn borers. *Phytochemistry*, 72(4-5), 365–371.
- Barros-Ríos, J., Malvar, R. A., & Santiago, R. (2011). Función de la pared celular del maíz (*Zea mays* L.) como mecanismo de defensa frente a la plaga del taladro (*Ostrinia nubilalis* Hüb. y *Sesamia nonagrioides* Lef.). *Revista de Educación Bioquímica*, 30(4), 132-142.
- Beccari, G., Stępień, Ł., Onofri, A., Lattanzio, V. M., Ciasca, B., Abd-El Fatah, S. I., Valente, F., Urbaniak, M., & Covarelli, L. (2020). *In vitro* fumonisin biosynthesis and genetic structure of *Fusarium verticillioides* strains from five mediterranean countries. *Microorganisms*, 8(2), 241.
- Bednarek, P., & Osbourn, A. (2009). Plant-microbe interactions: chemical diversity in plant defense. *Science*, 324(5928), 746-748.
- 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.

- Bravo, H. R., Copaja, S. V., & Lazo, W. (1997). Antimicrobial activity of natural 2-benzoxazolinones and related derivatives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(8), 3255-3257.
- Boerjan, W., Ralph, J., & Baucher, M. (2003). Lignin biosynthesis. *Annual review of plant biology*, 54(1), 519-546.
- Burgos, N. R., & Talbert, R. E. (2000). Differential activity of allelochemicals from *Secale cereale* in seedling bioassays. *Weed science*, 48(3), 302-310.
- Bush K. (2018). Past and Present Perspectives on β -Lactamases. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 62(10), e01076-18.
- Camacho-Escobar, M. A., Ramos-Ramos, D. A., Ávila-Serrano, N. Y., Sánchez-Bernal, E. I., & López-Garrido, S. J. (2020). Las defensas físico-químicas de las plantas y su efecto en la alimentación de los rumiantes. *Terra Latinoamericana*, 38(2), 443-453.
- Camacho-Gamiño, A. F. (2023). Diversidad genética en cepas de *Fusarium verticillioides* reflejada por la tolerancia a benzoxazolinonas y producción de fumonisinas. Tesis de Licenciatura, Q.F.B., Facultad de Química, UNAM.
- Chripkova, M., Zigo, F., & Mojzis, J. (2016). Antiproliferative effect of indole phytoalexins. *Molecules*, 21(12), 1626.
- Corcuera, L. J., Woodward, M. D., Helgeson, J. P., Kelman, A., & Upper, C. D. (1978). 2, 4-Dihydroxy-7-methoxy-2 H-1, 4-benzoxazin-3 (4 H)-one, an inhibitor from *Zea mays* with differential activity against soft rotting *Erwinia* species. *Plant Physiology*, 61(5), 791-795.
- Dakora, F. D., & Phillips, D. A. (2002). Root exudates as mediators of mineral acquisition in low-nutrient environments. Food security in nutrient-stressed environments: exploiting plants' genetic capabilities, 201-213.
- De Bruijn, W. J. C., Gruppen, H., & Vincken, J. P. (2018). Structure and biosynthesis of benzoxazinoids: Plant defence metabolites with potential as antimicrobial scaffolds. *Phytochemistry*, 155, 233-243.
- De la Torre-Hernández, M. A., Sánchez-Rangel, D., Galeana-Sánchez, E., & Plasencia-de la Parra, J. (2014). Fumonisinas-síntesis y función en la interacción *Fusarium verticillioides*-maíz. TIP. *Revista especializada en ciencias químico-biológicas*, 17(1), 77-91.
- Ding, X., Yang, M., Huang, H., Chuan, Y., He, X., Li, C., Zhu, Y. & Zhu, S. (2015). Priming maize resistance by its neighbors: activating 1, 4-benzoxazine-3-ones synthesis and defense gene expression to alleviate leaf disease. *Frontiers in Plant Science*, 6, 830.
- Dinolfo, M. I., Martínez, M., Castañares, E., & Arata, A. F. (2022). *Fusarium* in maize during harvest and storage: a review of species involved, mycotoxins, and management strategies to reduce contamination. *European Journal of Plant Pathology*, 1-16.
- Dixon, R. A. (2001). Natural products and plant disease resistance. *Nature*, 411(6839), 843-847.

