

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE QUÍMICA

"EFECTO DE *Fusarium verticillioides*  
SOBRE EL METABOLISMO DE CARBONO  
EN EMBRIONES GERMINADOS DE MAÍZ"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA

**VIRIDIANA LUNA LOAIZA**



MÉXICO D.F.

2011



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** FRANCISCO JAVIER PLASENCIA DE LA PARRA  
**VOCAL:** RAQUEL ORTEGA MUÑOZ  
**SECRETARIO:** SOBEIDA SÁNCHEZ NIETO  
**1ER SUPLENTE:** VANESSA REBECA MAYA AMPUDIA  
**2DO SUPLENTE:** LAURA CARMONA SALAZAR

El presente trabajo se realizó en el laboratorio 114 del departamento de Bioquímica, Edificio E de la Facultad de Química UNAM, bajo la dirección de la Dra. Sobeida Sánchez Nieto.

---

DRA. SOBEIDA SÁNCHEZ NIETO  
ASESOR

---

VIRIDIANA LUNA LOAIZA  
SUSTENTANTE

***“Cuanto mayor es la dificultad, mayor es la gloria”.***  
Marco Tulio Cicerón

### DEDICATORIAS

Debido a que este trabajo de tesis fue realizado gracias al apoyo de muchas personas importantes en mi vida, lo dedico a cada una de ellas con todo mi amor.

A mi madre Alba Verónica:

Te agradezco infinitamente todo el apoyo, amor y comprensión que me has dado. Has sido mi ejemplo a seguir y sin toda la fortaleza que me has brindado siempre, esto no hubiera sido posible. Te amo mamá.

A mi hermano Octavio:

Gracias hermano, por toda la paciencia que siempre me has tenido, por acompañarme y protegerme siempre. Nunca me has dejado sola. Eres el mejor hermano del mundo. Te quiero mucho.

A mi familia:

Agradezco a toda mi familia, a mi abuelita Josefina por toda su comprensión y buenos consejos. A mi tío Nefthalí por apoyarme muchísimo durante mi carrera; mil gracias por abrirme las puertas de tu hogar y compartir conmigo muchos momentos agradables. Mil gracias a Betzabé, Rodri, Mini y Lía, el convivir con ustedes ha sido una experiencia realmente grata, agradezco infinitamente su apoyo y el seguir compartiendo momentos juntos. A mi tía Vicky y a mis primas Ruth y Grissell por todas las buenas vibras y divertidas charlas que siempre hemos tenido. A mi abuelito Manuel (q.e.p.d), fuiste una parte muy importante en mi vida. A Balta, Juan Carlos y Osito. Los quiero muchísimo.

A la Dra Sobeida:

Es de las mejores personas que he conocido; le agradezco profundamente toda su paciencia, cariño y comprensión. Por todos los consejos que siempre me ha dado y escucharme y entenderme cuando ha sido necesario. Gracias por toda la confianza que siempre ha puesto en mí, espero no defraudarla nunca.

A mi amor Esteban:

Eres el amor de mi vida. Siempre me has dado fortaleza y has confiado en mí. Te agradezco por permanecer a mi lado y compartir conmigo los momentos más felices de mi vida. Te amo Stevie.

A mis compañeros de Laboratorio:

Gracias a mis tocayas Viri Jefa, Viri Zu, a Pau, Fer, Sam, Juanma y Silvia; compañeros y amigos del laboratorio 114, por su apoyo, pláticas, fiestas y celebraciones; espero seguir compartiendo muchos logros con todos ustedes. Agradezco a mis amigos Eneas, Eric y Edson por todas las risas que provocaron en mí, por todas las enseñanzas y conocimientos transmitidos. A Félix, gracias por ayudarme a estudiar y por confiar en mí. A Naholi, gracias por los excelentes consejos que siempre me has brindado, por tu apoyo y ayuda incondicional, he aprendido mucho de ti y espero seguir haciéndolo; eres un excelente ser humano. A mis vecinos de laboratorio Carlos Everardo, gracias por tu compañía, ayuda y carcajadas a tu lado. A Manu, Silvia, Dago, Sara y Paco Antonio, sin duda, la estancia en el lab no hubiera sido igual sin ustedes, gracias por su apoyo.

A mi mejor amiga Diana Rivera:

Eres una persona muy importante en mi vida, mil gracias por todos los consejos, pláticas, regaños, por todos los momentos vividos a lo largo nuestra carrera, por estar conmigo justo cuando necesité tu ayuda. Por tu apoyo incondicional y por tu valiosísima amistad. Te quiero mucho enfermis.

A mis amigos:

Dedico este trabajo a todos los amigos que me apoyaron durante mi carrera y que han sido muy importantes en mi vida, a Maci, Piby, Karla Torta, Leticia, Susy, Carlos Sals, Sujhey, Lupis, Macedo, Peter, Raúl, Ixchell, Bochm, Joel, Liliana, Rouz, Vic, Alan Cesar, Narda, Oscar, May, Bostik, Mara, Mich Silva, Karina, Tanis. Mil gracias a todos por tantos momentos compartidos, tantas vivencias y experiencias.

## AGRADECIMIENTOS

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

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

Se agradece al Dr. Fausto Rivero por su apoyo en la resolución de lípidos mediante la técnica de cromatografía en capa fina y quien me proporcionó placas de sílica gel y el revelador de vainillina.

Se agradece a la M. en C. Lilian Valencia Turquotte por su asesoría técnica en la detección de lípidos por cromatografía en capa fina.

Se agradece al M. en C. Félix Morales Flores quien muy amablemente me ayudó a realizar la síntesis del estándar de triacilgliceroles.

Se agradece al Dr. Javier Plasencia por la aportación de la cepa MY3 de *Fusarium verticillioides* indispensable para la realización de este trabajo.

ÍNDICE GENERAL

<b>I.</b>	<b>ABREVIATURAS</b> .....	1
<b>II.</b>	<b>RESUMEN</b> .....	2
<b>III.</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	4
<b>1.</b>	<b>ZEA MAYS</b> .....	4
	1.1 Taxonomía del maíz.....	4
	1.2 Importancia económica y alimenticia de <i>Zea mays</i> .....	5
	1.3 Estructura de la semilla de maíz.....	6
<b>2.</b>	<b>GERMINACIÓN</b> .....	8
<b>3.</b>	<b>MOVILIZACIÓN DE LAS RESERVAS DE CARBONO DURANTE LA GERMINACIÓN</b> .....	11
	3.1 Movilización de lípidos.....	13
	3.2 Ciclo del glioxilato.....	14
	3.3 Metabolismo de la sacarosa.....	17
<b>4.</b>	<b>FUSARIUM VERTICILLIOIDES</b> .....	22
	4.1 Características generales.....	22
	4.2 Efectos de <i>Fusarium verticillioides</i> en la planta de maíz.....	23
	4.3 Producción de toxinas por <i>Fusarium verticillioides</i> .....	25
	4.4 Efecto de las fumonisinas en humanos.....	27
	4.5 Efecto de las fumonisinas en animales.....	28
	4.6 Impacto económico y control biológico.....	30
<b>IV.</b>	<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	32
<b>V.</b>	<b>HIPÓTESIS</b> .....	35
<b>VI.</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	36
<b>VII.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	37
	1. Germinación.....	38
	2. Infección de los embriones de maíz con conidios del patógeno <i>Fusarium verticillioides</i> .....	38
	3. Extracción de lípidos.....	39
	4. Análisis de lípidos por cromatografía en capa fina.....	40

5. Detección <i>in situ</i> de actividad enzimática de la MS en embriones germinados de maíz.....	41
6. Cuantificación de sacarosa en embriones de maíz mediante un método enzimático.....	43
<b>VIII. RESULTADOS.....</b>	<b>45</b>
1. Confirmación del incremento del contenido de sacarosa durante la germinación de los embriones de maíz.....	45
2. Análisis de la movilización de lípidos en escutelos y ejes embrionarios de maíz.....	54
3. Análisis de TGAs por cromatografía en capa fina.....	56
4. Detección <i>in situ</i> de actividad enzimática de la MS en embriones germinados de maíz.....	60
5. Determinación del contenido de sacarosa durante la germinación de embriones de maíz infectados por <i>Fusarium verticillioides</i> .....	68
6. Detección de la actividad enzimática in situ de la Malato sintasa en embriones germinados de maíz infectados con el hongo <i>Fusarium verticillioides</i> .....	78
<b>IX. DISCUSIÓN.....</b>	<b>87</b>
<b>X. CONCLUSIONES.....</b>	<b>94</b>
<b>XI. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>95</b>
<b>XII. REFERENCIAS.....</b>	<b>96</b>
<b>XIII. APÉNDICE.....</b>	<b>104</b>

**ÍNDICE DE FIGURAS**

Figura 1. Estructura de la semilla de maíz.....	8
Figura 2. Curva de toma de agua de las semillas.....	10
Figura 3. Proceso de hidrólisis del almidón y uso en los tejidos embrionarios..	12
Figura 4. Diagrama general de la degradación de TAGs.....	14
Figura 5. Representación del ciclo del glioxilato.....	16
Figura 6. Estructura de la sacarosa.....	17
Figura 7. Síntesis de sacarosa a partir de UDPGlucosa.....	18
Figura 8. Árbol filogenético de la secuencia completa de la proteína SPS en plantas.....	19
Figura 9. Esquemización de la síntesis y degradación de la sacarosa.....	21
Figura 10. Formas microscópicas de <i>Fusarium verticillioides</i> .....	23
Figura 11. Mazorcas infectadas por <i>Fusarium verticillioides</i> .....	24
Figura 12. Estructura química de las fumonisinas.....	26
Figura 13. Cerebro equino.....	29
Figura 14. Diagrama general del trabajo experimental.....	37
Figura 15. Reacción enzimática acoplada <i>in situ</i> para la determinación de la actividad de la Malato sintasa.....	42
Figura 16. Reacción de reducción del NBT por protones.....	42
Figura 17. Reacción acoplada para la detección de glucosa.....	44
Figura 18. Detección de sacarosa en embriones de maíz secos.....	46
Figura 19. Detección de sacarosa en embriones de maíz germinados 8 h.....	47
Figura 20. Detección de sacarosa en embriones de maíz germinados 12 h....	48
Figura 21. Detección de sacarosa en embriones de maíz germinados 18 h....	49
Figura 22. Detección de sacarosa en embriones de maíz germinados 24 h....	50
Figura 23. Detección de sacarosa en embriones de maíz germinados 36 h....	51
Figura 24. Detección de sacarosa en embriones de maíz germinados 48 h....	52
Figura 25. Contenido de sacarosa durante la germinación de embriones de maíz.....	53
Figura 26. Contenido de lípidos totales durante la germinación de ejes y escutelos de maíz.....	55

Figura 27. Porcentaje que representan los lípidos de reserva tanto en el escutelo como en los ejes embrionarios.....	56
Figura 28. Determinación de TGAs en extractos lipídicos de escutelos y ejes embrionarios de maíz a diferentes tiempos de germinación.....	57
Figura 29. Perfil de TGAs en escutelos y ejes embrionarios de maíz durante el proceso de la germinación.....	58
Figura 30. Contenido de TGAs por gramo de escutelos y ejes embrionarios...	59
Figura 31. Detección in situ de la actividad de la MS en embriones de maíz germinados 8 h.....	61
Figura 32. Detección in situ de la actividad de la MS en embriones de maíz germinados 12 h.....	62
Figura 33. Detección in situ de la actividad de la MS en embriones de maíz germinados 18 h.....	63
Figura 34. Detección in situ de la actividad de la MS en embriones de maíz germinados 24 h.....	64
Figura 35. Detección in situ de la actividad de la MS en embriones de maíz germinados 36 h.....	65
Figura 36. Detección in situ de la actividad de la MS en embriones de maíz germinados 48 h.....	66
Figura 37. Actividad enzimática de la Malato sintasa a lo largo del proceso de germinación.....	67
Figura 38. Comparación de la actividad enzimática de la MS y el contenido de sacarosa a lo largo de la germinación.....	68
Figura 39. Detección de sacarosa en embriones de maíz infectados 8 h.....	70
Figura 40. Detección de sacarosa en embriones de maíz infectados 12 h.....	71
Figura 41. Detección de sacarosa en embriones de maíz infectados 18 h.....	72
Figura 42. Detección de sacarosa en embriones de maíz infectados 24 h.....	73
Figura 43. Detección de sacarosa en embriones de maíz infectados 36 h.....	74
Figura 44. Detección de sacarosa en embriones de maíz infectados 48 h.....	75
Figura 45. Contenido de sacarosa durante la germinación de embriones de maíz infectados con <i>Fusarium verticillioides</i> .....	76

---

Figura 46. Comparación entre el contenido de sacarosa presente en embriones de maíz infectados y no infectados con <i>Fusarium verticillioides</i> .....	77
Figura 47. Detección <i>in situ</i> de la actividad de la MS en embriones de maíz germinados 8 h con el patógeno.....	79
Figura 48. Detección <i>in situ</i> de la actividad de la MS en embriones de maíz germinados 12 h con el patógeno.....	80
Figura 49. Detección <i>in situ</i> de la actividad de la MS en embriones de maíz germinados 18 h con el patógeno.....	81
Figura 50. Detección <i>in situ</i> de la actividad de la MS en embriones de maíz germinados 24 h con el patógeno.....	82
Figura 51. Detección <i>in situ</i> de la actividad de la MS en embriones de maíz germinados 36 h con el patógeno.....	83
Figura 52. Detección <i>in situ</i> de la actividad de la MS en embriones de maíz germinados 48 h con el patógeno.....	84
Figura 53. Actividad de la Malato sintasa en embriones de maíz germinados en presencia del hongo <i>Fusarium verticillioides</i> .....	85
Figura 54. Comparación entre la actividad de la Malato sintasa en embriones infectados y no infectados con <i>Fusarium verticillioides</i> .....	86

**ABREVIATURAS**

ABA	Ácido abscísico
ADP	Difosfato de Adenosina
ATP	Trifosfato de Adenosina
ATPasa	Trifosfato de Adenosina hidrolasa
CoA	Coenzima A
DAG	Diacilglicerol
EtOH	Etanol
G6PDH	Glucosa 6 Fosfato Deshidrogenasa
GA	Ácido giberélico
HK	Hexocinasa
ICL	Isocitrato liasa
INVC	Invertasa citosólica
INVPC	Invertasa de pared celular
INVV	Invertasa vacuolar
MDH	Malato deshidrogenasa
MS	Malato sintasa
NAD+	Nicotinamida adenina dinucleótido oxidado
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido reducido
NBT	Nitroazul de Tetrazolio
OAA	Oxaloacetato
PVP 40	Polivinilpirrolidona-40
SPP	Sacarosa Fosfatasa
SPS	Sacarosa Fosfato Sintasa
TGA	Triacilglicerol
TLC	Cromatografía en capa fina

**RESUMEN**

Uno de los eventos clave en la vida de las plantas es la germinación, proceso que comienza con la hidratación de la semilla y concluye con la salida de la radícula. El posterior crecimiento se sabe que se sostiene por la rica fuente de carbono que contiene en sus lípidos de reserva, si bien también presenta como reservas a carbohidratos y proteínas. Los lípidos son compuestos variados en composición y función como los membranales y de reserva, estos últimos se encuentran principalmente en forma de triacilgliceroles (TAG).

La completa oxidación de los lípidos produce dos veces más energía que la obtenida por la hidrólisis de carbohidratos y proteínas. Además, los lípidos pueden ser conducidos hacia varias vías metabólicas como son: la  $\beta$ -oxidación para la producción de acetyl-CoA y poder reductor ( $\text{FADH}_2$  y  $\text{NADH}$ ), el recambio de los lípidos membranales, la gluconeogénesis y de este modo obtener finalmente sacarosa.

La sacarosa es el principal carbohidrato transportado en plantas. Las hojas son los tejidos que la sintetizan y los tejidos no verdes son las que la demandan. La fuerza de demanda depende del uso que se le da a la sacarosa, sustrato respirable, carbono disponible para biosíntesis, o acumulado en forma de almidón. Por lo que las relaciones que se establecen entre los tejidos fuente y los de demanda deben de encontrarse finamente reguladas. Procesos de estrés de tipo ambiental, lluvias, sequía, calor, luz así como la presencia de patógenos lleva a un ajuste del movimiento de carbono en las plantas. Por lo que los procesos metabólicos deben ser ajustados para dar una respuesta fisiológica adecuada u homeostática.

En los embriones de maíz encontramos esta relación tejido fuente-demanda, el escutelo es un tejido que se conoce con una gran actividad metabólica y que le provee de nutrimentos al eje embrionario. Mientras que éste soporta su crecimiento con lo que le llega de fuera.

En un estudio previo encontramos que los embriones y no los ejes embrionarios acumulan sacarosa después de las 12 horas de la germinación. Así que en este trabajo buscamos la evidencia del posible uso de los lípidos de reserva en la síntesis de sacarosa en los escutelos y el potencial cambio que un patógeno podría inducir en su producción.

Confirmamos mediante la detección *in situ* de sacarosa que entre las 8 y 12 horas de germinación hay una disminución importante de la sacarosa en el escutelo, incrementándose para las 18 h. Ya que la sacarosa podría provenir de la degradación de lípidos, se cuantificó la cantidad de lípidos totales y se observó que tanto el eje como el escutelo degradan los lípidos a una tasa similar, si bien el escutelo contiene más. Las curvas de degradación de TGA fueron similares entre el eje embrionario y el escutelo y en ninguno de los dos tejidos se acaban los TGA al menos hasta las 48 h que se midió. A partir de los TGA se forma acetil-CoA, carbono que posteriormente se puede usar para realizar la gluconeogénesis y sintetizar sacarosa. Para corroborar lo anterior, se detectó la actividad de la Malato sintasa en los embriones mediante una reacción acoplada y se halló que existe una actividad máxima a las 18 h de germinación exclusivamente en los escutelos y cercano a los límites del eje embrionarios. Por lo que los TGA del escutelo posiblemente se degradan para la síntesis de sacarosa, mientras que el eje podría estarlos empleando para la producción de ATP y nuevos lípidos membranales, ya que necesita elongarse y formar nuevas células.

Cuando el embrión está sometido al estrés por un patógeno como *Fusarium verticillioides*, hay un cambio en el metabolismo de carbono evidenciado por un adelanto de 6 h en la aparición del aumento en la cantidad de sacarosa, y un incremento y adelanto en la actividad de la Malato sintasa en los escutelos del embrión. Lo anterior confirma que el tejido vegetal modifica su metabolismo de carbono cuando un patógeno se encuentra presente y que posiblemente el adelanto en la malato sintasa sea una estrategia que la semilla aumente su velocidad de crecimiento y ganarle al patógeno.

## INTRODUCCIÓN

### I. *Zea mays*

El maíz (*Zea mays*) es un miembro de la familia de las Poáceas, una clasificación que comparte con muchos otros cultivos alimenticios importantes como trigo, arroz, avena, sorgo, cebada y la caña de azúcar. El *Zea* comprende un grupo de plantas herbáceas anuales nativas de México y América Central.

**Taxonomía del maíz** (Tomado de Grass Phylogeny Working Group – <http://www.virtualherbarium.org/grass/gpwg/>, 2003).

<b>Reino</b>	<i>Plantae</i> – Planta, vegetal
<b>Subreino</b>	<i>Tracheobionta</i> – Plantas vasculares
<b>División</b>	<i>Magnoliophyta</i> —Angiospermas
<b>Clase</b>	<i>Liliopsida</i> -- Monocotiledóneas
<b>Subclase</b>	<i>Commelinidae</i> --
<b>Orden</b>	<i>Cyperales</i> –
<b>Familia</b>	<i>Poaceae</i> – Gramíneas
<b>Género</b>	<i>Zea</i> – Maíz
<b>Especie</b>	<i>Zea mays</i> – Maíz

Se trata de una especie que en su mayoría está compuesta por tejido foliar, sin embargo, existen muchos otros elementos importantes que comprenden la planta del maíz. En general, la morfología de la planta ha sido objeto de la evolución, lo cual da lugar a una gran variabilidad del número, la longitud y la anchura de las hojas, así como de la altura de las plantas, entre muchas otras características. Además de la evolución, la domesticación del maíz ha influido también en la modificación de la anatomía de la planta. También la variabilidad se debe a que es una planta cuyas flores masculinas y femeninas están separadas, lo cual favorece la polinización cruzada. La planta del maíz alcanza de 0.5 m a 6 m de alto, el tallo principal es delgado y segmentado muy similar a un tallo de bamboo (Leszek, 2002).