- Dutartre, L., Hilliou, F., & Feyereisen, R. (2012). Phylogenomics of the benzoxazinoid biosynthetic pathway of Poaceae: gene duplications and origin of the Bx cluster. *Evolutionary Biology*, 12(64).
- Edwards, K., Johnstone, C., & Thompson, C. (1991). A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic acids research*, 19(6), 1349.
- Etzerodt, T., Maeda, K., Nakajima, Y., Laursen, B., Fomsgaard, I. S., & Kimura, M. (2015). 2,4-dihydroxy-7-methoxy-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one (DIMBOA) inhibits trichothecene production by *Fusarium graminearum* through suppression of Tri6 expression. *International journal of food microbiology*, 214, 123–128.
- Franeta, F., Mikić, S., Milovac, Ž., Mitrović, B., Inđić, D., & Vuković, S. (2019). Maize defence mechanisms against the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* Hübner (Lepidoptera: Crambidae). *International Journal of Pest Management*, 65(1), 23-32.
- Galeana-Sánchez, E. A., (2014). Asociación e introducción de fumonisina b1 y la virulencia de *Fusarium verticillioides* en plántulas de maíz. Tesis de Licenciatura, Q.F.B. Facultad de Química,. UNAM.
- 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.
- García-Montalvo, I. A. (2016). Mecanismos de resistencia a patógenos e insectos herbívoros en teosinte y maíz. *Journal of Negative and No Positive Results: JONNPR*, 1(5), 190-198.
- Glenn, A. E., Hinton, D. M., Yates, I. E., & Bacon, C. W. (2001). Detoxification of corn antimicrobial compounds as the basis for isolating *Fusarium verticillioides* and some other *Fusarium* species from corn. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(7), 2973–2981.
- Glenn, A. E., Meredith, F. I., Morrison, W. H., 3rd, & Bacon, C. W. (2003). Identification of intermediate and branch metabolites resulting from biotransformation of 2-benzoxazolinone by *Fusarium verticillioides*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(6), 3165–3169.
- 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 seedlings. *Molecular Plant-Microbe Interactions : MPMI*, 21(1), 87–97.
- Glenn, A. E., & Bacon, C. W. (2009). FDB2 encodes a member of the arylamine N-acetyltransferase family and is necessary for biotransformation of benzoxazolinones by *Fusarium verticillioides*. *Journal of Applied Microbiology*, 107(2), 657-671.

- Glenn, A. E., Davis, C. B., Gao, M., Gold, S. E., Mitchell, T. R., Proctor, R. H., Stewart, J. E., & Snook, M. E. (2016). Two Horizontally Transferred Xenobiotic Resistance Gene Clusters Associated with Detoxification of Benzoxazolinones by *Fusarium* Species. *PLoS one*, 11(1), e0147486.
- Gleńsk, M., Gajda, B., Franiczek, R., Krzyżanowska, B., Biskup, I., & Włodarczyk, M. (2016). In vitro evaluation of the antioxidant and antimicrobial activity of DIMBOA [2, 4-dihydroxy-7-methoxy-2 H-1, 4-benzoxazin-3 (4 H)-one]. *Natural Product Research*, 30(11), 1305-1308.
- Guo, J., & Cheng, Y. (2022). Advances in Fungal Elicitor-Triggered Plant Immunity. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(19), 12003.
- Houseman, J. G., Campos, F., Thie, N. M. R., Philogene, B. J. R., Atkinson, J., Morand, P., & Arnason, J. T. (1992). Effect of the maize-derived compounds DIMBOA and MBOA on growth and digestive processes of European corn borer (*Lepidoptera: Pyralidae*). *Journal of economic entomology*, 85(3), 669-674.
- Hussain, M., Qamar, A., Saeed, F., Rasheed, R., Niaz, B., Afzaal, M., Mushtaq, Z., & Anjum, F. (2021). Biochemical properties of maize bran with special reference to different phenolic acids. *International Journal of Food Properties*, 24(1), 1468-1478.
- Hussain, M. I., Araniti, F., Schulz, M., Baerson, S., Vieites-Álvarez, Y., Rempelos, L., Bilsborrow, P., Chinchilla, N., Macías, F. A., Weston, L. A., Reigosa, M. J. & Sánchez-Moreiras, A. M. (2022). Benzoxazinoids in wheat allelopathy-From discovery to application for sustainable weed management. *Environmental and Experimental Botany*, 202, 104997.
- Jackson-Ziems, T. A., Rees, J. M., & Harveson, R. M. (2014). Common stalk rot diseases of corn. *Papers in Plant Pathology*. 532.
- Jeandet, P. (2017). Structure, chemical analysis, biosynthesis, metabolism, molecular engineering, and biological functions of phytoalexins. *Molecules*, 23(1), 61.
- Kant, P., Reinprecht, Y., Martin, C. J., Islam, R., & Pauls, K. P. (2011). Disease resistance/pathology/fusarium. En *Comprehensive Biotechnology* (pp. 729-743). Ontario, Canada: Elsevier.
- Karagianni, E. P., Kontomina, E., Lowe, E. D., Athanasopoulos, K., Papanikolaou, G., Garefalaki, V., Kotseli, V., Zaliou, S., Grimaud, T., Arvaniti, K., Tsatiri, M. A., Fakis, G., Glenn, A. E., Roversi, P., Abuhammad, A., Ryan, A., Sim, R. B., Sim, E., & Boukouvala, S. (2022). *Fusarium verticillioides* NAT1 (FDB2) N-malonyltransferase is structurally, functionally and phylogenetically distinct from its N-acetyltransferase (NAT) homologues. *The FEBS journal*, 10.1111/febs.16642. Advance online publication.
- Kato, T. A., Mapes, C., Mera, L. M., Serratos, J. A., & Bye, R. A. (2009). *Origen y diversificación del maíz: una revisión analítica*. Universidad Nacional Autónoma de México, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México, DF, 116.

- Klemptner, R. L., Sherwood, J. S., Tugizimana, F., Dubery, I. A., & Piater, L. A. (2014). Ergosterol, an orphan fungal microbe-associated molecular pattern (MAMP). *Molecular Plant Pathology*, 15(7), 747–761.
- Kukongviriyapan, V., Phromsopha, N., Tassaneeyakul, W., Kukongviriyapan, U., Sripa, B., Hahnvajanawong, V., & Bhudhisawasdi, V. (2006). Inhibitory effects of polyphenolic compounds on human arylamine N-acetyltransferase 1 and 2. *Xenobiotica*, 36(1), 15–28.
- Lacy, G. H., Hirano, S. S., Victoria, J. I., Kelman, A., & Upper, C. D. (1979). Inhibition of soft-rotting *Erwinia* spp. strains by 2, 4-dihydroxy-7-methoxy-2H-1, 4-benzoxazin-3 (4H)-one in relation to their pathogenicity on *Zea mays*. *Phytopathology*, 69(7), 757-763.
- Lanubile, A., Maschietto, V., Borrelli, V. M., Stagnati, L., Logrieco, A. F., & Marocco, A. (2017). Molecular basis of resistance to *Fusarium* ear rot in maize. *Frontiers in plant science*, 8, 1774.
- Leslie, J. F. & Summerell, B. A. (2013). An Overview of *Fusarium*. En Daren W. Brown & Robert H. Proctor (Ed.). *Fusarium Genomics, Molecular and Cellular Biology* (pp.1-9). Norfolk, UK: Caister Academic Press.
- Niculaes, C., Abramov, A., Hannemann, L., & Frey, M. (2018). Plant protection by benzoxazinoids—recent insights into biosynthesis and function. *Agronomy*, 8(8), 143.
- Niemeyer, H. M. (2009). Hydroxamic acids derived from 2-hydroxy-2 H-1, 4-benzoxazin-3 (4 H)-one: key defense chemicals of cereals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(5), 1677-1696.
- Maag, D., Erb, M., Köllner, T. G., & Gershenzon, J. (2015). Defensive weapons and defense signals in plants: some metabolites serve both roles. *BioEssays*, 37(2), 167-174.
- Macias, F. A., Chinchilla, N., Arroyo, E., Molinillo, J. M., Marin, D., & Varela, R. M. (2010). Combined strategy for phytotoxicity enhancement of benzoxazinones. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(3), 2047-2053.
- Macias, F. A., Marín, D., Oliveros-Bastidas, A., Chinchilla, D., Simonet, A. M., & Molinillo, J. M. (2006). Isolation and synthesis of allelochemicals from Gramineae: benzoxazinones and related compounds. *Journal of Agricultural and Food chemistry*, 54(4), 991-1000.
- Martyniuk, S., Stochmal, A., Macías, F. A., Marín, D., & Oleszek, W. (2006). Effects of some benzoxazinoids on in vitro growth of *Cephalosporium gramineum* and other fungi pathogenic to cereals and on *Cephalosporium* stripe of winter wheat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(4), 1036-1039.
- Mesterhazy, A., Toldine Toth, E., Szel, S., Varga, M., & Toth, B. (2020). Resistance of Maize Hybrids to *Fusarium graminearum*, *F. culmorum*, and *F. verticillioides* Ear Rots with Toothpick and Silk Channel Inoculation, as Well as Their Toxin Production. *Agronomy*, 10(9), 1283.