### ***Importancia económica y alimenticia de Zea mays***

El maíz, junto con el trigo y el arroz, es uno de los cereales más importantes del mundo ya que suministra elementos nutritivos tanto para el ser humano como para animales, además de que es una materia prima básica en la industria ya que a partir de él se pueden obtener diversos productos como almidón, aceite y proteínas, bebidas alcohólicas, edulcorantes y, recientemente, combustible. De igual modo, al recolectar el grano y hojas secas de la misma planta estas pueden emplearse como forraje para alimentar al ganado.

Del maíz se puede utilizar todo el grano, o bien empleando técnicas de molienda en seco se pueden obtener numerosos productos intermedios como sémola en escamas o harina fina que a su vez tienen un amplio número de aplicaciones en la industria alimenticia.

El aumento de los precios del petróleo ha impulsado la investigación sobre la fermentación del maíz para producir alcohol combustible, el cual tiene un uso muy difundido en algunas partes de los Estados Unidos. Con maíz fermentado se elaboran también algunas bebidas alcohólicas.

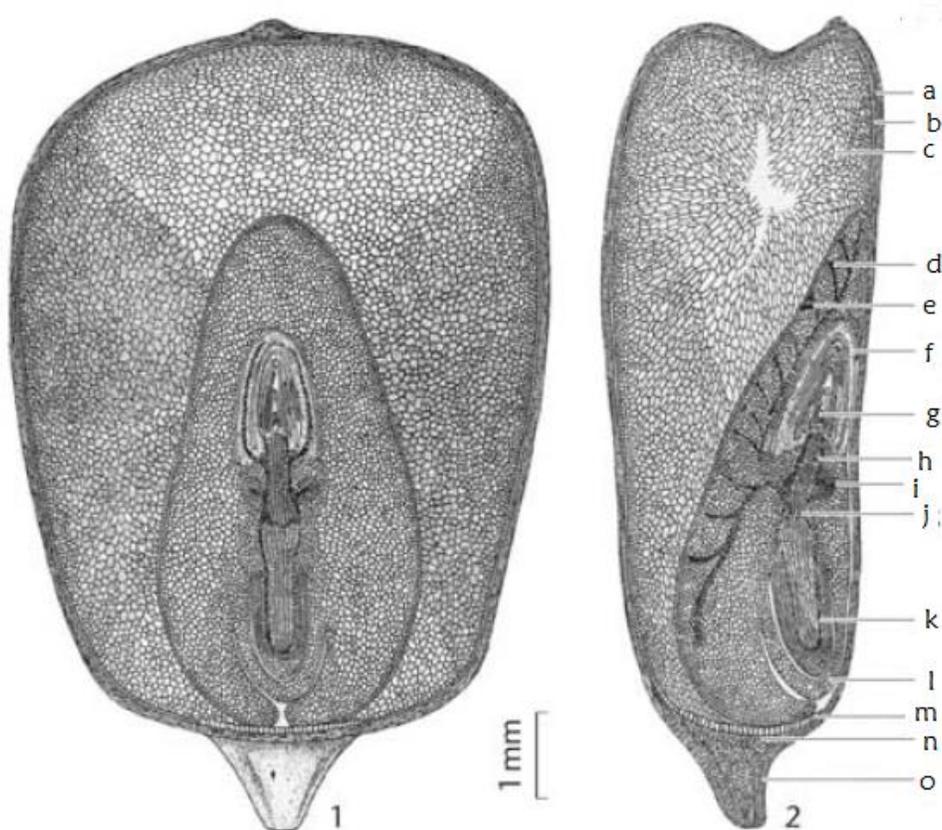
Por último, también tienen importancia las aplicaciones de los residuos de la planta de maíz que se utilizan, entre otras cosas, como alimento para animales y como base para extraer diversos productos químicos de las panojas, como por ejemplo, furfural y xilosa. Estos residuos también tienen importancia como elementos para mejorar los suelos (FAO, 1993).

### ***Estructura de la semilla de maíz***

La semilla madura (cariopsis) está compuesta principalmente por tres estructuras físicas fundamentales: Pericarpio, Endospermo y Embrión (Figura 1).

- **Pericarpio:** es una capa externa dura y transparente que rodea a la semilla formado por las siguientes estructuras:
  - Epidermis: Es la capa más externa del pericarpio y tiene un espesor entre 4 y 6  $\mu\text{m}$ , su constitución cerosa es lo que la hace impermeable al agua.
  - Mesocarpio: Formado por una capa compacta de células alargadas con numerosos poros que cubre un área de grandes espacios intercelulares.
  - Células transversales: Células alargadas de las cuales está compuesto el mesocarpio.
  - Células tubulares: Capa más interna del pericarpio y está formada por tubos longitudinales presionados contra la testa.
  - Cubierta seminal o testa: Capa más externa del endospermo.
- **Endospermo:** Actúa como tejido nutritivo para el embrión durante el proceso de germinación y corresponde a aproximadamente el 85% del peso total de la semilla. En el maíz se compone de:
  - Endospermo cristalino: Los gránulos de almidón adquieren estructura poligonal y están fuertemente empaquetados por una matriz de proteínas. Se localiza a continuación de la capa aleuronal.
  - Endospermo harinoso: Gránulos de almidón débilmente empaquetados, son casi redondos y están asociados con capas delgadas de proteínas y muchos espacios de aire entre los gránulos. Se localiza en la parte central del grano.
  - Aleurona: conjunto único de células especializadas que forman la capa más externa del endospermo las cuales presentarán una alta actividad metabólica cuando la germinación comience.
- **Embrión:** También llamado germen, representa entre el 10 y 12% del peso seco total del grano. Se compone de:
  - Plúmula: Brote rudimentario terminal situado en el extremo del hipocótilo que consiste en el epicótilo y primordios foliares.
    - Epicótilo: Tallo primitivo localizado entre el cotiledón y las primeras hojas verdaderas.

- Coleoptilo: Vaina protectora que rodea a la plúmula.
- Escutelo: Cotiledón transformado en órgano absorbente, adherida al endospermo.
- Hipocótilo: parte del eje embrionario que se encuentra por debajo del cotiledón
- Radícula: raíz primitiva
- Coleoriza: cubierta protectora que rodea a la radícula
- Pedúnculo: Extremo de la base del grano a través del cual éste se fija a la mazorca.



**Figura 1. Estructura de la semilla de maíz.** 1 y 2 son secciones verticales en dos planos de la semilla: a) Peicarpio, b) Aleurona, c) Endospermo, d) Escutelo, e) Capa glandular del escutelo, f) Coleoptilo, g) Plúmula con tallo y hojas, h) primer internodo, i) raíz lateral, j) Nodo escutelar, k) raíz primaria, l) Coleoriza, m) Células conductoras basales del endospermo, n) capa de abscisión, o) Piloriza o pedúnculo (Adaptado de Kiesselbach, 1999).

## **II. Germinación**

La germinación es la transición de un embrión inactivo hacia una planta fotosintéticamente activa; es un proceso complejo el cual comienza con la toma de agua por la semilla (imbibición) y el signo visible de que se ha completado es la emergencia de la radícula a través de la capa de la misma.

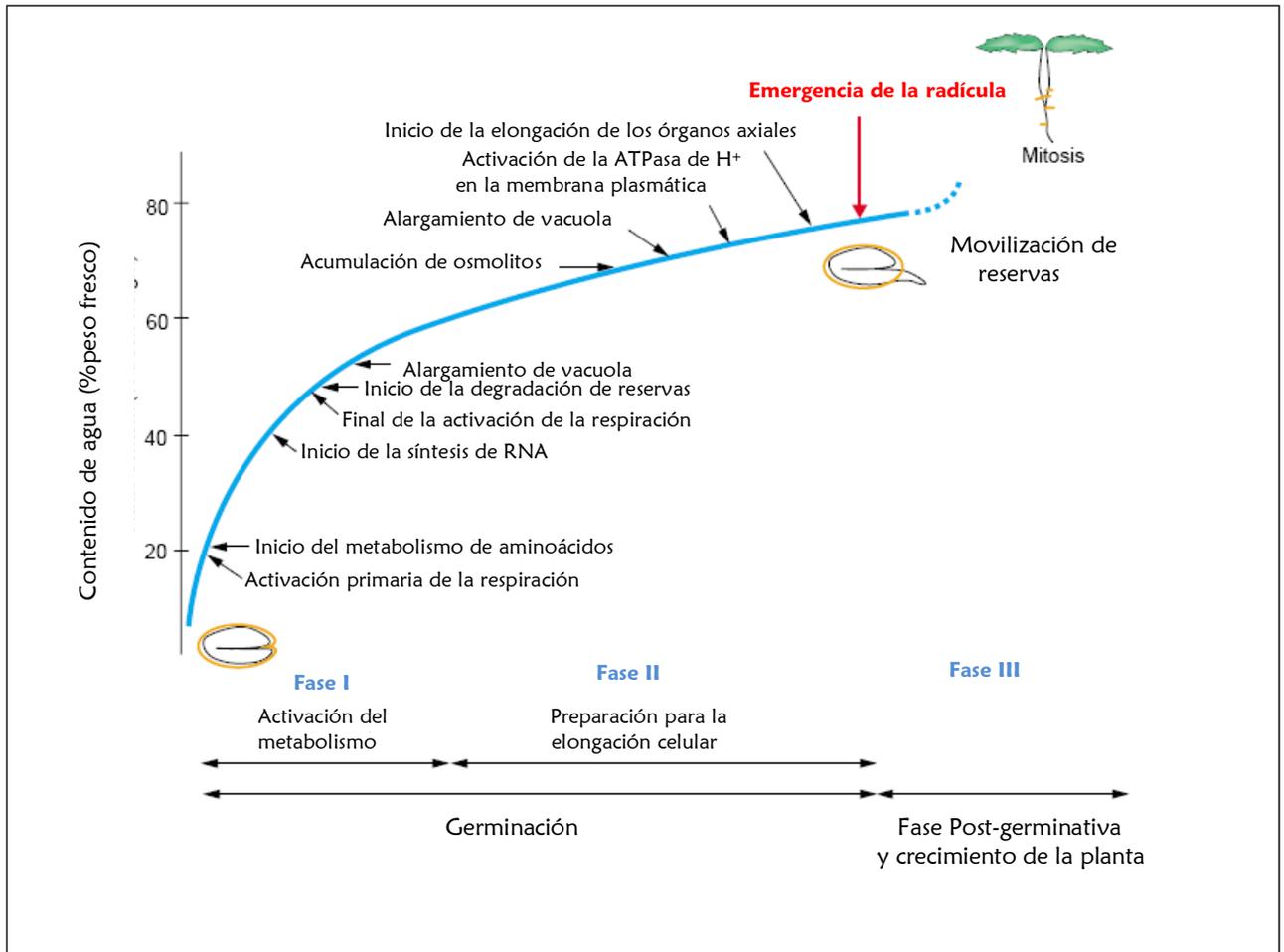
La germinación se da gracias a la combinación de muchos eventos celulares y metabólicos los cuales están coordinados por procesos como la dormancia en la semilla y una habilidad intrínseca por mantener bloqueada la elongación de la radícula; todo esto con el fin de optimizar el tiempo de germinación. (Bove, *et al*, 2001).

Durante el proceso de germinación existe una intensa actividad metabólica incluyendo cambios estructurales, respiración, síntesis de macromoléculas, síntesis hormonal y, finalmente, elongación celular. Cabe mencionar que la germinación no incluye el crecimiento de la planta como tal, ya que éste se da cuando la germinación concluye y depende de los metabolitos producidos por hidrólisis de las reservas almacenadas como proteínas, carbohidratos y lípidos. (Bewley, 2001)

Cuando la planta madre dispersa las semillas, éstas se encuentran en un estado inactivo en el cual tienen un bajo contenido de humedad (7-14%) y con una actividad metabólica escasa (Bewley, 2001); es por ello que para que la germinación ocurra, las semillas deben hidratarse bajo condiciones que favorezcan el metabolismo, tales como temperatura y presencia de oxígeno adecuadas. Durante el proceso de imbibición, la semilla seca absorbe agua rápidamente conforme pasa el tiempo (Fase I, Fig. 2), ya que incrementa la cantidad de células hidratadas dentro de la semilla lo cual conlleva a una reanudación del metabolismo básico. Cuando la hidratación dentro de la semilla alcanza un 60%, la velocidad de hidratación disminuye (Fase II, Fig. 2) y ocurren

nuevos mecanismos fisiológicos que preparan a la semilla para la elongación celular del eje embrionario. Durante esta fase, sustancias osmóticamente activas como azúcares, aminoácidos e iones potasio se acumulan en el interior de la célula y la acidificación de la pared celular conduce a un debilitamiento entre las uniones de los polímeros de la misma facilitando su elongación (Bove, 2001). Otros procesos celulares fundamentales que ocurren durante esta fase son la activación enzimática, biogénesis, reparación de organelos y síntesis de RNA y proteínas. El final de esta fase está marcado por la emergencia de la radícula a través de la capa de la semilla, para que esto pueda ocurrir tiene que haber una ruptura de los tejidos circundantes tales como el endospermo y la testa (Bewley, 2001).

Los nutrientes de reserva como lípidos, proteínas o almidón acumulados en el cotiledón y/o en el endospermo se movilizan antes de que la germinación termine y son usados en los pasos post-germinativos (Fase III, Fig. 2) para mantener a la planta joven en sus primeras etapas de crecimiento antes de que se transforme en autótrofa (Bove, 2001).



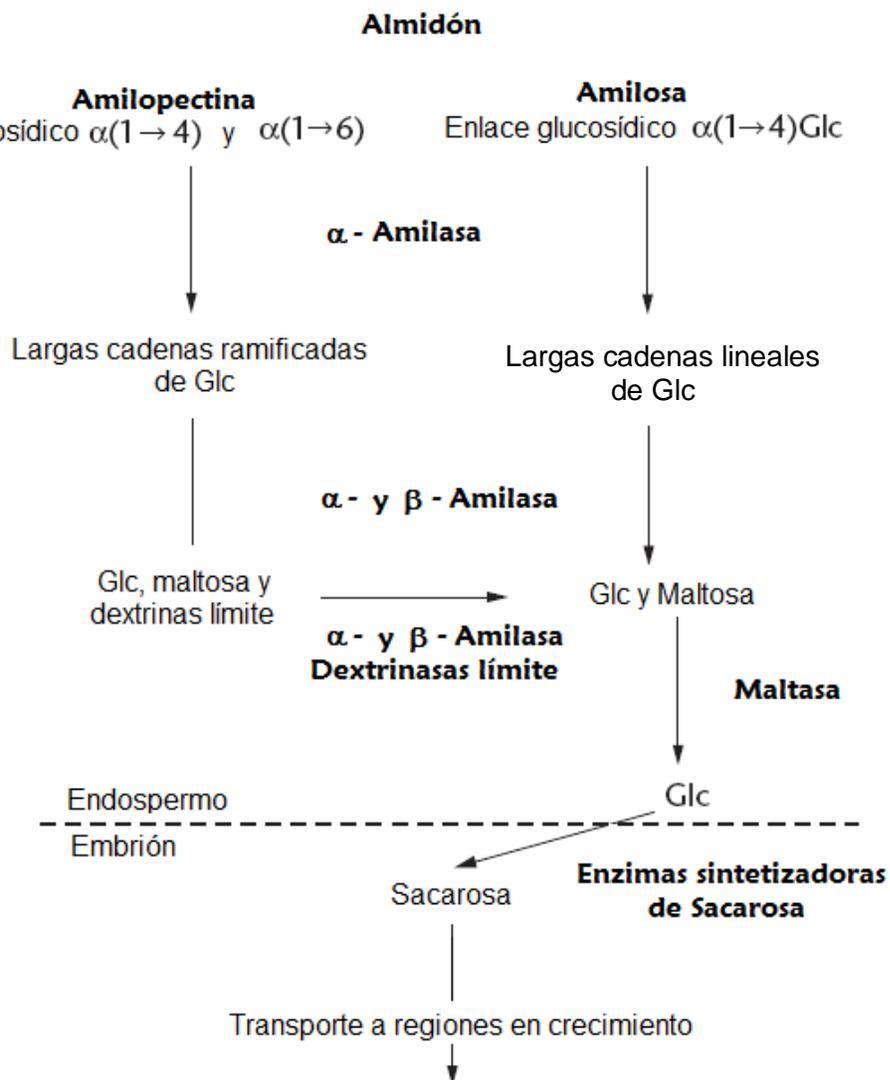
**Figura 2. Curva de toma de agua de las semillas.** Se pueden apreciar las tres fases que comprenden el proceso de germinación (Adaptado de Bove, *et al.*, 2001)

### III. Movilización de las reservas de carbono durante la germinación

Las plantas emplean diferentes estrategias para poder adaptarse a distintos ambientes y de este modo reproducirse y mantener la especie, una de ellas es la acumulación de grandes cantidades de ciertos compuestos que ayuden a cumplir dicho objetivo. Compuestos como carbohidratos, lípidos y proteínas son movilizados a lo largo del desarrollo de la planta y sus productos son empleados con diferentes propósitos tales como generación de energía o producción de “materia prima” para formar más células o tejidos (Buckeridge, *et al*, 1999).

La mayor parte de la movilización de las reservas en los órganos de almacén de las semillas comienza poco antes de que la germinación ha finalizado (Bewley, 2001).

Las reservas contenidas en las diferentes estructuras de la semilla son compuestos de alto peso molecular; durante su movilización son transformadas en moléculas de menor peso para que sean más fácilmente transportables a los tejidos demanda, como por ejemplo la hidrólisis del almidón. (Figura 3).



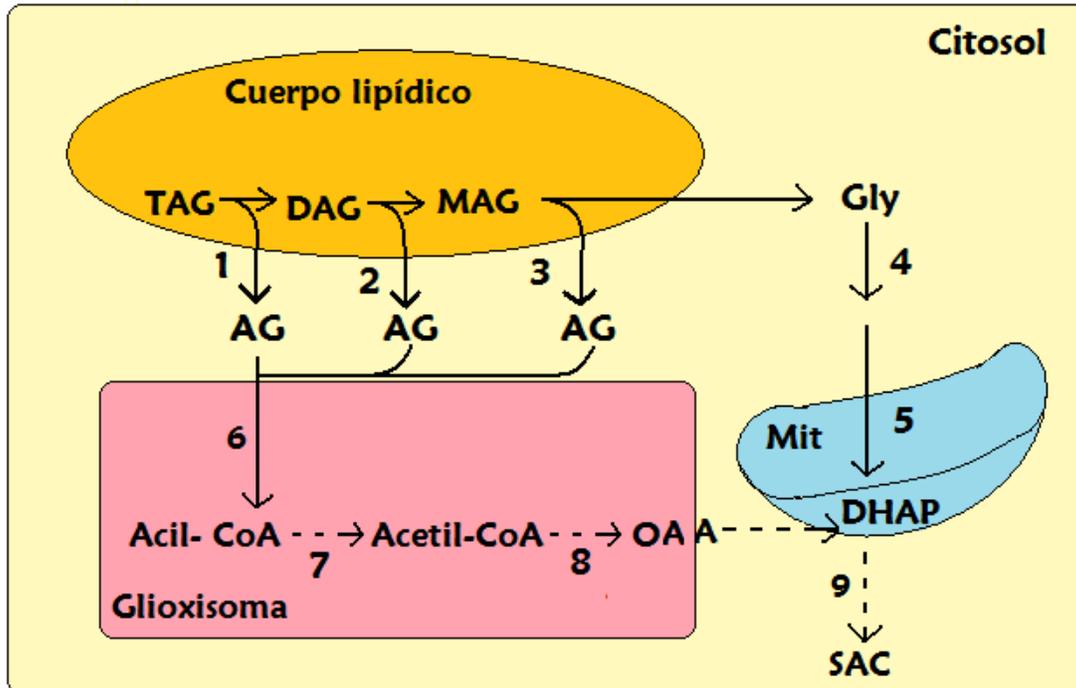
**Figura 3. Proceso de hidrólisis del almidón y uso en los tejidos embrionarios.** Se logra observar la hidrólisis de almidón contenido en el endospermo, los productos de la hidrólisis del almidón son transportados hacia el escutelo; se ha propuesto que ahí la glucosa es convertida en sacarosa para ser suministrada a los tejidos en crecimiento en el embrión (Adaptado de Bewley, 2001).

***Movilización de lípidos***

Para muchas plantas, los compuestos principales de reserva son los lípidos en forma de triacilgliceroles (TAGs); que son moléculas no polares y pueden ser almacenadas de una forma prácticamente anhidra. Su oxidación completa produce dos veces más energía que la producida por la hidrólisis de carbohidratos o proteínas (*Quettier, et al, 2009*).

En las semillas de maíz, el principal sitio de almacén de TAGs es el escutelo, representando aproximadamente el 37% de su peso seco. Cuando se inicia la germinación, los TAGs son degradados con el fin de producir fuente de carbono para sustentar la respiración y biosíntesis en los tejidos fuente, así como para alimentar al embrión en su crecimiento post-germinativo y convertirse en una planta fotosintéticamente activa.

Los TAGs son hidrolizados a ácidos grasos libres y glicerol por TAG lipasas; el glicerol es fosforilado y entra a la vía gluconeogénica después de ser convertido a dihidroxiacetona fosfato por la enzima Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa ( $\text{NAD}^+$ ). Los ácidos grasos libres son transportados hacia el glioxisoma, en donde son activados a Acil-CoAs para entrar a la  $\beta$ -oxidación. El Acetil-CoA producido por la  $\beta$ -oxidación es canalizado hacia el ciclo del glioxilato y posteriormente hacia la gluconeogénesis con el fin de producir carbohidratos que puedan sustentar el crecimiento del embrión (Figura 4).



**Figura 4. Diagrama general de la degradación de TAGs.** Los TAGs almacenados en los cuerpos lipídicos son hidrolizados a ácidos grasos (AG) y Glicerol (Gly) por acción de una o más lipasas (1, 2, 3); el Glicerol es convertido a Dihidroxiacetona fosfato (DHAP) por acción de la Glicerol cinasa (4) y la Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (5). Los ácidos grasos son transportados hacia el glioxisoma donde son activados a Acil-CoA (6) y entran al ciclo de la β-oxidación (7). Parte del Acetil-CoA producido se transforma en ácidos orgánicos como el oxaloacetato (OAA) por el ciclo del glioxilato (8). El OAA y el DHAP son convertidos a azúcares como la Sacarosa (SAC) mediante la gluconeogénesis (9) (Adaptado de Eastmond y Graham, 2001).

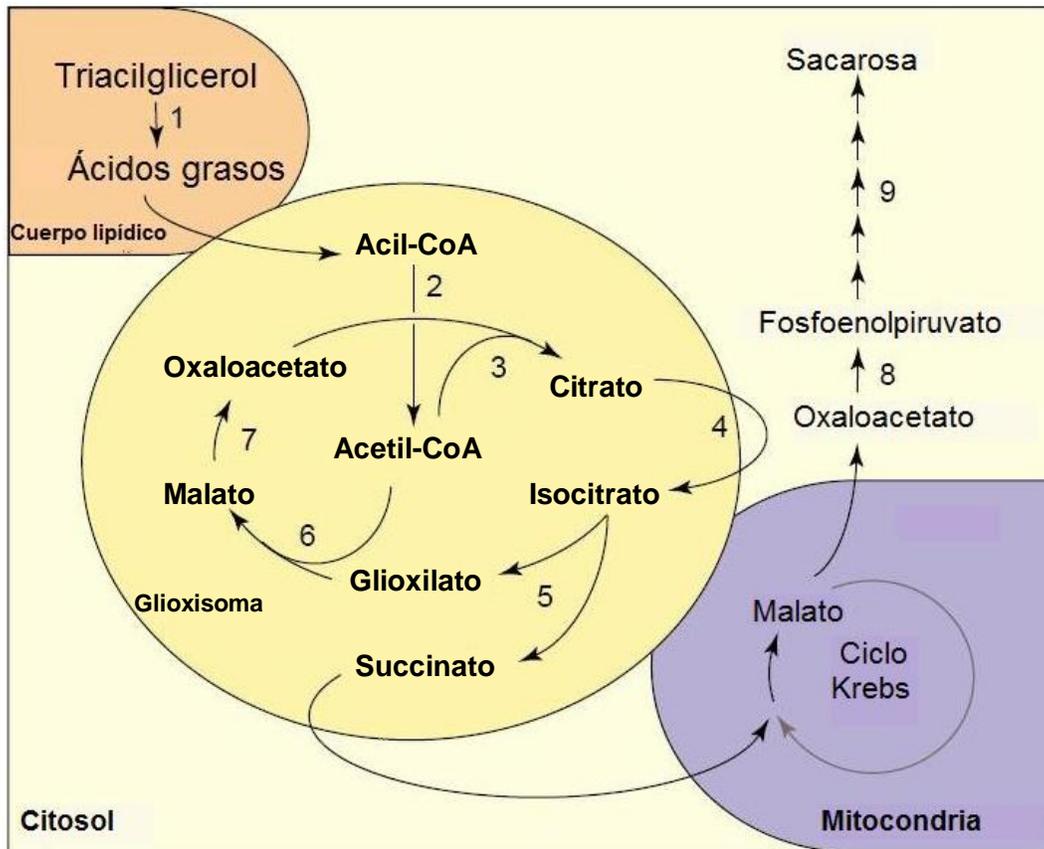
### **Ciclo del Glioxilato**

El Ciclo del glioxilato es una forma modificada del ciclo de Krebs inicialmente descubierto en microorganismos con la habilidad de crecer en medios con acetato o etanol como su única fuente de carbono (Cioni, 1980); posteriormente se descubrió que este ciclo también existe en semillas oleaginosas el cual se lleva a cabo en organelos especializados llamados glioxisomas.

Como se ha mencionado, durante la germinación las reservas son movilizadas para sustentar el desarrollo de la planta en formación. Durante todo este proceso el Ciclo del Glioxilato juega un papel importante ya que éste permite que el acetil-CoA derivado de la ruptura de los lípidos sirva como sustrato y pueda ser empleado en la síntesis de carbohidratos.

Tres de las cinco enzimas que participan en esta vía también son encontradas en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, éstas son: Citrato sintasa, Aconitasa y Malato deshidrogenasa; las dos enzimas restantes son únicas del Ciclo del glioxilato y estas son la Malato sintasa (MS) y la Isocitrato liasa (ICL) (Figura 5).

Por cada vuelta en el ciclo, se introducen dos moles de Acetil-CoA para la síntesis de un mol de succinato (molécula de 4 C), el succinato pasa del glioxisoma hacia la mitocondria para entrar al ciclo de Krebs en donde es transformado a malato; este malato producido es exportado hacia el citosol y es convertido a oxaloacetato por acción de la Malato deshidrogenasa citosólica. La Fosfoenolpiruvato carboxicinasa cataliza la conversión de oxaloacetato a fosfoenolpiruvato (PEP) para que éste finalmente entre a la vía gluconeogénica y así se lleve a cabo la síntesis de carbohidratos.



**Figura 5. Representación del Ciclo del Glioxilato.** Desde la utilización hasta la síntesis de sacarosa se ven involucrados cuatro compartimentos celulares: los cuerpos lipídicos, el glioxisoma, la mitocondria y el citosol. Las actividades enzimáticas implicadas en la movilización de carbono de lípidos hasta sacarosa son las siguientes: 1) Triacilglicerol lipasa, 2)  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos, 3) Citrato sintasa, 4) Aconitasa, 5) Isocitrato liasa, 6) Malato sintasa, 7) Malato deshidrogenasa, 8) PEP carboxinasa, 9) Gluconeogénesis (Adaptado de Eastmond y Graham, 2001).

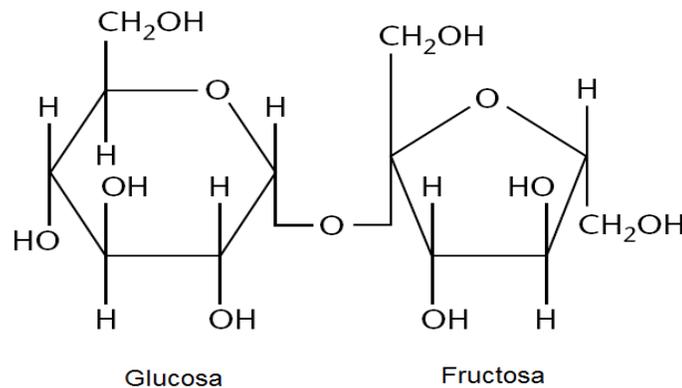
La expresión coordinada de los genes que codifican para la ICL y la MS está controlada transcripcionalmente durante la germinación y crecimiento post-germinativo de la planta. Estos genes también son inducidos durante el desarrollo del polen en ciertas plantas, durante la embriogénesis y la senescencia de los cotiledones y las hojas. De igual forma, ambas enzimas son inducidas en semillas que germinan en un medio ausente de sacarosa, por lo que se puede concluir que un factor importante en la expresión de las dos enzimas es este carbohidrato. Con base en lo anterior puede proponerse que la expresión de la MS y la ICL podría estar regulada por metabolitos. Una alta concentración de carbohidratos acumulados en el endospermo podría generar un efecto de retroalimentación sobre la síntesis de las enzimas (Cioni, 1980).

También se ha demostrado que la síntesis de ICL puede verse reprimida por el glioxilato, el cual es uno de los dos productos de la reacción que cataliza.

### **Metabolismo de la Sacarosa**

La sacarosa es la principal forma de carbono que se transporta en las plantas, sin embargo, éste no es su único papel, también es la fuente de carbono para el metabolismo, el almacenamiento, actúa como osmolito y además como molécula señal, por lo que su síntesis está altamente regulada.

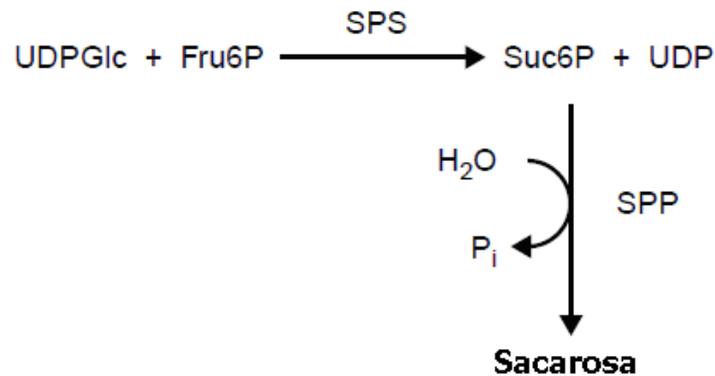
La sacarosa está compuesta por una molécula de glucosa y una de fructosa unidas a través de un enlace glucosídico ( $\alpha 1 \rightarrow \beta 2$ ) entre el carbono 1 de la glucosa y el carbono 2 de la fructosa (Figura 6). Se favorece el transporte de sacarosa que el de los monosacáridos debido a que es un azúcar no reductor y no es modificado durante su paso por el floema, no se requiere energía para hidrolizarla y de su hidrólisis se producen el doble de carbonos que el de las hexosas, además de que su solubilidad es el doble que la de la glucosa.



**Figura 6. Estructura de la Sacarosa** (King, 2002).

La síntesis de sacarosa se lleva a cabo en el citosol a través de dos vías metabólicas distintas, en donde intervienen las enzimas Sacarosa sintasa (SUSY), Sacarosa fosfato sintasa (SPS) y Sacarosa fosfatasa (SPP). SUSY cataliza la conversión de UDP-Glucosa y fructosa hacia sacarosa, en un paso reversible y

dependiente de UTP. SPS convierte la UDP-Glucosa y Fructosa-6-fosfato a Sacarosa-6-fosfato y la SPP la defosforila formando sacarosa (Wind, *et al*, 2010). Cabe señalar que la SUSY es una enzima que *in vivo* realiza la hidrólisis de la sacarosa, compitiendo con las invertasas citosólicas. Mientras que la SPS y la SPP sí se encuentran activamente realizando la síntesis de sacarosa (Figura 7).



**Figura 7. Síntesis de sacarosa a partir de UDPGlucosa.** La síntesis de sacarosa se encuentra regulada por los dos últimos pasos en la vía, catalizados por la Sacarosa fosfato sintasa (SPS) y la Sacarosa fosfatasa (SPP).

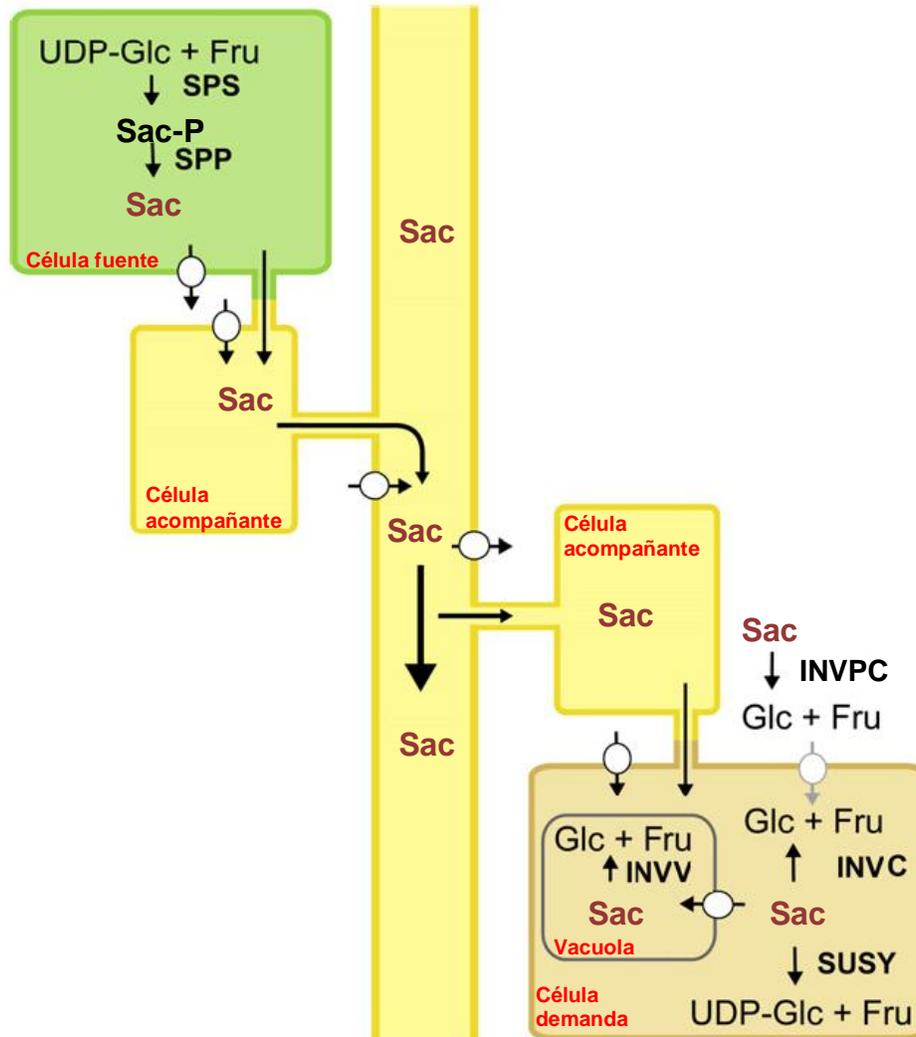
Como es de esperarse, la actividad de la SPS está altamente regulada y la transcripción de sus genes puede estar influenciada por agentes ambientales tales como la luz y el estrés osmótico. Además, su actividad es controlada por diversos factores intracelulares como la activación alostérica por la Glucosa-6-fosfato e inhibida por el fósforo inorgánico.

En el genoma de *Arabidopsis thaliana* hay cuatro genes que codifican para la enzima SPS, y del análisis y comparación de las secuencias de aminoácidos los miembros encontrados en ésta y otras plantas, se pueden clasificar en tres subfamilias denominadas A, B y C (Figura 8). En maíz se han identificado al menos 7 miembros de las SPS, con dos miembros en la subfamilia B y 1 pseudogene. Las SPS de la familia B tienden a expresarse en las hojas principales de las monocotiledóneas, tal es el caso para ZmSPS5a y ZmSPS5c.



De igual modo, se ha comprobado mediante reacciones de (RT)-PCR, que los genes para la SPS referentes a la familia B, están específicamente expresados en las células mesófilas de las hojas y en el escutelo de las semillas germinantes; adicionalmente, la expresión de estos genes depende de la presencia de luz en las hojas, sin embargo, en tejidos no fotosintéticos esto no ocurre.

Una vez que la sacarosa se sintetiza ésta es transportada desde la hoja hacia los tejidos que no tienen la capacidad de realizar la fotosíntesis, almacenada en la vacuola o metabolizada (Figura 9). El transporte de la sacarosa producida por las células fuente puede ser vía plasmodesmata hacia células vecinas, o bien, mediante transportadores de sacarosa para importarla hacia otras células u organelos.



**Figura 9. Esquemmatización de la síntesis y degradación de la Sacarosa.** Una vez que la sacarosa se sintetiza en el tejido fuente, ésta se transporta a los tejidos demanda, donde puede ser utilizada o almacenada. Se logra observar que la sacarosa apoplástica es hidrolizada a glucosa y fructosa por acción de la invertasa de pared celular (INVPC), estos monosacáridos son tomados por los transportadores de hexosas para internalizarlos a las células demanda. Por otro lado, la sacarosa ya contenida dentro de las células demanda puede ser almacenada dentro de vacuolas, lo cual requiere la presencia de transportadores de sacarosa en el tonoplasto (Adaptado de Wind, 2010).

En el metabolismo de la sacarosa están involucradas dos enzimas: la SUSY y las Invertasas (INV) de las cuales hay tres subfamilias, las invertasas vacuolares (INVV), las invertasas citosólicas (INVC) y las invertasas de la pared celular (INVPC). En tejidos demanda, la acción de la invertasa vacuolar está enfocada hacia el crecimiento y expansión celular, mientras que la Sacarosa sintasa está asociada a la biosíntesis de compuestos de almacén (Weber, *et al*, 1997).

#### **IV. *Fusarium verticillioides***

##### ***Características generales***

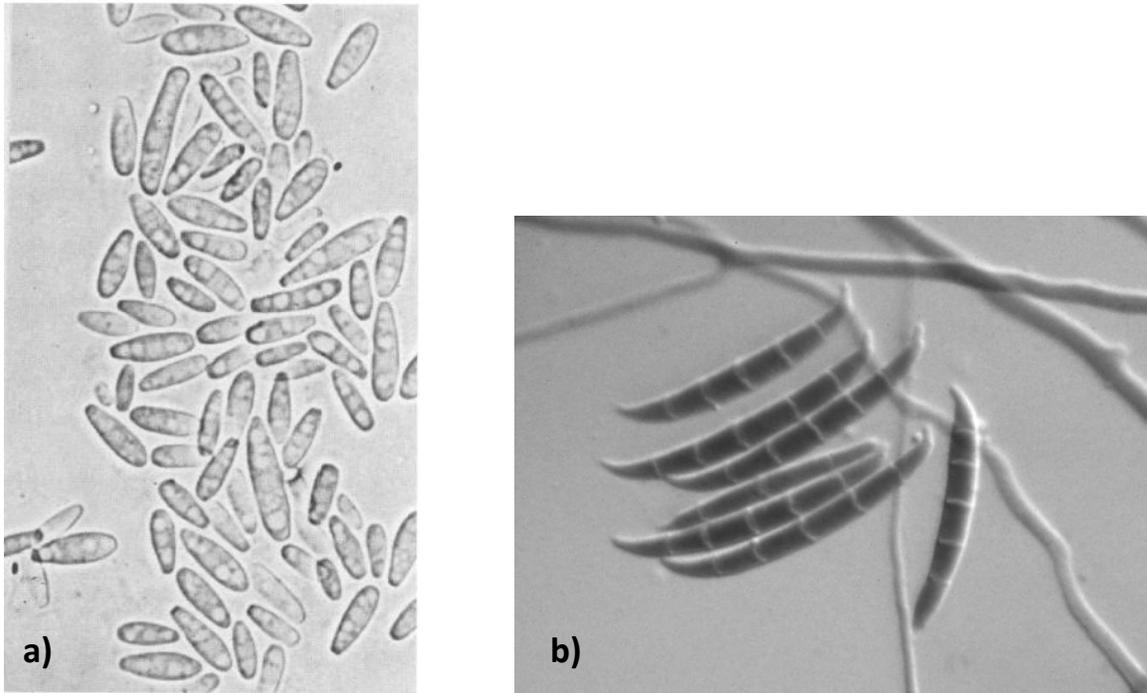
Las plantas a lo largo de su ciclo de vida están expuestas a los cambios en las condiciones ambientales, cambios en la intensidad luminosa, frío, sequía, lluvias, al ataque de patógenos, entre otros. La semilla es una estructura con un alto contenido de nutrientes y resulta un blanco atractivo y susceptible a ser colonizada por microorganismos patógenos.