- Mikić, S., & Ahmad, S. (2018). Benzoxazinoids-protective secondary metabolites in cereals: Biochemistry and genetic control. *Ratarstvo i povrtarstvo/Field and Vegetable Crops Research*, 55(1), 39-48.
- Mikić, S., & Ahmad, S. (2018). Benzoxazinoids-protective secondary metabolites in cereals: The role and application. *Ratarstvo i povrtarstvo/Field and Vegetable Crops Research*, 55(1), 49-57.
- Mohamed, G. A., Ibrahim, S. R. M., Abdelkader, M. S. A., Al-Musayeib, N. M., Ghoneim, M., & Ross, S. A. (2014). Zeaoxazolinone, a new antifungal agent from *Zea mays* roots. *Medicinal Chemistry Research*, 23(10), 4627-4630.
- Oikawa, A., Ishihara, A., Tanaka, C., Mori, N., Tsuda, M., & Iwamura, H. (2004). Accumulation of HDMBOA-Glc is induced by biotic stresses prior to the release of MBOA in maize leaves. *Phytochemistry*, 65(22), 2995–3001.
- Oldenburg, E., Höppner, F., Ellner, F., & Weinert, J. (2017). Fusarium diseases of maize associated with mycotoxin contamination of agricultural products intended to be used for food and feed. *Mycotoxin Research* 33, 167–182.
- Omotayo, O. P., & Babalola, O. O. (2023). Fusarium verticillioides of maize plant: potentials of propitious phytomicrobiome as biocontrol agents. *Frontiers in Fungal Biology*, 4, 2.
- Park, W. J., Hochholdinger, F., & Gierl, A. (2004). Release of the benzoxazinoids defense molecules during lateral-and crown root emergence in *Zea mays*. *Journal of Plant Physiology*, 161(8), 981-985.
- Pedersen, H. A., Heinrichson, K., & Fomsgaard, I. S. (2017). Alterations of the benzoxazinoid profiles of uninjured maize seedlings during freezing, storage, and lyophilization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(20), 4103-4110.
- Pitt, J. I. (2014). Mycotoxins: Fumonisin. En Yasmine Motarjemi Ed. *Encyclopedia of Food Safety* (pp.299-303). California, USA: Elsevier.
- Plasencia, J. (2016). Defensas químicas de las plantas contra microorganismos patógenos. En *Ecología Química Y Alelopatía: Avances Y Perspectivas* (pp. 129-164). Ciudad de México, México: Plaza y Valdés.
- Pollard, M., Beisson, F., Li, Y., & Ohlrogge, J. B. (2008). Building lipid barriers: biosynthesis of cutin and suberin. *Trends in plant science*, 13(5), 236-246.
- Poloni, A., & Schirawski, J. (2014). Red card for pathogens: phytoalexins in sorghum and maize. *Molecules*, 19(7), 9114-9133.
- Ranere, A. J., Piperno, D. R., Holst, I., Dickau, R., & Iriarte, J. (2009). The cultural and chronological context of early Holocene maize and squash domestication in the Central Balsas River Valley, Mexico. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(13), 5014-5018.
- Reid, L.M., Zhu, X., Parker, A., & Yan, W. (2009) Increased resistance to *Ustilago zaeae* and *Fusarium verticillioides* in maize inbred lines bred for *Fusarium graminearum* resistance. *Euphytica* 165, 567–578.

- Richter, A., Powell, A. F., Mirzaei, M., Wang, L. J., Movahed, N., Miller, J. K., Piñeros, M. A. & Jander, G. (2021). Indole-3-glycerolphosphate synthase, a branchpoint for the biosynthesis of tryptophan, indole, and benzoxazinoids in maize. *The Plant Journal*, 106(1), 245-257.
- Rostás, M. (2007). The effects of 2, 4-dihydroxy-7-methoxy-1, 4-benzoxazin-3-one on two species of Spodoptera and the growth of *Setosphaeria turcica* in vitro. *Journal of Pest Science*, 80, 35-41.
- Sánchez-Rangel, D., SanJuan-Badillo, A., & Plasencia, J. (2005). Fumonisin production by *Fusarium verticillioides* strains isolated from maize in Mexico and development of a polymerase chain reaction to detect potential toxigenic strains in grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(22), 8565–8571.
- Sandy, J., Mushtaq, A., Holton, S. J., Schartau, P., Noble, M. E., & Sim, E. (2005). Investigation of the catalytic triad of arylamine N-acetyltransferases: essential residues required for acetyl transfer to arylamines. *The Biochemical journal*, 390(Pt 1).
- Santiago, R., Barros-Rios, J., & Malvar, R. A. (2013). Impact of cell wall composition on maize resistance to pests and diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(4), 6960-6980.
- Saunders, M., & Kohn, L. M. (2008). Host-synthesized secondary compounds influence the in vitro interactions between fungal endophytes of maize. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(1), 136-142.
- Sim, E., Walters, K., & Boukouvala, S. (2008). Arylamine N-acetyltransferases: from structure to function. *Drug Metabolism Reviews*, 40(3), 479-510.
- Sinclair, J., Sandy, J., Delgoda, R. Sim, E. & Noble, M. E. M. (2000). Structure of arylamine N-acetyltransferase reveals a catalytic triad. *Nature Structure & Molecular Biology*, 7, 560–564.
- Skoufogianni, E., Solomou, A., Charvalas, G. & Danalatos, N. (2020). Maize as Energy Crop. En Akbar Hossain (Ed.). *Maize: Production and Use* (pp. 3-18). BoD–Books on Demand.
- Teasdale, J. R., Rice, C. P., Cai, G., & Mangum, R. W. (2012). Expression of allelopathy in the soil environment: soil concentration and activity of benzoxazinoid compounds released by rye cover crop residue. *Plant Ecology*, 213, 1893-1905.
- Tooke, C. L., Hinchliffe, P., Bragginton, E. C., Colenso, C. K., Hirvonen, V. H. A., Takebayashi, Y., & Spencer, J. (2019). β -Lactamases and β -Lactamase Inhibitors in the 21st Century. *Journal of Molecular Biology*, 431(18), 3472–3500.
- Vandicke, J., De Visschere, K., Croubels, S., De Saeger, S., Audenaert, K., & Haesaert, G. (2019). Mycotoxins in Flanders' fields: Occurrence and correlations with *Fusarium* species in whole-plant harvested maize. *Microorganisms*, 7(11), 571.