Dentro de los patógenos principales que se aíslan de *Zea mays* en climas templados se encuentra el hongo *Fusarium verticillioides*, su importancia radica en que produce metabolitos secundarios tóxicos tanto para el humano como para los animales, además de ser un agente capaz de causar pudrición en la planta de maíz (Duncan, *et al*, 2009).

*Fusarium verticillioides* es un hongo ascomiceto de distribución cosmopolita asociado no sólo al maíz, sino a otras especies de plantas (Glenn, *et al*, 2001).

El género *Fusarium* se caracteriza por la producción de tres tipos de esporas: macroconidias, microconidias y clamidosporas. Algunas especies pueden producir los tres tipos de esporas mientras que otras especies no; en el caso específico de *Fusarium verticillioides* únicamente presenta macroconidias y microconidias.

Las macroconidias son escasas, tienen una muy ligera forma de hoz a casi rectas, presentan por lo general de cinco a seis septos y miden aproximadamente 31-58 x 2.7-3.6  $\mu\text{m}$ . Por otro lado, las microconidias son abundantes, presentan septos y tienen forma ovalada, miden aproximadamente 7-10 x 2.5-3.2  $\mu\text{m}$  (Dr. Fungus, 2010).



**Figura 10. Formas microscópicas de *Fusarium verticillioides*.** a) Microconidias y b) Macroconidias. (Nelson, *et al*, 1994; Dr. Fungus, 2010).

### ***Efectos de Fusarium verticillioides en la planta de maíz***

Dentro de las enfermedades del maíz atribuidas a *F. verticillioides* están la pudrición de estructuras como la semilla, raíz, tallo y mazorca, así como el marchitar a la planta completa; a pesar de lo anterior, el hongo también es capaz de provocar infecciones asintomáticas, es decir, no provocan un daño visible. El establecimiento de las conidias sobre las hojas o mazorcas de la planta pueden favorecerse dependiendo de las condiciones ambientales (Nelson, *et al*, 1994).

La infección del maíz por *F. verticillioides* puede ocurrir por varias rutas; la más comúnmente reportada es mediante el transporte de las conidias a través del aire para así implantarse en el estigma. De este modo, después de la invasión del estigma, el hongo puede infectar al grano pero sólo un pequeño porcentaje de estos granos infectados presentan síntomas. Otra propuesta de infección de la mazorca y el grano es que ocurra como resultado de una infección sistémica de la semilla. La infección puede comenzar con la presencia de una conidia o micelio

del hongo dentro o sobre la semilla, cuando ésta germina y se va desarrollando, el hongo puede transportarse dentro de la planta joven e ir moviéndose desde las raíces a través del tallo para finalmente llegar a la mazorca y los granos (Oren, *et al*, 2002). Debido a que el hongo posee una gran capacidad para sobrevivir en el suelo es posible que se lleven a cabo las infecciones sistémicas y así pueda reproducirse (Figura 11).



**Figura 11.** Mazorca infectada por *Fusarium verticillioides*

La presencia de *F. verticillioides* en la planta de maíz puede promover la infestación de la misma con plagas como lepidópteros y coleópteros. Dicha atracción podría deberse a la liberación de compuestos volátiles de la planta cuando el patógeno la coloniza e infecta. Estos compuestos pueden ser ciertos alcoholes, ésteres y aldehídos que resulten atractivos para algunos insectos. Al propiciar la invasión de la planta, incrementa el daño en las mazorcas provocado por los insectos, lo que favorece la penetración de *Fusarium* hacia otras estructuras de la planta, además le proporciona abundantes cantidades de carbohidratos para sustentar su crecimiento saprofito resultando en la pudrición de la planta y producción de las micotoxinas (Glenn, 2007).

A pesar de lo anterior, también se ha demostrado que en el intento de la planta por eliminar al microorganismo de su sistema se pueden obtener ciertos beneficios para la misma. Dentro de estos beneficios se incluyen un desarrollo mejorado de la raíz, una mayor tolerancia a la sequía y una mayor protección contra herbívoros debido a la producción de compuestos tóxicos. Sin embargo, estas características que resultan ser temporalmente favorables para la planta, no lo son para el humano (Munkvold, *et al*, 1997).

### ***Producción de toxinas por *Fusarium verticillioides****

Las micotoxinas son metabolitos fúngicos de bajo peso molecular que son tóxicos para los vertebrados; éstas pueden ocasionar efectos adversos dramáticos en la salud del humano y animales domésticos que consumen productos agrícolas contaminados (Desjardins, *et al*, 1996).

*Fusarium verticillioides* produce varias micotoxinas potencialmente dañinas para el ser humano y animales domésticos. Dentro de estas toxinas se encuentran la moniliformina, fusarinas y fumonisinas, siendo estas últimas las más significativas debido a su toxicidad.

Estructuralmente, las fumonisinas se caracterizan por tener una cadena base de 20 Carbonos (Figura 12) y un grupo amino en el C-2 y grupos de ácido tricarbálico esterificado en el C-14 y C-15, las estructuras de las fumonisinas B1, B2, B3 y B4 difieren entre sí por la posición en la que grupos hidroxilo o hidrógeno se encuentren sustituidos en el C-5 y C-10 (Bush, 2001).

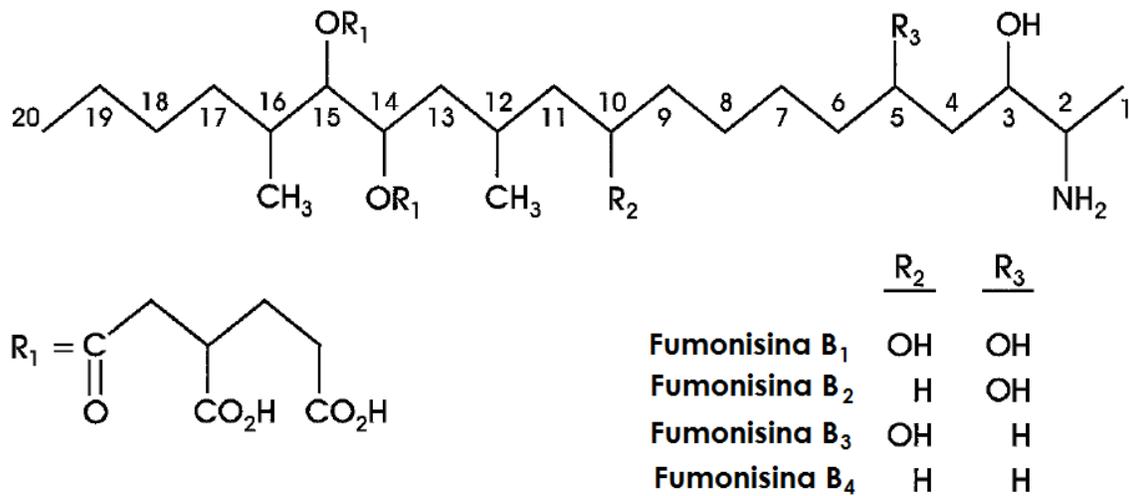


Figura 12. Estructura química de las fumonisinas (Desjardins, et al, 1997).

La fumonisina B<sub>1</sub> (FB<sub>1</sub>) es la toxina predominante producida por *F. verticillioides*, es un potente inhibidor de la ceramida sintasa lo cual interrumpe la biosíntesis de los esfingolípidos. Estructuralmente hablando, las fumonisinas son similares a las bases de cadena larga de los esfingolípidos; estas micotoxinas en general inhiben la actividad de la esfingosina N-acetil transferasa provocando la acumulación de bases esfingoideas tóxicas. De igual modo, las fumonisinas inducen apoptosis en varios tejidos humanos y animales (Desjardins, et al, 1996).

La biosíntesis de FB<sub>1</sub> está influenciada por componentes del grano de maíz, uno de estos componentes es el almidón el cual, como se ha mencionado, cambia dramáticamente conforme el grano madura y germina. En granos inmaduros y deficientes de almidón la biosíntesis de FB<sub>1</sub> no se ve sustentada; sin embargo, en granos maduros y con una gran cantidad de almidón almacenado se obtienen altos niveles de producción de esta fumonisina (Bluhm, et al, 2008).

**Efecto de las fumonisinas en humanos**

Las micotoxicosis son enfermedades causadas por la ingestión de alimentos contaminados con toxinas fúngicas (Nelson, 1993). Los factores que intervienen en la aparición de un brote de micotoxicosis son:

- a) La infección de una planta hospedera susceptible por un hongo productor de toxinas,
- b) Presencia de factores ambientales favorables para el desarrollo de la enfermedad,
- c) Capacidad genética del patógeno para producir metabolitos nocivos para los humanos y animales,
- d) Existencia de condiciones ambientales favorables para la acumulación de toxinas suficientes en la planta para causar toxicosis al consumidor,
- e) El consumo de cantidades suficientes de toxinas para causar la enfermedad.

El Centro Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC) catalogó en 2002 a las fumonisinas como posibles compuestos cancerígenos para el humano. El consumo accidental de la FB<sub>1</sub> está fuertemente relacionado con la incidencia de cáncer esofágico humano (Pereira, *et al*, 2010). De igual modo, *F. verticillioides* está también asociado a otras enfermedades humanas tales como eumicetoma, hialohifomicosis y queratitis (Granjo, *et al*, 2007).

Las fumonisinas también están implicadas en una enfermedad aguda de origen alimenticio en la India, la cual se caracteriza por borborismos (los sonidos generados por el movimiento de los gases a través de los intestinos), dolor abdominal y diarreas que están asociados al consumo de maíz y sorgo contaminados con altos niveles de fumonisinas (Mohamed, 2010).

Otro efecto que se presenta debido a que las fumonisinas son inhibidoras de la correcta captación del ácido fólico, es la aparición de defectos en el tubo neural en

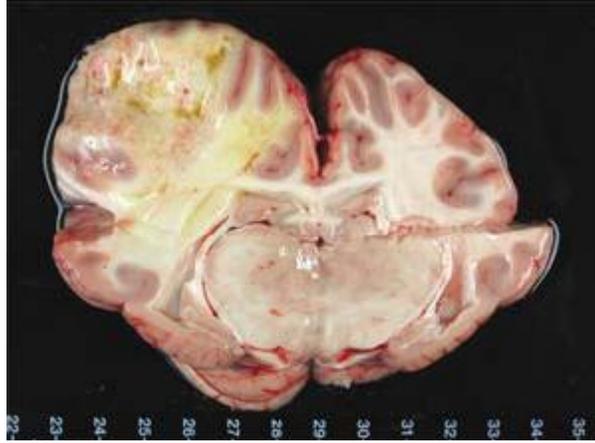
poblaciones rurales de Sudáfrica y áreas del norte de China que, se sabe, consumen maíz contaminado con dichas micotoxinas (Zain, 2010).

### ***Efecto de las fumonisinas en animales***

- ***No rumiantes***

El modo de acción en el que las fumonisinas afectan a animales no rumiantes como caballos, puercos y ratas está relacionado con la interrupción del metabolismo de esfingolípidos. Como sabemos, las fumonisinas son estructuralmente similares a las esfinganina, un intermediario de la biosíntesis de esfingolípidos complejos. Estos esfingolípidos son componentes de los cerebrósidos y otros lípidos encontrados en el cerebro y tejido nervioso, por lo que una interrupción en la formación de estos compuestos puede generar un desorden en las funciones cerebrales (Bush, 2001). Además de ser compuestos abundantes en tejidos neuronales, los esfingolípidos también son componentes importantes de la membrana de muchos otros tipos de células y están involucrados en procesos de crecimiento y diferenciación celular. Por lo tanto, la inhibición del metabolismo de esfingolípidos podría provocar una amplia gama de efectos fisiológicos incluyendo la promoción de tumores (Nelson, 1993).

Dentro de las enfermedades más dramáticas en animales se encuentran la Leucoencefalomalacia equina, una enfermedad cerebral fatal que afecta a caballos, burros, mulas y conejos, causada por el consumo de alimentos contaminados con *F. verticillioides*. Está caracterizada por una necrosis licuefactiva de la materia blanca de uno o ambos hemisferios cerebrales (Figura 13). Los signos clínicos de la intoxicación aparecen abruptamente y el animal muestra apatía, aspecto somnoliento y lengua colgante, da vueltas sin rumbo y padece ataxia. Estos signos de desorden nervioso se vuelven más pronunciados conforme pasa el tiempo, posteriormente el animal se torna extremadamente excitado y frenético hasta que finalmente muere (Nelson, 1993).



**Figura 13. Cerebro equino.** Sección transversal del cerebro a nivel parietal con incremento del hemisferio izquierdo. Se observa reblandecimiento del tejido nervioso que ha adquirido coloración amarillenta y se ha perdido la separación entre materia gris y blanca (RECVET, 2007).

Otra de las enfermedades asociadas con el consumo de maíz infectado con fumonisinas es el edema pulmonar porcino el cual se caracteriza por hidrotórax y un edema pulmonar extremadamente marcado.

En ratas de laboratorio las cuales fueron alimentadas con maíz contaminado se produjo cirrosis e hiperplasia nodular en el hígado, así como lesiones endocárdicas agudas y proliferativas y trombosis intraventricular. En estas ratas el tiempo promedio de muerte fue de 24 días (Munkvold, *et al*, 1997).

- **Rumiantes**

Los rumiantes como vacas, ovejas, cabras y ciervos son menos sensibles a los efectos negativos de las micotoxinas; esto puede ser debido a que la flora habitual de estos animales es capaz de degradar a las micotoxinas. Sin embargo, la producción de leche, carne o lana, así como su reproducción y crecimiento pueden verse afectados cuando consumen alimentos contaminados por un largo período de tiempo (Zain, 2010).

### ***Impacto económico y control biológico***

Existen varios criterios para evaluar el impacto económico que tienen las micotoxinas sobre el humano y los animales. Dentro de los factores a tomar en cuenta se incluyen pérdidas de vidas humanas y animales, aumento en los costos de cuidados veterinarios, pérdidas en la producción de ganado, pérdida en los cultivos alimenticios, aumento de costos regulatorios y de investigación enfocada en aliviar la gravedad del problema de las micotoxinas (Zain, 2010).

A pesar de estas consideraciones, el impacto económico de las micotoxinas es difícil de medir ya que la información sobre enfermedades en el ganado y pérdidas en la productividad debido a la exposición crónica es en gran parte anecdótica (Wu, 2007).

Expertos de la FAO han estimado que cerca del 25% de la producción mundial de alimentos se pierde cada año debido a la contaminación por micotoxinas (Norhasima, 2009). Estudios también han demostrado que la extensa contaminación de alimentos está presente tanto en países en vías de desarrollo como en desarrollados.

Como se puede observar, los riesgos directos a la salud, pérdidas económicas e implicaciones derivadas de las micotoxicosis son de suma importancia. Incluso muchos países en desarrollo se han percatado que reduciendo los niveles de micotoxinas en los alimentos no sólo reduciría la carga financiera debida al cuidado de la salud, sino que también se podrían obtener ventajas económicas al exportar productos a los mercados europeos. Es por ello que a lo largo del tiempo se han ido implementando ciertas prácticas agronómicas específicas con el fin de reducir la presencia de las micotoxinas en los cultivos (Zain, 2010). Dentro de dichas prácticas se encuentran:

- a) **Cosecha temprana:** Se sabe que mientras más pronto se cosechen los cultivos, la probabilidad de que estos se infecten por hongos es menor.
  
- b) **Secado apropiado:** un secado rápido de los productos agrícolas y mantenerlos en un nivel bajo de humedad durante su almacén es fundamental, ya que bajo estas condiciones es menos favorable la proliferación y crecimiento del hongo e incluso la infestación por insectos.
  
- c) **Correcto tratamiento físico:** poner especial atención al momento de separar los granos contaminados del resto, obviamente esto dependerá del grado de contaminación de la cosecha y si sólo implica una pequeña porción de los granos totales.
  
- d) **Sanidad:** medidas básicas de higiene como la eliminación o destrucción de los desechos de las cosechas anteriores, así como limpiar periódicamente los almacenes antes de guardar nuevos productos, ayudan a minimizar la infección e infestación de los frutos agrícolas.
  
- e) **Manejo de plagas:** se sabe que los insectos pueden actuar como vectores de conidias del hongo y favorecer la infección de las plantas, es por ello que con un buen control de plagas mediante el uso de insecticidas puede funcionar para evitar la contaminación por micotoxinas.

## JUSTIFICACIÓN

Durante la germinación de las semillas se realiza la movilización de las reservas para el crecimiento y posterior establecimiento de la nueva planta como organismo fotosintético. Tanto los carbohidratos, proteínas y lípidos experimentarán su hidrólisis para proporcionar carbono, nitrógeno y energía al embrión en crecimiento. Sin embargo, de todas las reservas contenidas en la semilla los lípidos son los que sustentarán el crecimiento por un mayor tiempo, esto es desde antes de que la radícula emerja y hasta que se convierta en un organismo autótrofo.

En el maíz, los TGAs son abundantes en los embriones, representan cerca del 40% de su peso seco y deben ser movilizados para nutrir al eje embrionario. Para que pueda ser utilizado el TGA como nutriente debe ser metabolizado por el ciclo del glioxilato y de ahí continuar hacia la gluconeogénesis, habiendo utilizado el acetil-CoA que se produce después de que ha ocurrido la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos liberados de los TGAs. A semejanza de lo que sucede en las hojas de una planta madura, los escutelos sintetizarán sacarosa para donarla al tejido demandante, que en este caso es el eje embrionario. Postulamos que uno de los destinos finales del acetil-CoA será en el esqueleto de la sacarosa ya que se ha encontrado que plantas mutantes en la ICL (isocitrato liasa) pueden sobrevivir sólo si se ha suplementado al medio con sacarosa, si el carbohidrato no se añade las plantúlas disminuyen su crecimiento considerablemente (Eastmond *et al.*, 2000). Además, se ha demostrado que la adición de glucosa al medio de crecimiento de semillas de *Arabidopsis thaliana* retarda la utilización de lípidos (To *et al.*, 2002). Sin embargo, aún cuando es importante la movilización de lípidos, no es esencial para que la germinación ocurra, pero sí para que el crecimiento postgerminativo y el establecimiento de la planta suceda.

En experimentos previos en el laboratorio se encontró que en las primeras 8 h de la germinación hay una reducción de cerca del 60% en el contenido de sacarosa,

tanto del embrión completo como del eje embrionario con respecto al eje o embrión seco, y en el caso del eje embrionario la reducción continúa hasta alcanzar un contenido residual del 10% a las 60 h de la germinación. Mientras que los embriones experimentan la reducción inicial, pero después de las 12 h se incrementa el contenido de sacarosa un 55% respecto al tiempo cero y se mantiene en un 60% hasta las 60 h de la germinación (Martínez-Marcelo, 2008). Lo anterior indica que los escutelos son los que presentan un metabolismo activo de síntesis de sacarosa y que probablemente los TGA de ese tejido proveen de los esqueletos carbonados de la sacarosa.

Por lo que uno de los primeros objetivos de este trabajo es determinar la actividad de la MS durante la germinación de los embriones de maíz y correlacionar su actividad con la del incremento en los niveles de sacarosa después de las 12 horas de la germinación.

Además, investigamos si la actividad de la enzima podía ser modificada al exponer al tejido embrionario de maíz a un estrés que se ha planteado modifica los contenidos de carbohidratos: el estrés por patógenos. Lo anterior nos indicaría que los embriones están percibiendo los cambios en los niveles de algunos metabolitos, como los contenidos de sacarosa y dando una respuesta a nivel de la expresión genética y por tanto en actividad biológica del producto proteico, que en este trabajo será la actividad enzimática de la Malato sintasa. Poniendo en evidencia la regulación que la planta puede ejercer para la producción de asimilados en los tejidos fuente, en este caso el escutelo, y su distribución específica hacia los tejidos demanda, los ejes embrionarios, y su subsecuente utilización.

La modificación en la expresión de la actividad del ciclo del glioxilato se relacionará con los contenidos de sacarosa, datos que complementarían los resultados que encontramos en el laboratorio sobre el aumento en la expresión de los transcritos para los transportadores de sacarosa y hexosas por efecto de la

infección con el hongo (Guzmán-Chavéz, 2010) y que ponen de manifiesto la respuesta de la planta, lo que modifica tanto la disponibilidad como el metabolismo de carbono del huésped.

## HIPÓTESIS

- El incremento de sacarosa sólo ocurre en los embriones de maíz y no en los ejes embrionarios, entonces los lípidos contenidos en el escutelo están siendo metabolizados y sus productos son dirigidos al ciclo del glioxilato para producir sacarosa.
- Además, conociendo que durante condiciones de estrés biótico se producen cambios en el contenido de carbohidratos, entonces la infección de embriones con un patógeno llevará a aumentar la actividad del ciclo del glioxilato para producir sacarosa.

## OBJETIVOS

### **Objetivo general**

- Determinar si hay una relación entre la movilización de TGAs, la actividad de la Malato Sintasa y el contenido de sacarosa en el embrión de maíz; y evaluar si esta relación cambia en presencia de *Fusarium verticillioides*.

### **Objetivos particulares**

- 1) Confirmar que el contenido de sacarosa aumenta durante la segunda fase de la germinación de los embriones de maíz.
  - Mediante la detección *in situ* del contenido de sacarosa.
- 2) Analizar la movilización de lípidos en los escutelos y ejes embrionarios de maíz.
- 3) Medir los niveles de la Malato Sintasa en los embriones germinados diferentes tiempos.
  - Mediante una reacción acoplada *in situ*.
- 4) Medir el efecto de *Fusarium verticillioides* sobre el metabolismo de carbono en los embriones a diferentes tiempos de germinación con el patógeno.
  - Mediante la determinación *in situ* de la actividad de la Malato Sintasa.
  - Detectando el contenido de sacarosa en los embriones germinados con el hongo.
- 5) Comparar las actividades de la Malato sintasa y los contenidos de sacarosa en presencia y ausencia del patógeno.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Para la realización del presente trabajo la estrategia experimental se dividió en dos partes: en la primera de ellas se trabajó con embriones no infectados y en la segunda se utilizaron embriones infectados con *Fusarium verticillioides* (Figura 14). En primer lugar se analizó la movilización de lípidos tanto en los escutelos como en los ejes embrionarios de maíz, posteriormente se determinó la actividad de la enzima MS mediante una reacción acoplada *in situ* y finalmente se cuantificó el contenido de sacarosa en los embriones germinados. Por otra parte, los embriones se infectaron con conidios del hongo para posteriormente ser germinados y determinar la actividad de la MS, así como cuantificar el contenido de sacarosa en los embriones infectados.

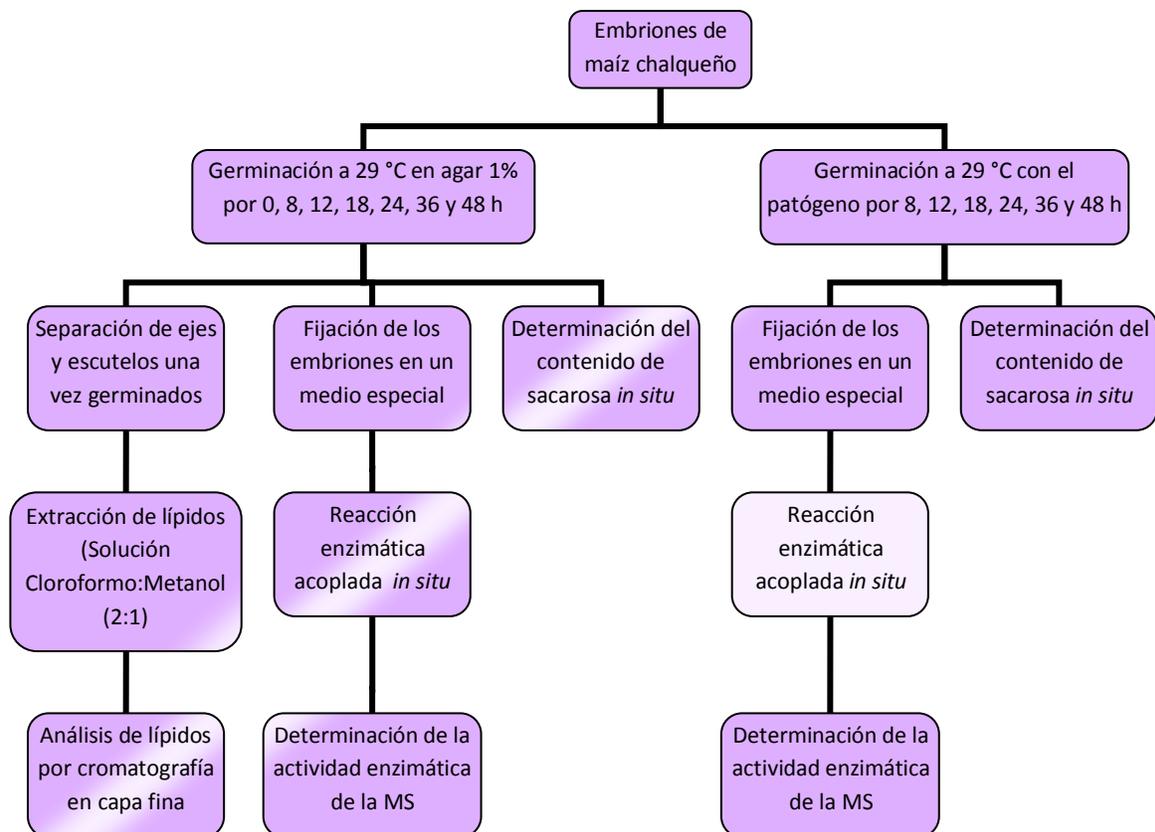


Figura 14. Diagrama general del trabajo experimental.

### **Germinación**

Se utilizaron 10 embriones de *Zea mays* variedad chalqueño para cada tiempo de germinación. Se lavaron con una solución de hipoclorito de sodio al 2% durante dos minutos con una agitación vigorosa, posteriormente se secaron con discos de papel filtro estéril para después enjuagarlos con abundante agua desionizada estéril hasta que no se percibiera el olor a hipoclorito. Una vez desinfectados, los embriones se embebieron en agar al 1% y se incubaron durante 8, 12, 18, 24, 36 y 48 horas a una temperatura de 29 °C. Este procedimiento se realizó en condiciones de esterilidad en una campana de flujo laminar.

### **Infeción de los embriones de maíz con conidios del patógeno *Fusarium verticillioides***

**Obtención del concentrado de conidios.** Para la segunda parte del trabajo experimental se utilizó la cepa MY3 de *Fusarium verticillioides* que produce altos niveles de fumonisinas (Sánchez-Rangel, *et al*, 2005) con tres semanas de crecimiento en una caja petri con agar Papa Dextrosa 0.5X. Se agregaron 5 mL de agua desionizada estéril a dicho cultivo y la caja se puso en agitación moderada por 30 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se recolectó la suspensión de conidios en un tubo eppendorf estéril de 1.5 mL; este tubo se centrifugó a 13,000 rpm por 15 minutos a 4 °C, se desecharon tres cuartas partes del sobrenadante, se resuspendió el botón obtenido y se llevó al aforo de 1.5 mL con agua estéril. Este tubo se centrifugó de nuevo a 13,000 rpm por 15 minutos a 4 °C, una vez transcurrido el tiempo se desechó todo el sobrenadante y se adicionó 1 mL de agua estéril para resuspender el botón formado. Esta solución final fue la que se denominó “Concentrado de conidios” a partir de la cual se hicieron las diluciones correspondientes tanto para el conteo de conidios como para la infección de los embriones.

**Conteo de conidios e infección de los embriones.** En un tubo eppendorf se colocaron 10  $\mu\text{L}$  de la suspensión concentrada de conidios obtenida en el punto anterior y se adicionaron 990  $\mu\text{L}$  de agua estéril desionizada con el fin de obtener una dilución 1:100. De esta dilución se tomaron 10  $\mu\text{L}$  con los cuales se cargó la cámara de Neubauer para realizar el conteo de conidios en cada cuadrante. Con los resultados del conteo se realizaron los cálculos necesarios para infectar al embrión de maíz con un volumen de 10  $\mu\text{L}$  que contuviera 60,000 conidios. Dicho inóculo se preparó a partir del concentrado de conidios. Una vez obtenido el inóculo correspondiente, se utilizaron embriones de maíz previamente desinfectados con hipoclorito de sodio al 2%, se embebieron en agar al 1% y se agregó el inóculo de 10  $\mu\text{L}$  de la suspensión a lo largo de todo el embrión de maíz. Estos embriones se dejaron germinar por 8, 12, 18, 24, 36 y 48 horas para posteriormente ser fijados por el procedimiento ya antes descrito y así ser almacenados hasta su uso.

### ***Extracción de lípidos***

Una vez germinados los embriones, se separaron los ejes embrionarios de los escutelos. En un mortero se molieron 0.1 g de cada tejido con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino, se adicionaron 5 mL de una solución de cloroformo: metanol (2:1), una vez obtenido el extracto se colocó en un tubo Falcon y se centrifugó a 3000 rpm por 5 minutos. Transcurrido este tiempo el sobrenadante obtenido se trasvasó a un tubo de ensayo rotulado y a peso constante, el botón se resuspendió en 2.5 mL de la misma solución e igualmente se centrifugó a 3000 rpm por 5 minutos, este sobrenadante se mezcló con el primer sobrenadante obtenido y el tubo se calentó a 70 °C en un bloque de calentamiento con el fin de eliminar todo el disolvente. Por último, el contenido de lípidos totales se calculó por diferencia de peso. Cada extracción se realizó por triplicado.

***Análisis de lípidos por cromatografía en capa fina***

Los lípidos totales obtenidos en el paso anterior se resuspendieron con 300  $\mu\text{L}$  de la solución cloroformo: metanol, los tubos se agitaron vigorosamente y de cada tiempo de germinación se tomaron 4  $\mu\text{L}$  para aplicarlos sobre placas de gel de sílice de 10X20 cm para su análisis por cromatografía en capa fina (TLC). De igual modo, se aplicaron 2  $\mu\text{L}$  de un estándar de TGAs sintetizado en el laboratorio 115 del Conjunto E de la Facultad de Química, cuya obtención se describe más adelante. Las placas se colocaron dentro de una cámara de elución y se desarrollaron hasta el final con una fase móvil compuesta por hexano: éter etílico: ácido acético (70:30:1, v/v). El revelado de las placas se llevó a cabo con vapores de yodo y con vainillina sulfúrica. Posteriormente las placas reveladas se escanearon y los TGAs se cuantificaron realizando la densitometría de cada una de las bandas usando el programa de BIORAD, Quantity One-4.6.3. En el apéndice se muestran tres placas de los tres extractos obtenidos.

***Obtención del estándar de TGAs.*** Para obtener el estándar se colocaron 100 mg de glicerol y 1 mL de piridina en un matraz de bola; este matraz se colocó en un baño de hielo y se le fue adicionando por goteo 1 mL de cloruro de hexanoilo mientras se agitaba lentamente. Después de la adición, la mezcla se dejó reaccionar con agitación magnética durante 24 horas a temperatura ambiente. El curso de la reacción se monitoreó mediante cromatografía en capa fina. Al producto de reacción se le adicionaron 5 g de agua-hielo y se aciduló con una solución de HCl al 10%, la mezcla acuosa se extrajo por triplicado con 5 mL de AcOEt. La fase orgánica obtenida se extrajo con tres porciones de 5 mL de una solución saturada de  $\text{NaHCO}_3$ , posteriormente se lavó con tres porciones de 5 mL de agua. El extracto orgánico se secó con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro y por evaporación, se concentró en una campana de extracción para obtener el producto acilado. Los derivados obtenidos fueron purificados por medio de una cromatografía en columna abierta (CCA) con gel de sílice empleando un sistema de elución de polaridad ascendente con hexano-AcOEt (Morales-Flores, 2010). El triacetato o

también denominado triacetina es un líquido a temperatura ambiente ya que presenta un punto de fusión de  $-78^{\circ}\text{C}$ .

### ***Detección in situ de actividad enzimática de la MS en embriones germinados de maíz***

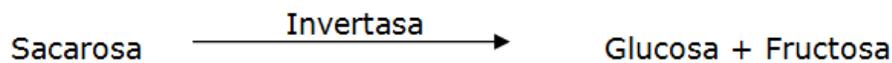
***Fijación.*** Una vez germinados los embriones en presencia o ausencia del patógeno, estos se sumergieron en 1 mL de solución fijadora compuesta por paraformaldehído al 2%, polivinilpirrolidona-40 al 2% y DTT 1 mM, se colocaron en un tubo eppendorf y se almacenaron a  $4^{\circ}\text{C}$  por una hora. Transcurrido este tiempo de fijación los tubos se centrifugaron a 10,000 rpm por 1 minuto. El sobrenadante se descartó y el botón se lavó cinco veces con 1 mL de agua destilada. Los embriones limpios fijados se almacenaron toda la noche a  $4^{\circ}\text{C}$  (Baud, 2006).

***Detección de actividad enzimática de la MS.*** Para la determinación de la actividad de la Malato sintasa se llevó a cabo una reacción acoplada *in situ* (Figura 15). Se utilizaron dos embriones previamente fijados para cada tiempo de germinación infectados o controles. Cada embrión se colocó en 2 mL del medio de reacción que contenía 85 mM Tris-HCl (pH=8.0), 8 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,2 mM acetil-CoA, 2 mM glioxilato,  $6 \text{ U mL}^{-1}$  de Malato deshidrogenasa, 1 mM  $\text{NAD}^+$  y 0,37 mM de NBT. La reacción se llevó a cabo por 60 minutos y a cada 10 minutos se fue monitoreando el cambio en la coloración extrayendo al embrión del medio de reacción y fotografiándolo con un microscopio estereoscópico. El cambio en la coloración fue cuantificado mediante el programa Motic Images Plus 2.0 acoplado al microscopio. Cabe mencionar que para cada tiempo de germinación se utilizó un control, al cual no se le añadieron los sustratos glioxilato y acetil-CoA, sin embargo el procedimiento restante fue el mismo.



**Cuantificación de sacarosa en embriones de maíz mediante un método enzimático**

Para la determinación del contenido de sacarosa se tuvo que realizar un primer paso que fue el de la hidrólisis de sacarosa. Se utilizaron de dos a tres embriones infectados y no infectados por tiempo de germinación, y a cada embrión se le colocó en una solución de invertasa de levadura a una concentración de 80mg/mL, la solución para disolver la invertasa fue acetato de magnesio 0.1 M, pH= 5.0.



Se dejaron incubando los embriones dentro de la solución a 37 °C por una hora, transcurrido este tiempo se sacaron de la solución para enjuagarlos con agua desionizada y secarlos con papel filtro. Una vez realizada la hidrólisis de la sacarosa se determinó la glucosa liberada empleando el Reactivo de ensayo de glucosa (REG), cada embrión se sumergió en 500 µL de este reactivo con NBT 0,37 mM, la reacción se llevó a cabo por 60 minutos de los cuales cada 10 minutos se fue monitoreando el cambio de coloración en el embrión extrayéndolo del medio de reacción y fotografiándolo usando un microscopio estereoscópico. El cambio en la coloración fue cuantificado mediante el programa Motic Images Plus 2.0 acoplado al microscopio. Para cada tiempo de germinación se utilizó un embrión control el cual no se trató con la solución de invertasa, esto con el fin de descartar la glucosa inicial contenida en el embrión y de este modo asegurar que la glucosa detectada fuera debida a la hidrólisis de la sacarosa presente en el embrión.

**Fundamento.** Al emplear el kit con el REG, se está llevando a cabo un método enzimático específico, reproducible y rápido debido a la alta especificidad de las enzimas involucradas, por lo que puede realizarse una cuantificación de la glucosa contenida en cualquier material biológico. Este reactivo contiene NAD<sup>+</sup>, ATP,

Hexocinasa y Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa con los conservadores benzoato de sodio y sorbato de potasio. Al ponerse en contacto el embrión con la hexocinasa contenida en el medio, tanto la glucosa como la fructosa se fosforilan y la glucosa-6-fosfato formada es usada por la Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, el producto de la reacción es 6-fosfogluconato, y una cantidad equimolar de  $\text{NAD}^+$  es reducida a  $\text{NADH}$  (Figura 17).