- Wasternack, C., & Strnad, M. (2019). Jasmonates are signals in the biosynthesis of secondary metabolites—Pathways, transcription factors and applied aspects—A brief review. *New Biotechnology*, 48, 1-11.
- Whitney, N. J., & Mortimore, C. G. (1961). Effect of 6-methoxybenzoxazolinone on the growth of *Xanthomonas stewartii* (erw. Smith) Dowson and its presence in sweet corn (*Zea mays* var. *Saccharata bailey*). *Nature*, 189(4764), 596-597.
- Wouters, F. C., Blanchette, B., Gershenson, J., & Vassão, D. G. (2016). Plant defense and herbivore counter-defense: benzoxazinoids and insect herbivores. *Phytochemistry Reviews*, 15, 1127-1151.
- Zhou, S., Richter, A., & Jander, G. (2018). Beyond defense: multiple functions of benzoxazinoids in maize metabolism. *Plant and Cell Physiology*, 59(8), 1528-1537.

Páginas WEB

- Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT). (2011). *Maíz*. Recuperado el 19 de diciembre de 2022 del sitio web: <https://conacyt.mx/cibiogem/maiz>
- Curtis, L., M. D. (2020). *Fusarium*. Salem Press Encyclopedia of Health. Recuperado el 13 de noviembre de 2022 del sitio web: <https://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=ers&AN=94416911&lang=es&site=eds-live> (06/11/2022).

XII. ANEXO

1. Preparación de medios

1.1. Preparación de medio Czapek

Para preparar 250 mL de medio Czapek se pesaron 2.5 g de sacarosa, 0.5 g de nitrato de potasio, 0.125 g de sulfato de magnesio, 0.0125 g de cloruro de potasio y 0.125 g de levadura que se disolvieron en 250 mL de agua desionizada. Esta mezcla se vació en matraces de 50 mL, 15 mL en cada uno, y posteriormente se esterilizaron en el autoclave (120 °C, 1.2 kg/cm²). Por último se dejaron enfriar a temperatura ambiente para después de ser requerido, almacenarlos en refrigeración a 4 °C.

1.2. Preparación de medio PDA 0.5X

Para la preparación de medio PDA, se pesaron 4.9 g de PDA (Sigma – Aldrich) y 3.8 g de agar que después fueron suspendidos en 250 mL de agua desionizada. Tras estos pasos, el medio se esterilizó en el autoclave (120 °C, 1.2 kg/cm²) y cuando salió se dejó enfriar lo suficiente para poder vaciarlo en cajas petri estériles, este último paso se realizó en una campana de flujo laminar. Se dejó enfriar el medio ya en las cajas hasta su solidificación en un ambiente estéril. Este medio PDA 0.5X se almacenó en refrigeración a 4 °C hasta su uso.

El procedimiento anteriormente descrito se realizó para tener medio PDA 0.5X en el que se inocularon las cepas de *F. verticillioides* utilizadas y del cual se obtenían las conidias. Para los ensayos de la evaluación del efecto del 2-Aminofenol sobre el crecimiento radial de *F. verticillioides* y el del efecto del ácido ferúlico sobre el metabolismo de BOA y en el crecimiento radial de *F. verticillioides* se realizaron los pasos mencionados en el párrafo anterior y también los siguientes para suplementar los medios de cultivo con los compuestos.

Para suplementar los medios PDA, se trabajó en la campana de flujo laminar, donde se añadieron soluciones de los compuestos en DMSO según se describe en la Tabla 5, colocando el volumen indicado en el centro de las cajas petri estériles antes de vaciar 20 mL del medio en cada caja. Después se mezclaron con movimientos circulares y se siguió el procedimiento anteriormente mencionado, se dejaron enfriar hasta su solidificación y se almacenaron en el refrigerador a 4 °C hasta su uso.

Tabla 7. Concentraciones y cantidades utilizadas para suplementar el medio PDA.