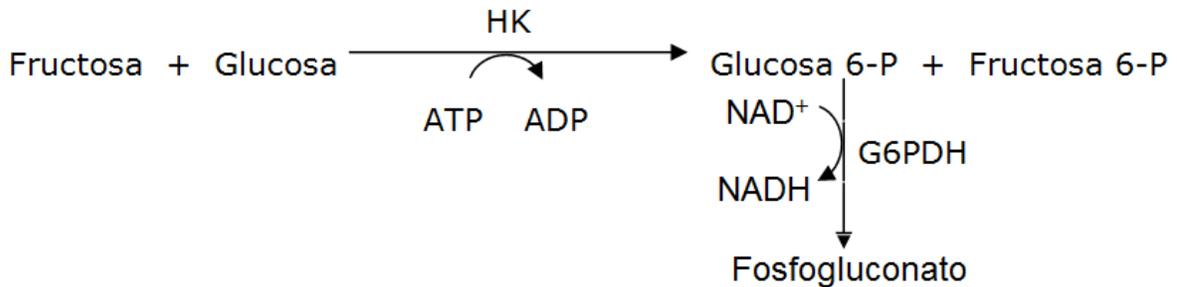


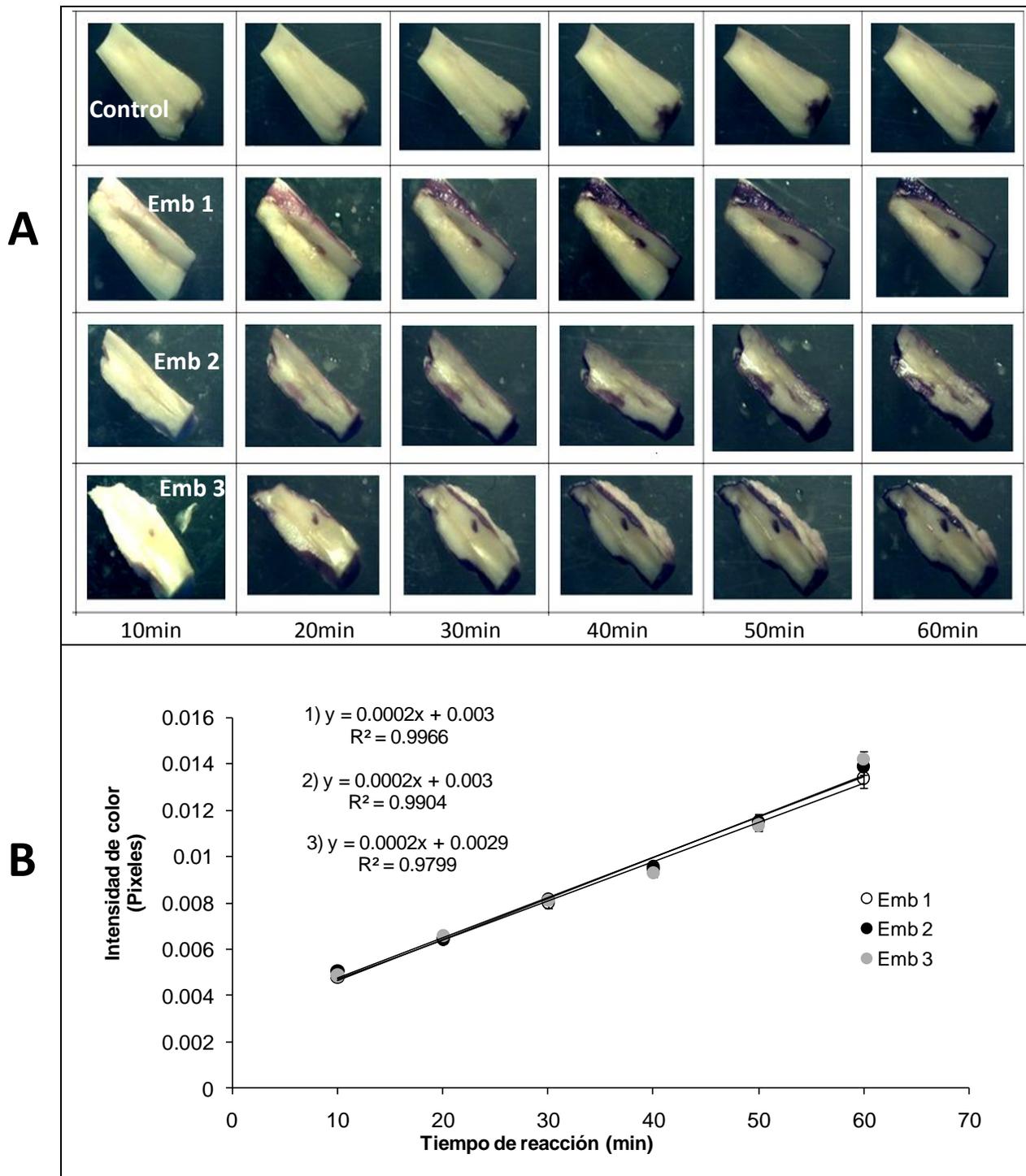
Figura 17. Reacción acoplada para la detección de glucosa.

Como el medio de reacción también contiene NBT, éste toma los protones del  $\text{NADPH}$  formado para así reducirse y se lleve a cabo la formación de la sal de formazán colorida que puede detectarse directamente sobre el tejido tratado.

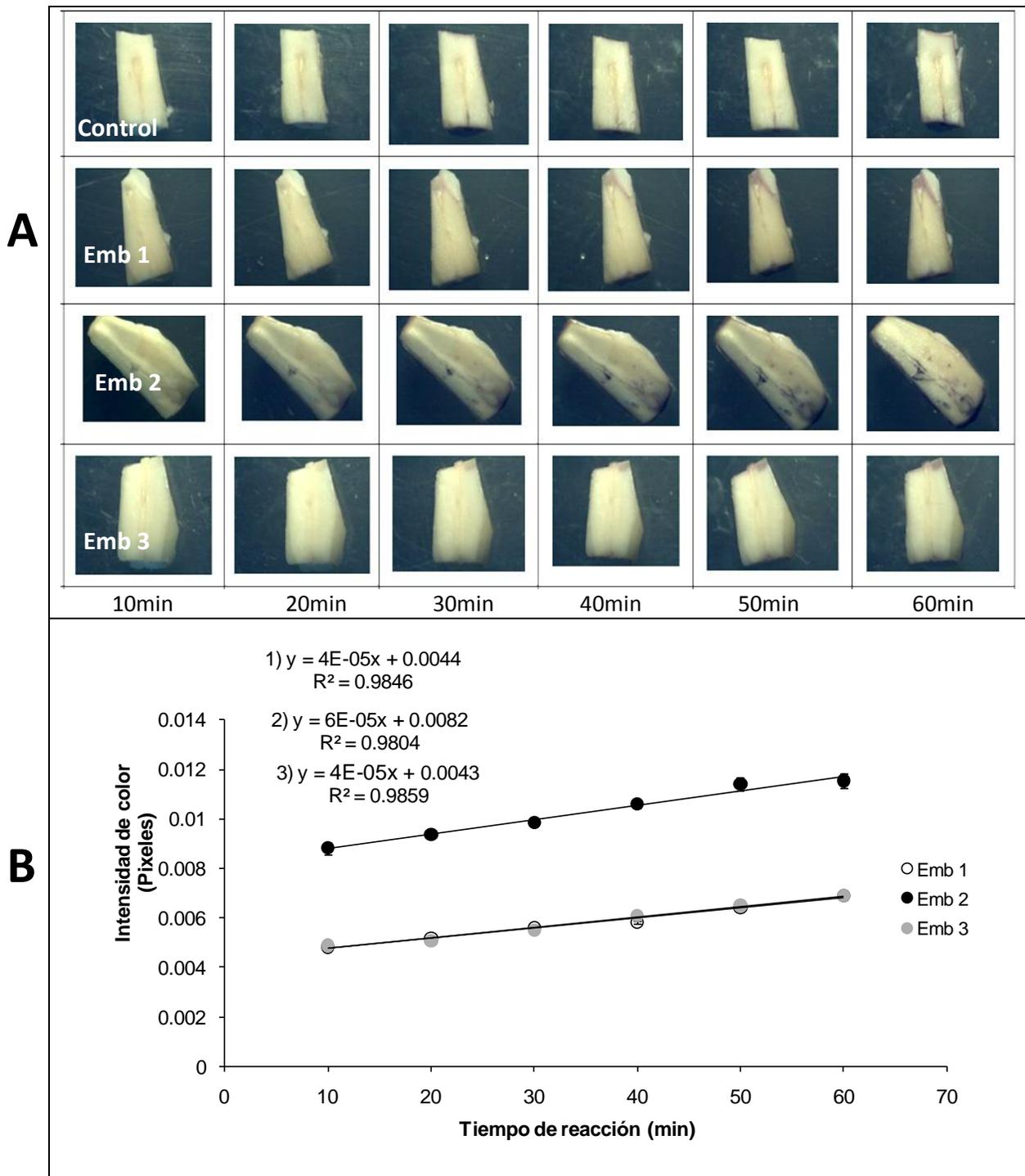
## RESULTADOS

### ***Confirmación del incremento del contenido de sacarosa durante la germinación de los embriones de maíz***

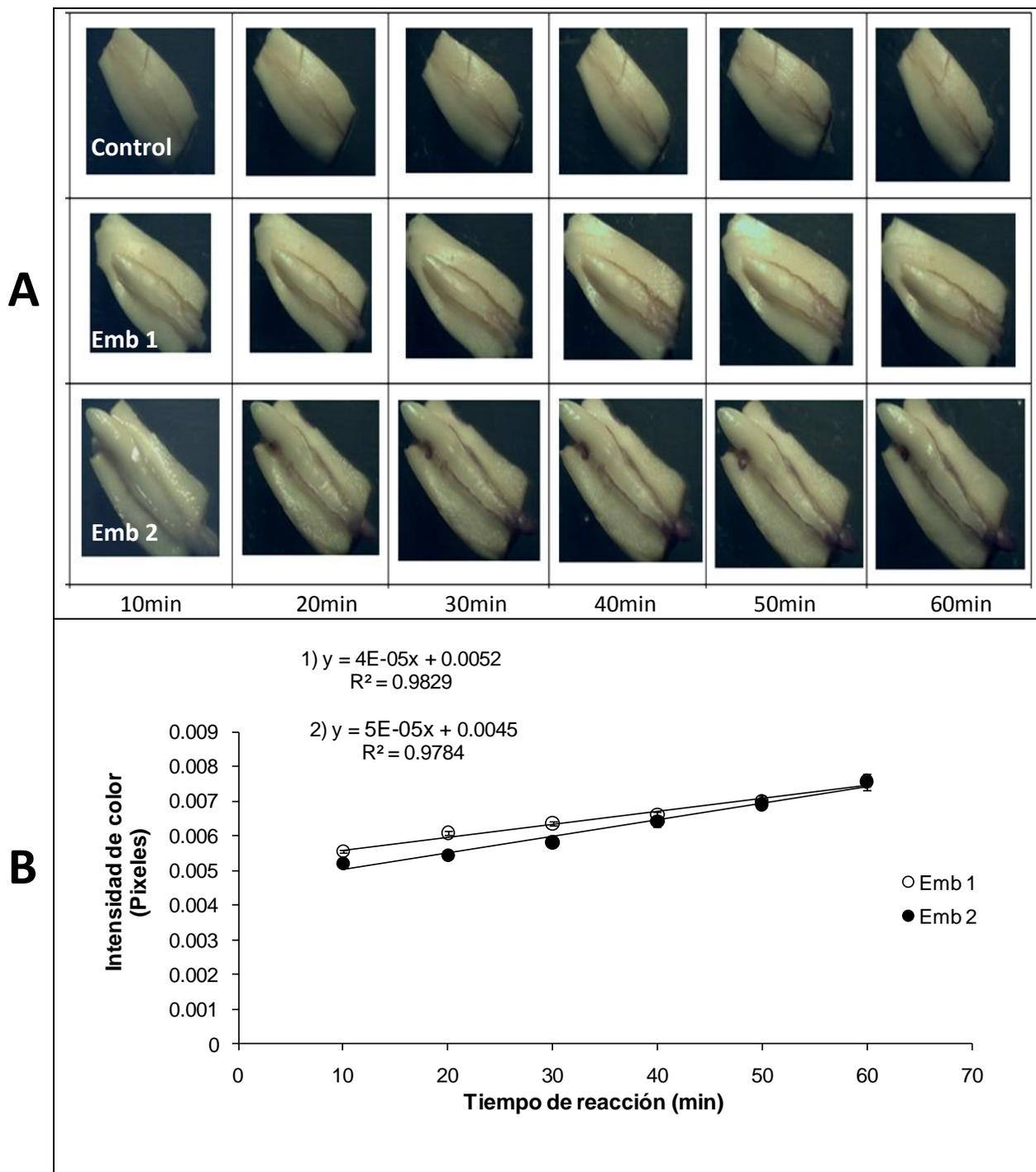
Como se mencionó en la justificación, al medir el contenido de sacarosa en extractos etanólicos de embriones de maíz, se encontró un incremento en su contenido a las 24 h de germinación, mientras que en los ejes embrionarios se observó la disminución en su contenido (Martínez-Marcelo, 2008). Esto es importante ya que la sacarosa es el metabolito que es transportado desde el o los tejido(s) productor(es) hacia el o los tejido(s) demandante(s) en las plantas maduras y al parecer es una función que también se cumple en la germinación de las semillas. Así que lo que se realizó fue corroborar este resultado. Para ello se determinó el contenido de sacarosa en los embriones germinados. La determinación del contenido *in situ* de sacarosa se realizó mediante un ensayo acoplado, en el que se detectó la cantidad de glucosa liberada de la sacarosa mediante la reducción del NBT (Ver materiales y métodos). Los tiempos de germinación medidos fueron 0 h, 8 h, 12 h, 18 h, 24 h, 36 h y 48 h (Figuras 18-24). Para cada uno de los tiempos de germinación se muestra en el panel A los embriones teñidos por la precipitación del reactivo de NBT reducido, cada embrión fue incubado y monitoreado durante 1 h. La primera línea corresponde al embrión control en el que se detectó la concentración de glucosa inicial propia del tiempo de germinación del embrión y por tanto no debida a la reacción de hidrólisis de la invertasa a la que fueron sometidos los otros embriones. Las otras tres líneas de embriones muestran la detección de la glucosa liberada de la sacarosa. A todos los embriones se les determinó la densitometría y la intensidad de color detectada en los controles fueron restados a la obtenida de los embriones tratados. La densitometría final de cada embrión se muestra en el panel B. La pendiente de cada curva corresponde a la sacarosa detectada.



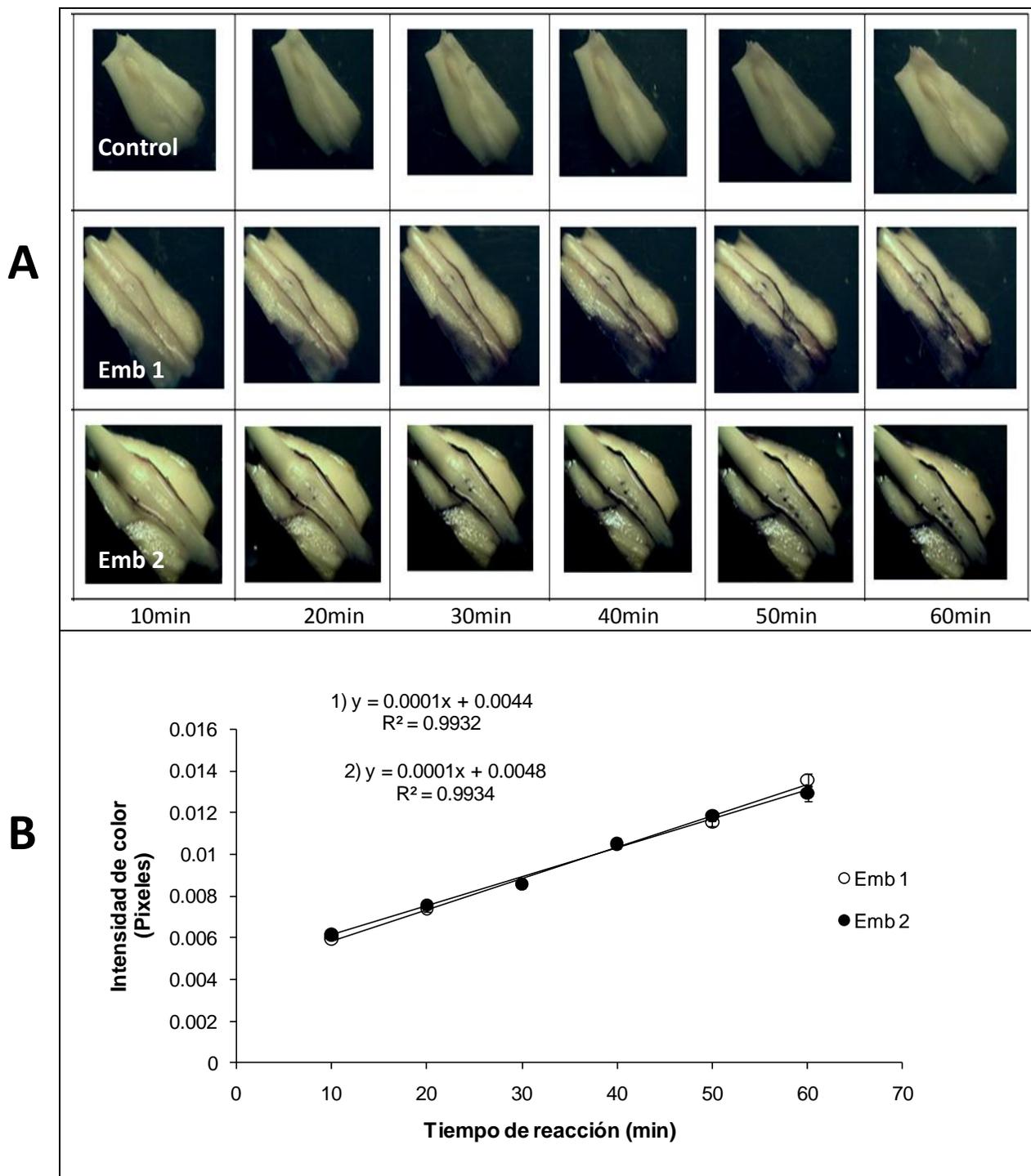
**Figura 18. Detección de sacarosa en embriones de maíz secos. A)** Monitoreo del contenido de sacarosa en los embriones de maíz secos. Control. Embrión sin incubación con invertasa de levadura, Emb 1, 2 y 3 son los embriones incubados con la invertasa de levadura por 1 h a 37°C, la glucosa proveniente de la sacarosa fue cuantificada con el reactivo de ensayo de glucosa de SIGMA donde el producto final es NADH, el cual posteriormente reduce al reactivo de NBT, éste precipita en el embrión coloreándolo de azul. La intensidad del color es proporcional al contenido de sacarosa inicial. **B)** Densitometría de los embriones mostrados en el panel A.



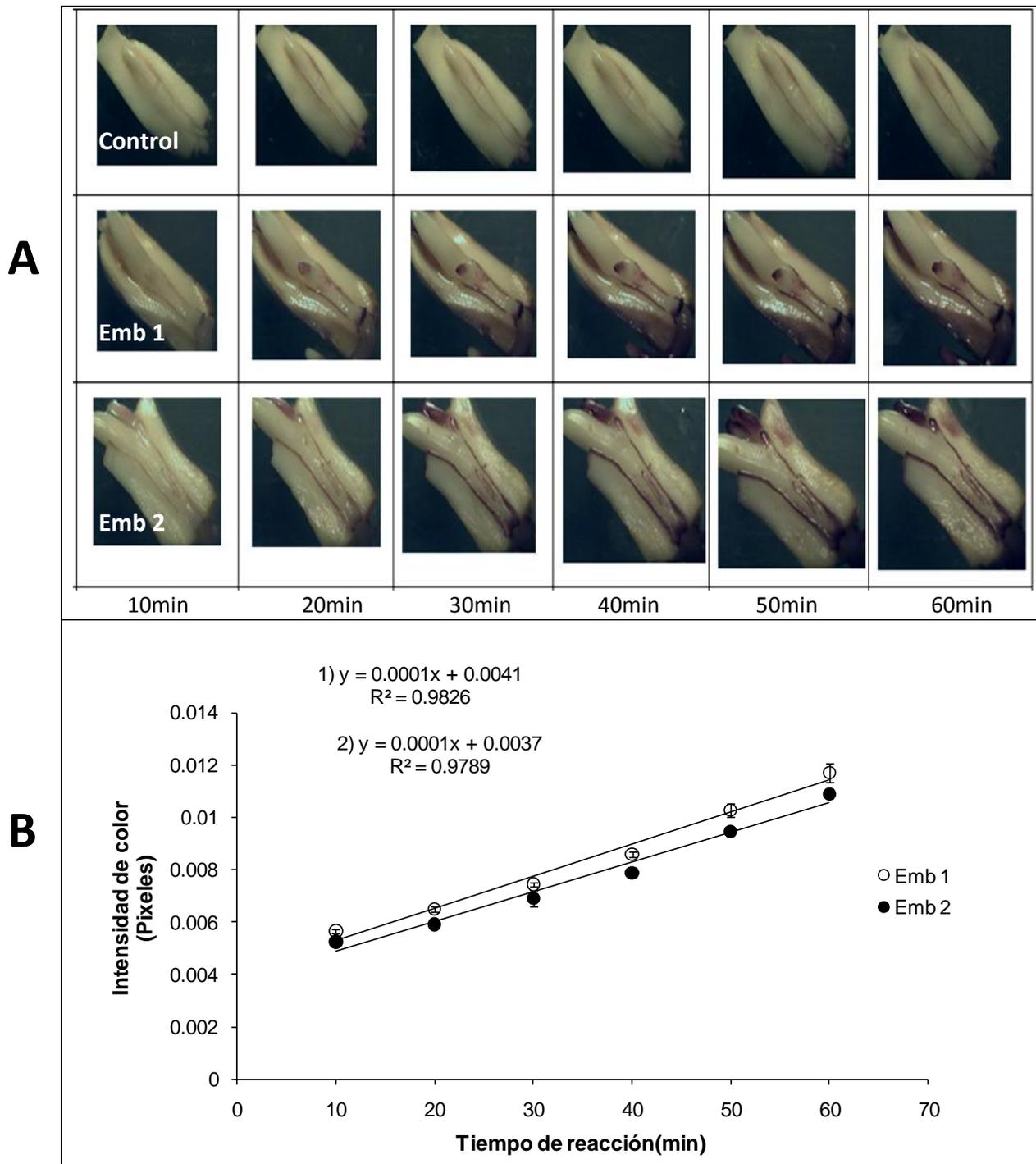
**Figura 19. Detección de sacarosa en embriones de maíz germinados 8 h. A)** Monitoreo del contenido de sacarosa en los embriones de maíz. Control. Embrión sin incubación con invertasa de levadura, Emb 1, 2 y 3 son los embriones incubados con la invertasa de levadura por 1 h a 37°C, la glucosa proveniente de la sacarosa fue cuantificada con el reactivo de ensayo de glucosa de SIGMA donde el producto final es NADH, el cual posteriormente reduce al reactivo de NBT, éste precipita en el embrión coloreándolo de azul. La intensidad del color es proporcional al contenido de sacarosa inicial. **B)** Densitometría de los embriones mostrados en el panel A.



**Figura 20. Detección de sacarosa en embriones de maíz germinados 12 h. A)** Monitoreo del contenido de sacarosa en los embriones de maíz. Control. Embrión sin incubación con invertasa de levadura, Emb 1 y 2 son los embriones incubados con la invertasa de levadura por 1 h a 37°C, la glucosa proveniente de la sacarosa fue cuantificada con el reactivo de ensayo de glucosa de SIGMA donde el producto final es NADH, el cual posteriormente reduce al reactivo de NBT, éste precipita en el embrión coloreándolo de azul. La intensidad del color es proporcional al contenido de sacarosa inicial. **B)** Densitometría de los embriones mostrados en el panel A.

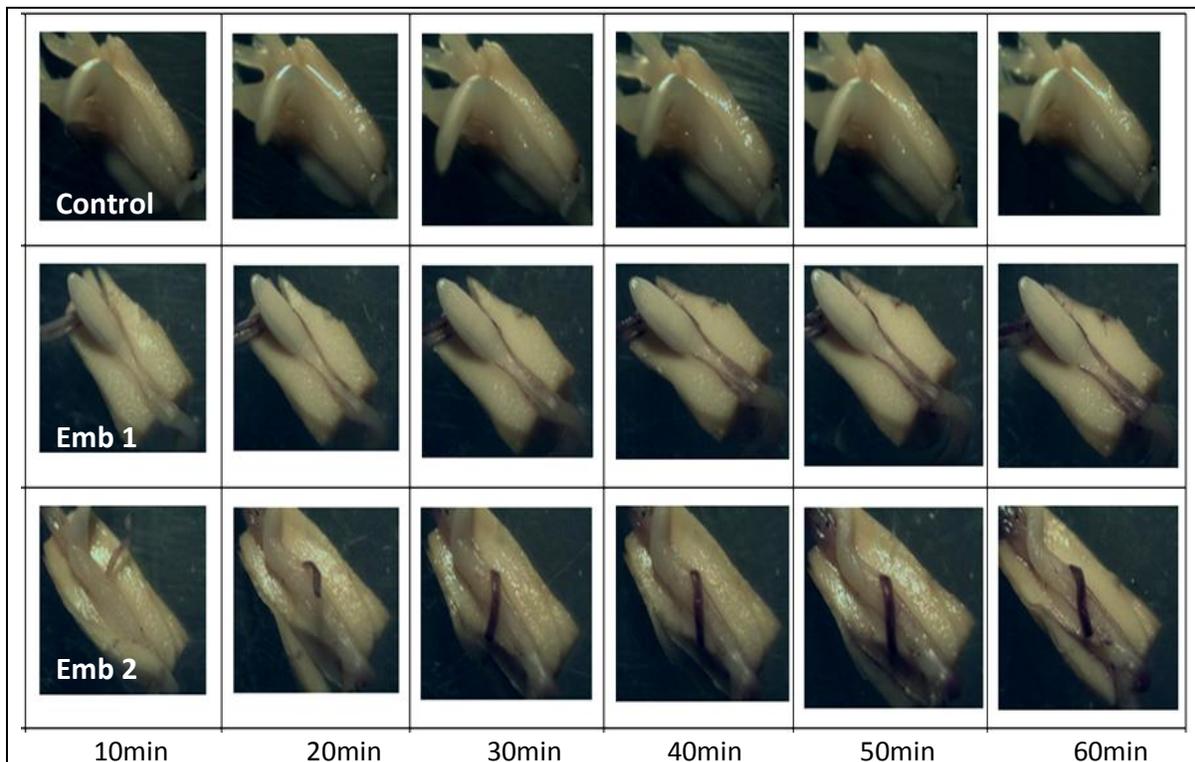


**Figura 21. Detección de sacarosa en embriones de maíz germinados 18 h. A)** Monitoreo del contenido de sacarosa en los embriones de maíz. Control. Embrión sin incubación con invertasa de levadura, Emb 1 y 2 son los embriones incubados con la invertasa de levadura por 1 h a 37°C, la glucosa proveniente de la sacarosa fue cuantificada con el reactivo de ensayo de glucosa de SIGMA donde el producto final es NADH, el cual posteriormente reduce al reactivo de NBT, éste precipita en el embrión coloreándolo de azul. La intensidad del color es proporcional al contenido de sacarosa inicial. **B)** Densitometría de los embriones mostrados en el panel A.

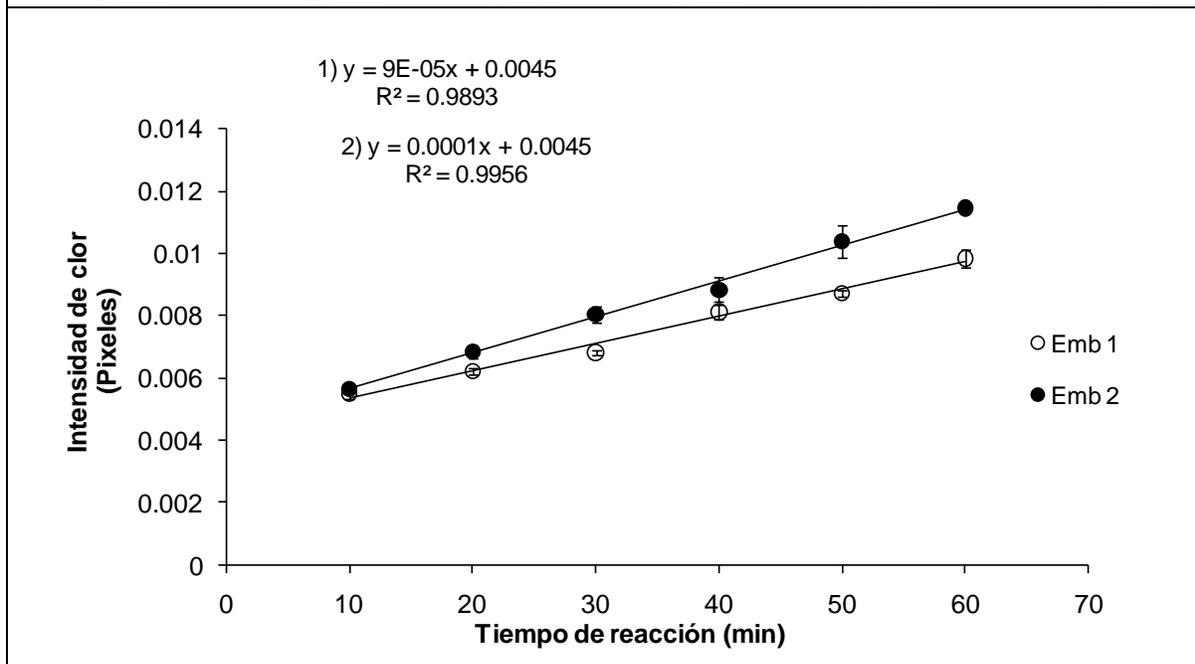


**Figura 22. Detección de sacarosa en embriones de maíz germinados 24 h. A)** Monitoreo del contenido de sacarosa en los embriones de maíz. Control. Embrión sin incubación con invertasa de levadura, Emb 1 y 2 son los embriones incubados con la invertasa de levadura por 1 h a 37°C, la glucosa proveniente de la sacarosa fue cuantificada con el reactivo de ensayo de glucosa de SIGMA donde el producto final es NADH, el cual posteriormente reduce al reactivo de NBT, éste precipita en el embrión coloreándolo de azul. La intensidad del color es proporcional al contenido de sacarosa inicial. **B)** Densitometría de los embriones mostrados en el panel A.

A

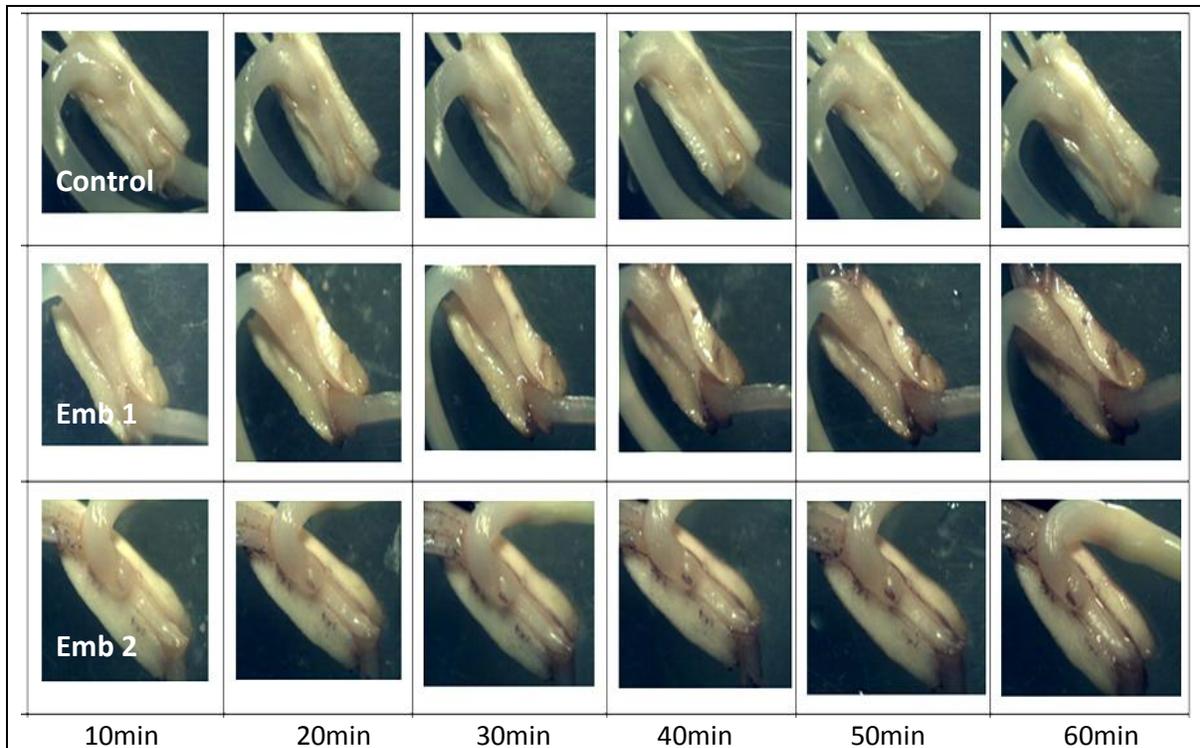


B

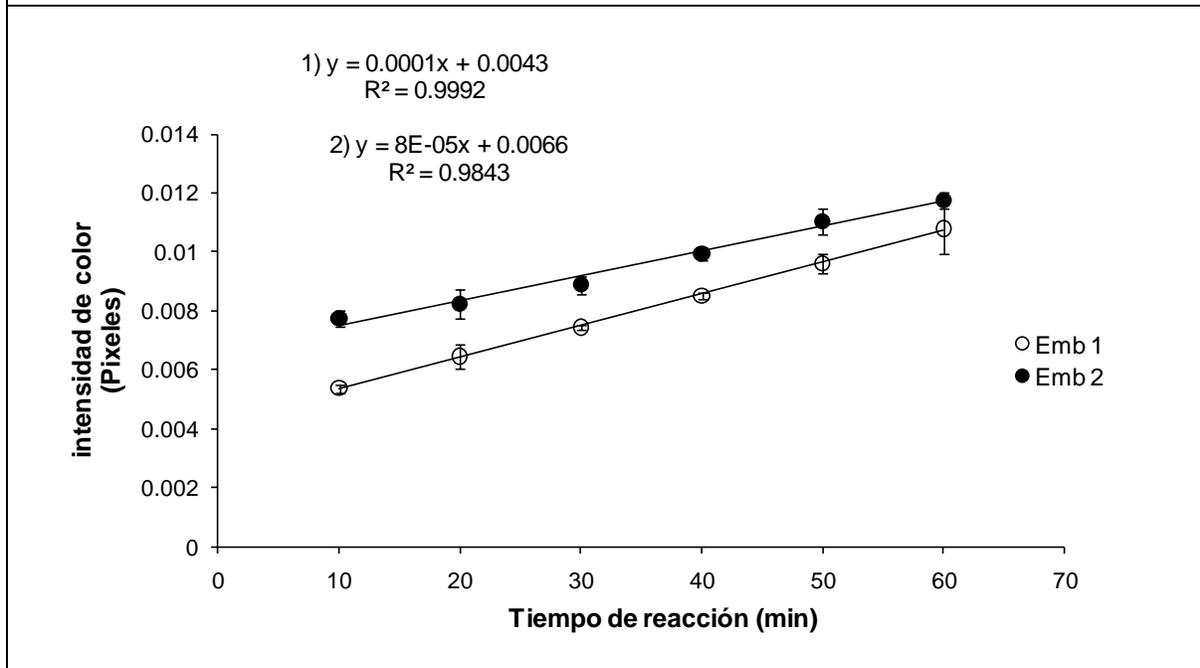


**Figura 23. Detección de sacarosa en embriones de maíz germinados 36 h. A)** Monitoreo del contenido de sacarosa en los embriones de maíz. Control. Embrión sin incubación con invertasa de levadura, Emb 1 y 2 son los embriones incubados con la invertasa de levadura por 1 h a 37°C, la glucosa proveniente de la sacarosa fue cuantificada con el reactivo de ensayo de glucosa de SIGMA donde el producto final es NADH, el cual posteriormente reduce al reactivo de NBT, éste precipita en el embrión coloreándolo de azul. La intensidad del color es proporcional al contenido de sacarosa inicial. **B)** Densitometría de los embriones mostrados en el panel A.

A

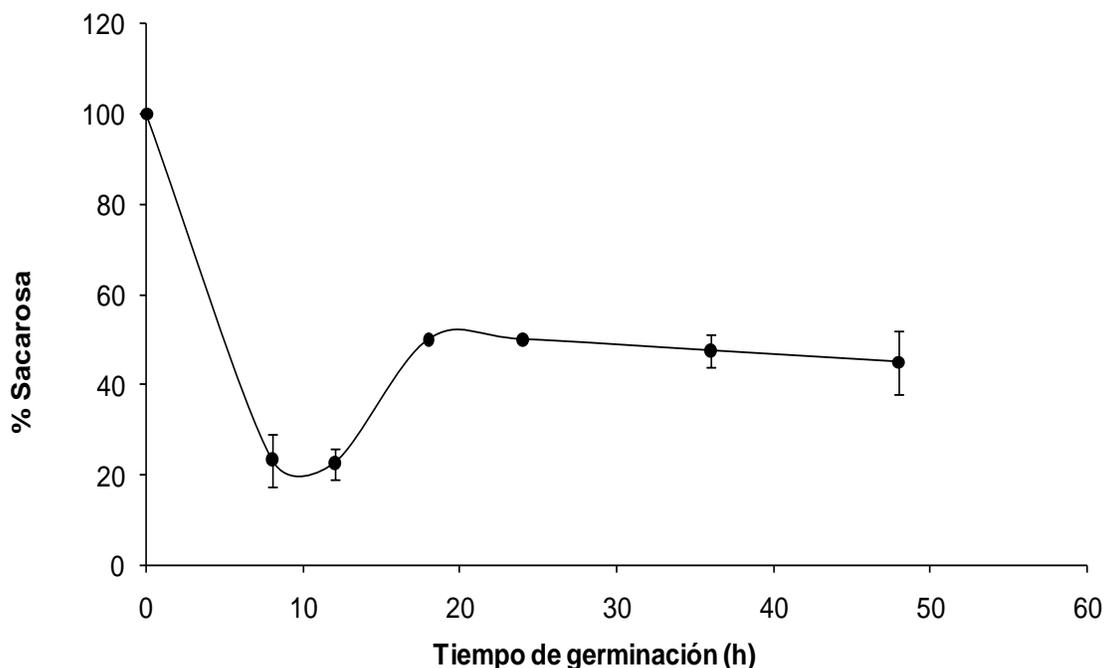


B



**Figura 24. Detección de sacarosa en embriones de maíz germinados 48 h. A)** Monitoreo del contenido de sacarosa en los embriones de maíz. Control. Embrión sin incubación con invertasa de levadura, Emb 1 y 2 son los embriones incubados con la invertasa de levadura por 1 h a 37°C, la glucosa proveniente de la sacarosa fue cuantificada con el reactivo de ensayo de glucosa de SIGMA donde el producto final es NADH, el cual posteriormente reduce al reactivo de NBT, éste precipita en el embrión coloreándolo de azul. La intensidad del color es proporcional al contenido de sacarosa inicial. **B)** Densitometría de los embriones mostrados en el panel A.

Como se observa en la Figura 18, el contenido de sacarosa es alto en el escutelo de los embriones al tiempo 0 ya que vemos una coloración muy intensa conforme aumenta el tiempo de reacción. Esta coloración disminuye apreciablemente a las 8h de germinación (Figura 19) ya que el escutelo no se tiñe con la misma intensidad. La tinción comienza a incrementarse en las zonas que rodean al eje embrionario en crecimiento a las 12h de germinación (Figura 20). Para el caso de los embriones germinados 18h (Figura 21), se puede apreciar que ciertas zonas del escutelo y adyacentes al eje embrionario se tiñen nuevamente de un modo más intenso, esta coloración permanece constante para los embriones de 24 y 36h (Figuras 22 y 23). Posteriormente, al alcanzar una germinación de 48h, la coloración disminuye nuevamente ya que no se logran apreciar zonas definidas del escutelo teñidas de azul-violeta (Figura 24). Es importante señalar que en ninguno de los casos se tiñe el eje embrionario, sólo las zonas contiguas a éste.