Ensayo	Compuestos	Concentración (Sol. stock)	Volumen agregado	Concentración final
Efecto del 2-Aminofenol sobre el crecimiento radial de <i>F.verticillioides</i>	2-Aminofenol (2-AP)	81 mg/mL	25 µL	0.10 mg/mL
			50 µL	0.20 mg/mL
			100 L	0.40 mg/mL
Efecto del ácido ferúlico sobre el metabolismo de BOA y en el crecimiento radial de <i>F. verticillioides</i>	BOA	100 mg/mL	100 µL	0.5 mg/mL
	Ácido ferúlico (FA)	0.5 M	10 µL	0.25 M
			20 µL	A.

1.3. Preparación de Agar 1.2 %

Para preparar 250 mL de agar al 1.2 %, se pesaron 3.0 g de agar y se les agregaron 250 mL de agua desionizada. Después se esterilizó en el autoclave (120 °C, 1.2 kg/cm²) y se dejó enfriar lo suficiente para poder vaciarlo en cajas petri estériles, en la campana de flujo laminar. Se dejó solidificar en un ambiente estéril y posteriormente se almacenó en refrigeración a 4 °C hasta su uso.

2. Preparación de curva patrón

2.1. BOA y MBOA

Para la cuantificación de las benzoxazolinonas se hizo la curva patrón con soluciones de BOA o MBOA en MeOH, utilizando las concentraciones de 3, 4, 5, 6 y 7 µg/µL de la benzoxazolinona correspondiente.

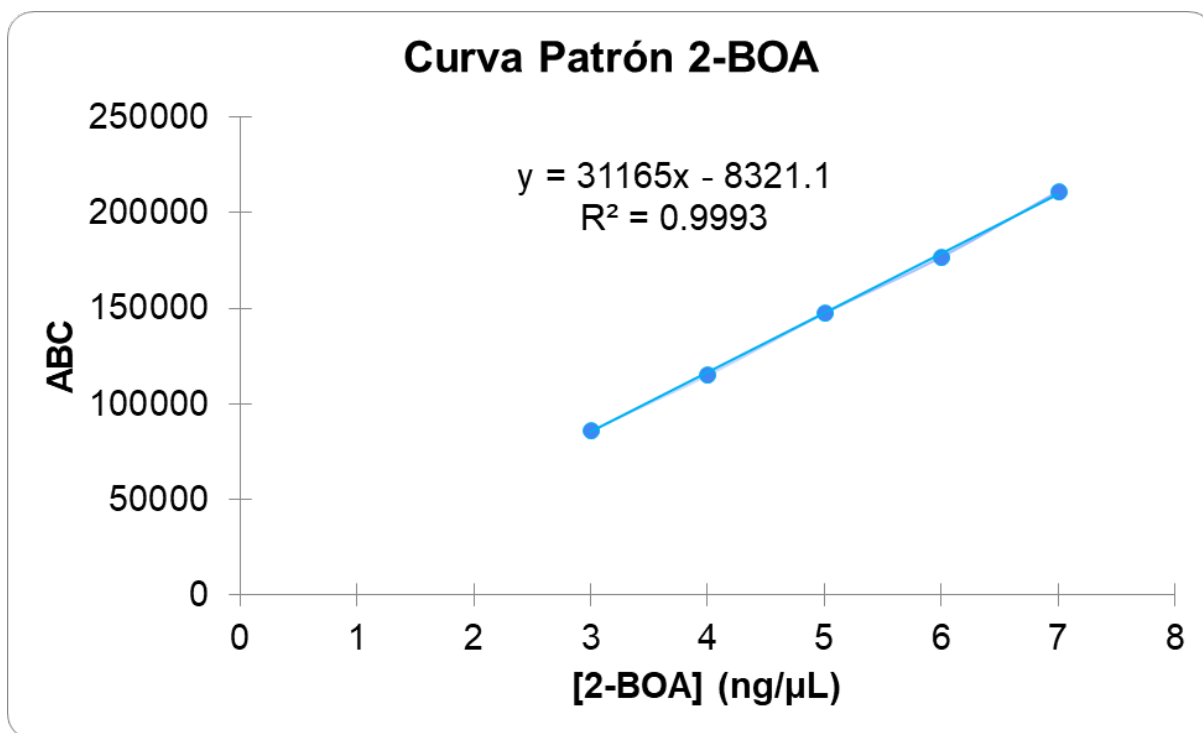


Figura A1. Curva patrón de 2-BOA obtenida por HPLC. Fase móvil: Metanol: Buffer de fosfatos 50:50, $\lambda=260$ nm, flujo de 1 mL/min.

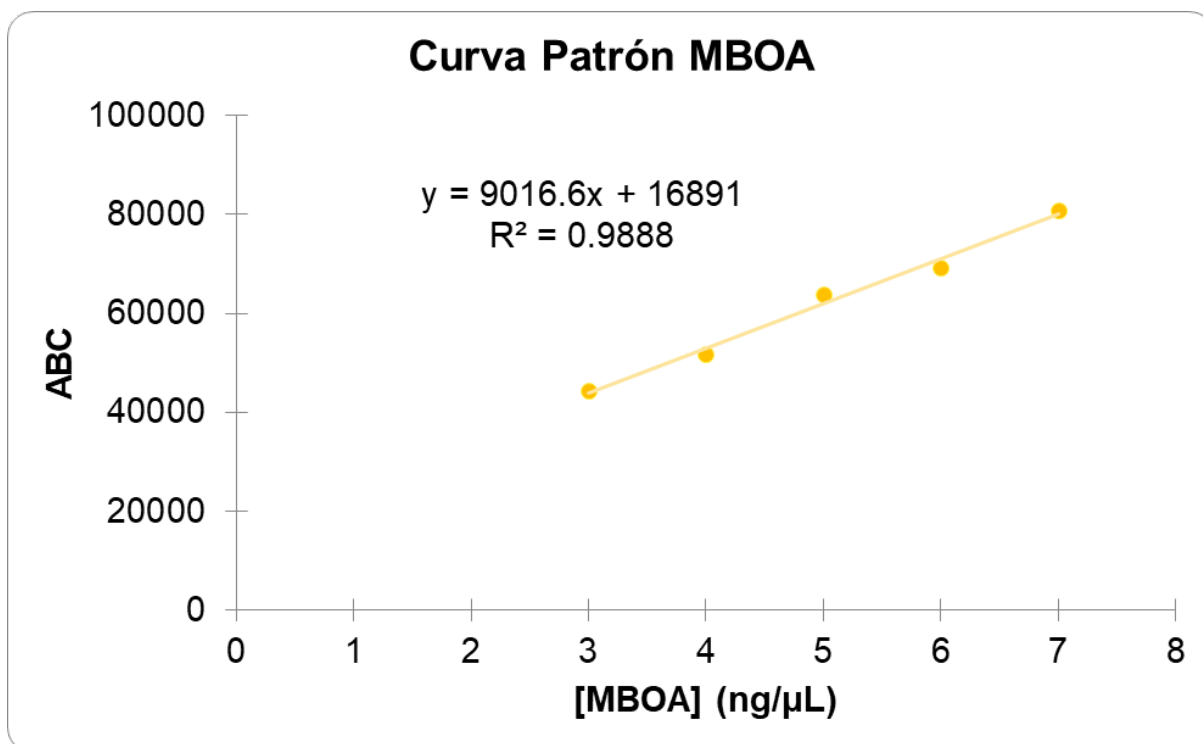


Figura A2. Curva patrón de MBOA obtenida por HPLC. Fase móvil: Metanol: Buffer de fosfatos 50:50, $\lambda=260$ nm, flujo de 1 mL/min.

2.2. HPMA

La curva patrón se obtuvo utilizando diluciones del STD de HPMA obtenido en MeOH de concentración no conocida, utilizando las diluciones (1:150, 1:200, 1:250, 1:300, 1:400).

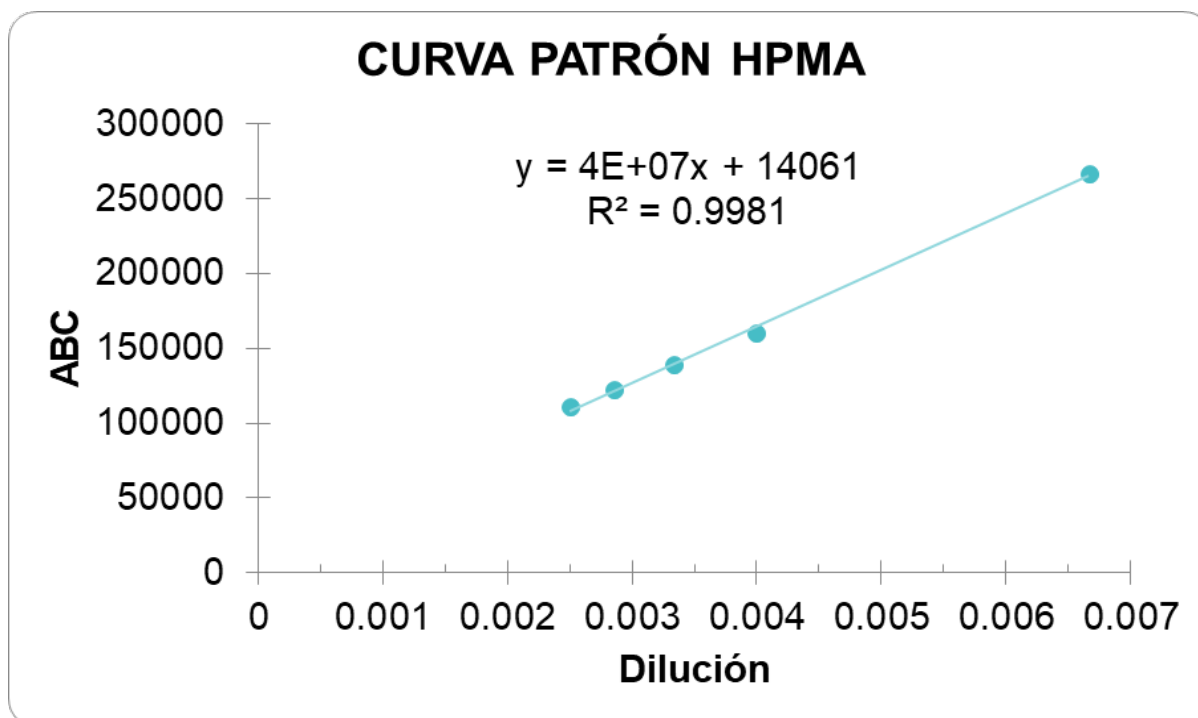


Figura A3. Curva patrón de HPMA obtenida por HPLC. Fase móvil: Buffer de fosfatos: Metanol 90:10, $\lambda=260$ nm, flujo de 1 mL/min. A partir de diluciones de STD de HPMA de concentración desconocida.

2.3.2-Aminofenol

Para la cuantificación de las benzoxazolinonas se hizo la curva patrón con soluciones de 2-AP en MeOH, utilizando las concentraciones de 3, 4, 5, 6 y 7 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

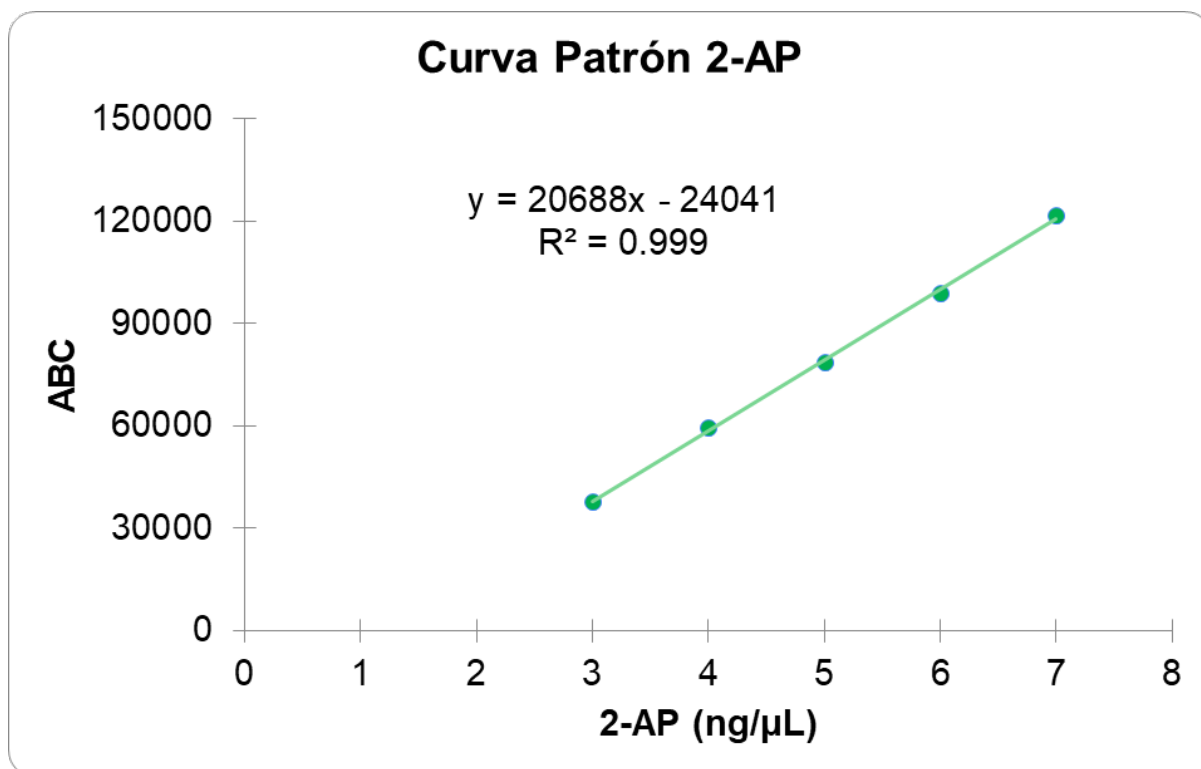


Figura A4. Curva patrón de 2-AP obtenida por HPLC. Fase móvil: Buffer de fosfatos: Metanol 90:10, $\lambda=260$ nm, flujo de 1 mL/min.