**Figura 25.** Contenido de sacarosa durante la germinación de embriones de maíz.

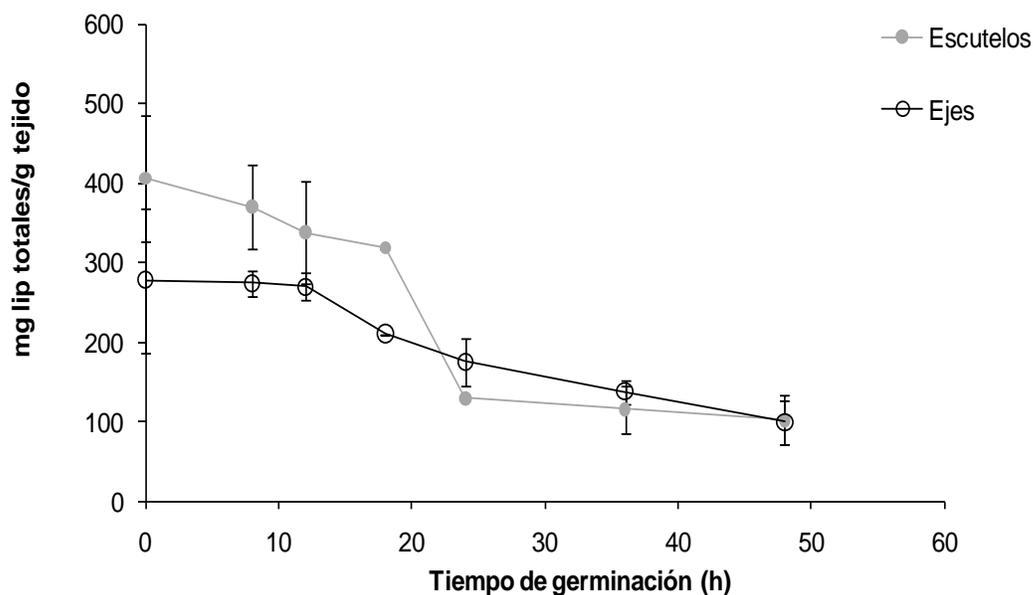
Los valores de las pendientes obtenidas a cada tiempo de germinación fueron utilizados para construir la curva de la Figura 25, en donde se consideró el valor de la pendiente del tiempo 0 de germinación como el 100%. En la Figura 25 se observa claramente cómo el contenido de sacarosa cambia durante la germinación del embrión. Se puede apreciar que al tiempo 0 se tiene el mayor contenido de sacarosa. Entre las 8 h y 12 h de germinación el contenido de sacarosa en el embrión disminuyó un 80%. Sin embargo, al cumplir las 18 h de germinación hay un aumento en el contenido de sacarosa el que se mantiene constante hasta las 48 h de germinación. Por lo que concluimos que la detección *in situ* de sacarosa corrobora los resultados obtenidos cuando se muele todo el tejido embrionario, en el sentido de que el mayor uso de sacarosa ocurre en las primeras horas de hidratación del embrión para posteriormente volver a sintetizar sacarosa y acumularla hacia las 18 h.

### ***Análisis de la movilización de lípidos en escutelos y ejes embrionarios de maíz***

Una explicación del por qué la sacarosa se incrementa en los escutelos de los embriones de maíz a partir de las 18 h de germinación, es que ocurra la movilización de los lípidos y el carbono obtenido se use en el ciclo del glioxilato y posteriormente ocurre la gluconeogénesis y la síntesis de la sacarosa.

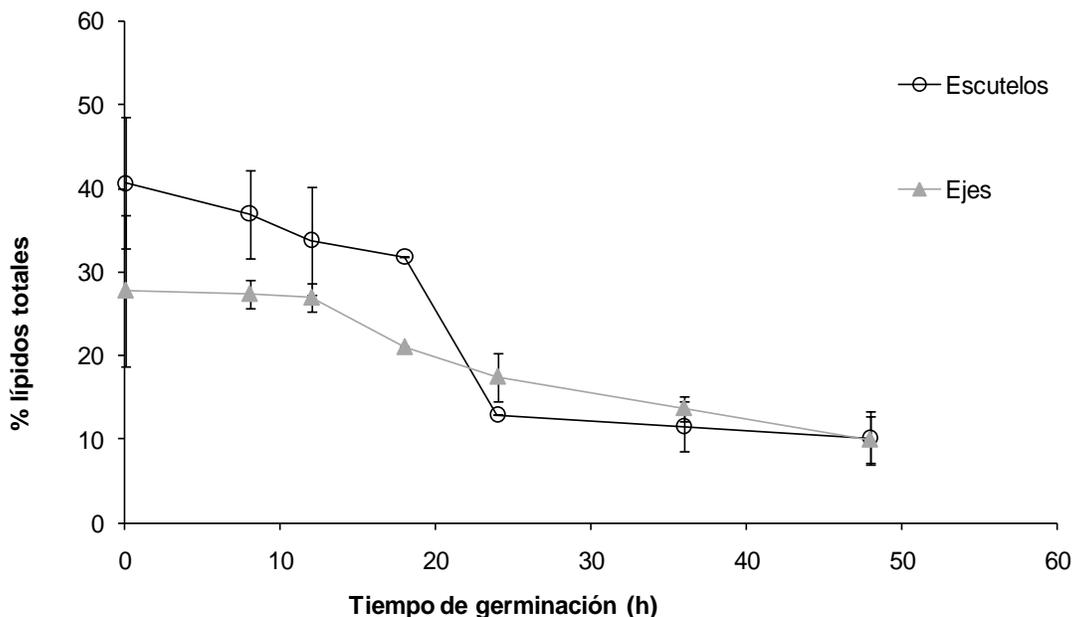
Se conoce que el carbono presente en el tejido embrionario debe ser movilizado para la biosíntesis de nuevos componentes, ya sean estructurales o bien para la síntesis de ATP. Los lípidos de reserva son una de las fuentes más importantes en términos de número de carbonos y cantidad de ATP que se puede producir a partir de su catabolismo. Por lo anterior se obtuvieron las curvas de degradación de lípidos totales durante la germinación de embriones de maíz. Para hacerlo se germinaron embriones de maíz por diferentes tiempos y después de que se cumplió el tiempo de germinación de los embriones, se separaron los ejes embrionarios y los escutelos y se determinó en cada tejido el contenido total de

lípidos. En la Figura 26 se puede observar que hay una mayor cantidad de lípidos en los escutelos que en los ejes, y se aprecia que el contenido de lípidos va disminuyendo en ambos tejidos conforme el tiempo de germinación avanza. En un inicio, por cada gramo de escutelo existen aproximadamente 400 mg de lípidos, y para las 48 h de germinación se ha consumido alrededor de un 30%.



**Figura 26. Contenido de lípidos totales durante la germinación de ejes y escutelos de maíz.** Se observa que en un inicio 1g de escutelo de embriones secos tiene más lípidos que 1 g de ejes embrionarios, aunque a las 24 h ambos tejidos presentan un contenido similar de lípidos, lo que sugiere una tasa distinta de uso y probablemente un destino distinto del carbono presente en los lípidos.

Como se menciona en la literatura, los lípidos de reserva representan aproximadamente un 37% del peso seco del escutelo (*Quettier, et al, 2009*), es por ello que se calculó el porcentaje que representan los lípidos extraídos de cada tejido, obteniéndose las curvas de la Figura 27, en donde se puede apreciar que en el escutelo los lípidos corresponden a aproximadamente un 40% de su peso total, mientras que en el eje corresponden a un 28%. No obstante a que inician los escutelos con un porcentaje mayor de lípidos, a las 24 h alcanza un porcentaje total similar al de los ejes embrionarios.

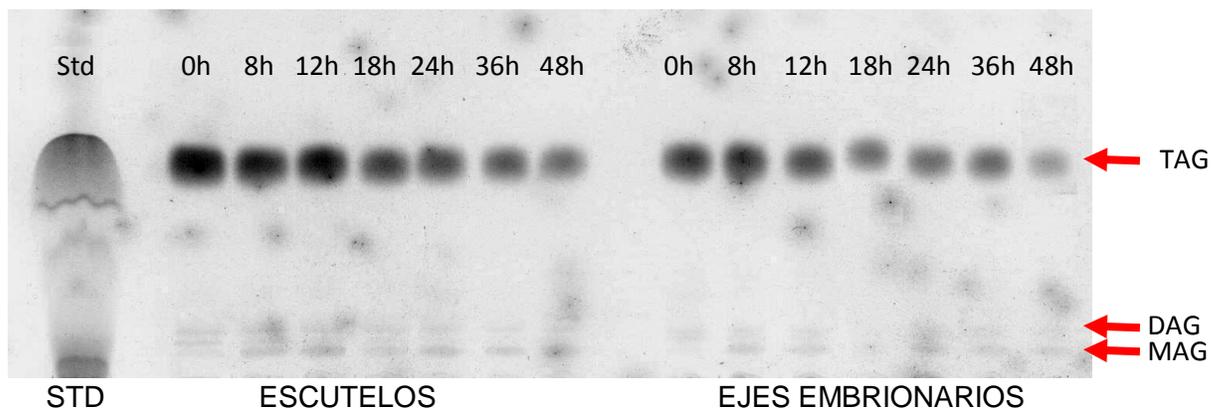


**Figura 27.** Porcentaje que representan los lípidos de reserva tanto en el escutelo como en los ejes embrionarios.

### ***Análisis de TGAs por cromatografía en capa fina***

Para explicar que la disminución acelerada de los lípidos totales en el escutelo se debe a su capacidad mayor de degradar TGA para formar acetil-CoA y posteriormente usar este carbono para realizar la gluconeogénesis, se determinaron los niveles de TGA a lo largo de la germinación mediante el corrimiento de los lípidos totales en placas de gel de sílice y su revelado con vapores de yodo. Se obtuvo la densitometría de las bandas obtenidas así como de un estándar de TGA.

En la Figura 28 se muestra una placa representativa en la que se observan por carril varias bandas, la banda más intensa corresponde a los TGAs mientras que las bandas cercanas al inicio de la zona de aplicación corresponden a los mono y diacilgliceroles. Sin embargo, sólo cuantificamos la banda de los TGAs. En el apéndice se encuentran los triplicados de la placa mostrada en la Figura 28.



**Figura 28. Determinación de TGAs en extractos lipídicos de escutelos y ejes embrionarios de maíz a diferentes tiempos de germinación.** Se extrajeron los lípidos mediante cloroformo:metanol y se aplicaron en placas de TLC, se corrieron utilizando la fase móvil compuesta por hexano: éter etílico: ácido acético (70:30:1, v/v). La muestra aplicada fue diluida 1:20 tanto para los escutelos como para los ejes embrionarios

Una vez que obtuvieron las placas reveladas, se llevó a cabo la cuantificación de los TGAs mediante la realización de una densitometría de cada una de las bandas. Se puede apreciar en la Figura 29 que tanto para los escutelos como los ejes embrionarios de maíz hay un contenido menor de TGAs conforme avanza la germinación.

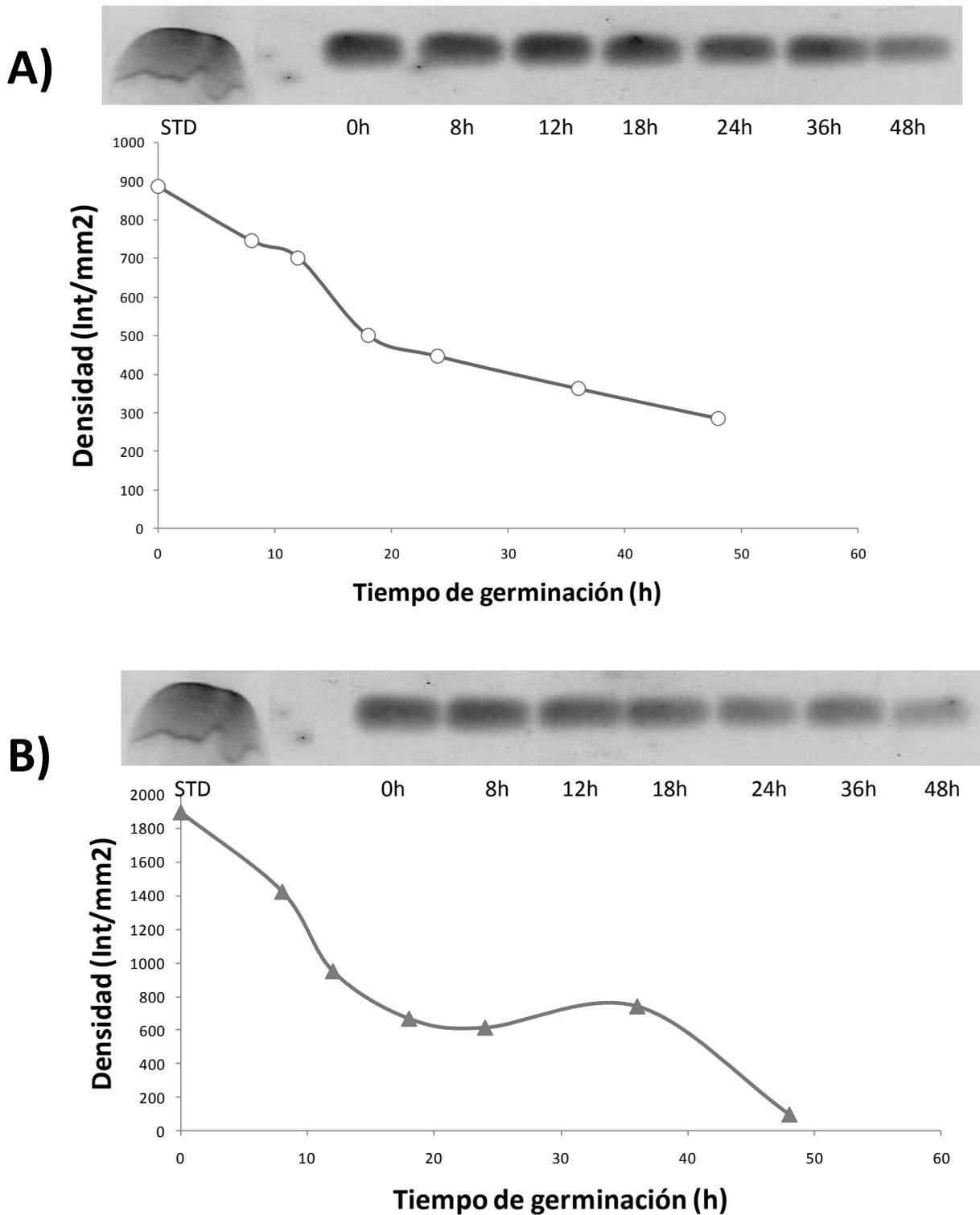
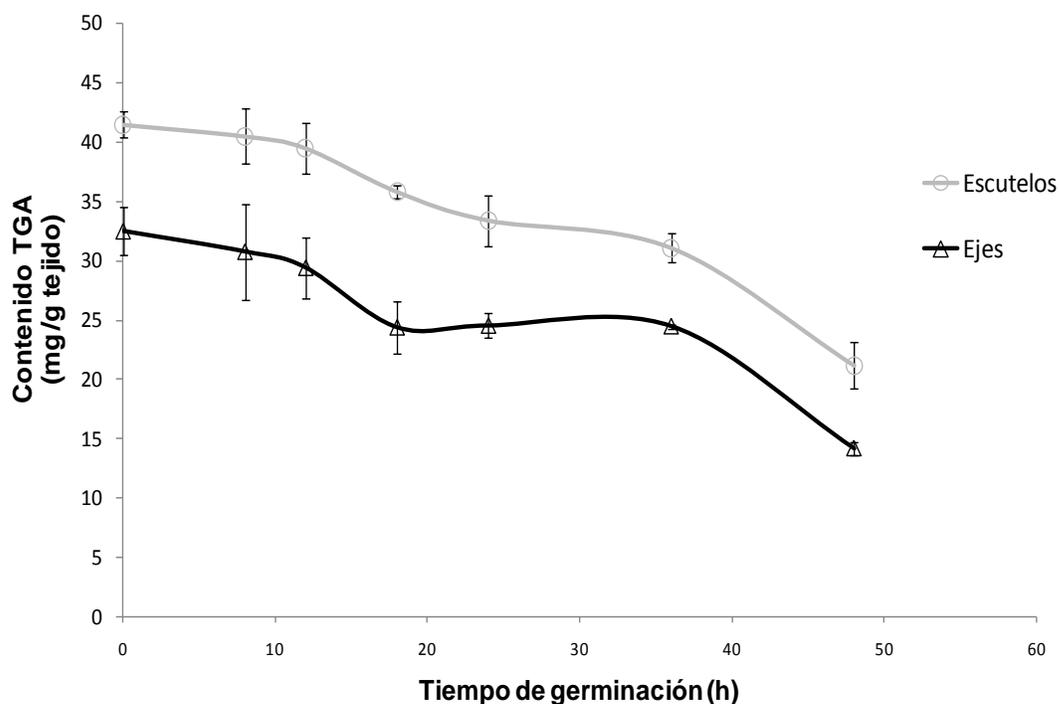


Figura 29. Perfil de TGAs en escutelos y ejes embrionarios de maíz durante el proceso de la germinación. Contenido de TGA en A) 1g de escutelos de maíz y B) 1g de ejes embrionarios. Se aplicaron 4  $\mu$ L de cada muestra con una dilución de 1:20 para ambos tejidos.

Considerando el valor de la densitometría del estándar de TGA se cuantifico la cantidad de éstos en cada tejido y a lo largo de la germinación. En la Figura 30 podemos apreciar que en un gramo de escutelos existe una cantidad aproximada de 41.5 mg de TGAs, en contraste, en un gramo de ejes embrionarios hay aproximadamente 32.5 mg de TGAs, en ambos tejidos se observa que la velocidad de degradación es muy similar, y contrario a los lípidos totales no llegan a contenidos similares de lípidos. Al llegar a las 48 h de germinación, en los escutelos se logra consumir un 51% del contenido de TGAs inicial, mientras que en los ejes embrionarios se consume un 40.4%.



**Figura 30. Contenido de TGA por gramo de escutelos y ejes embrionarios.** En el caso de los escutelos puede apreciarse que del total de TGAs contenidos es de aproximadamente 35 mg por gramo de escutelo, se utiliza aproximadamente un 60% de los mismos para cuando la germinación alcanza las 48 horas. En los ejes embrionarios se utiliza un 50% de los TGAs iniciales.

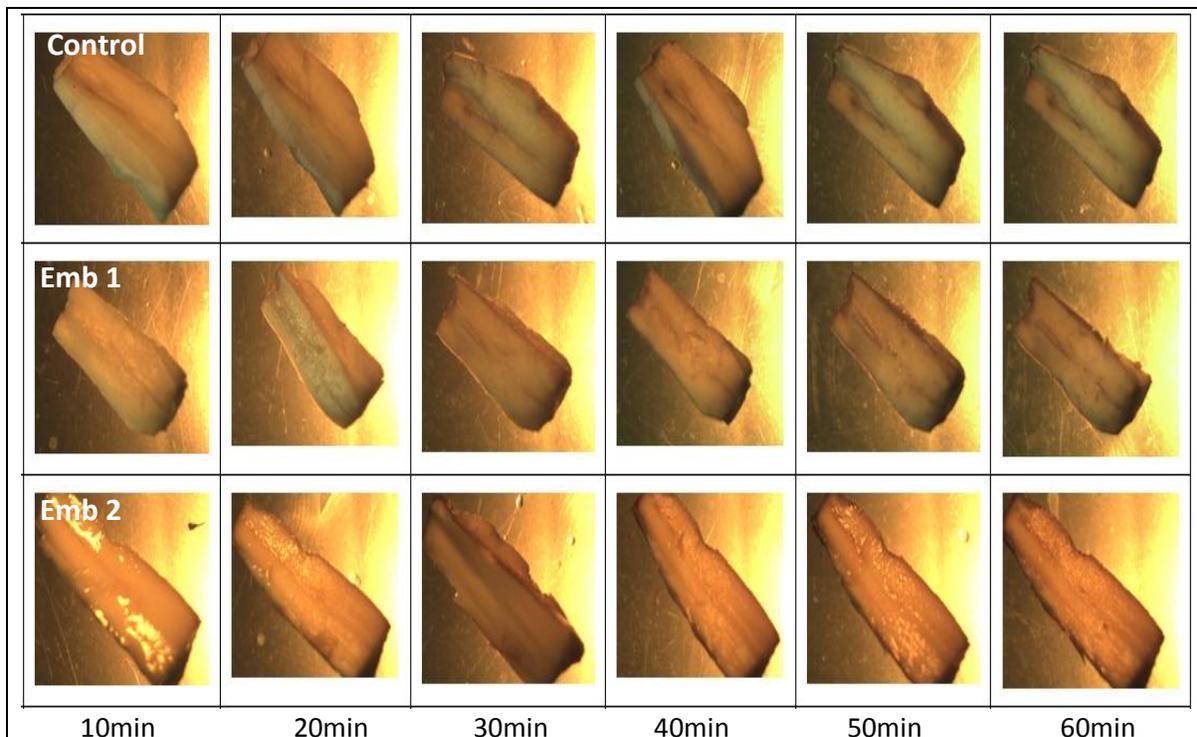
---

***Detección in situ de actividad enzimática de la MS en embriones germinados de maíz***

Sorprendentemente encontramos que la degradación de los TGA parece ser similar tanto en los ejes como en los embriones, sin embargo, por los resultados del contenido de sacarosa obtenido por Marcelo-Martínez y los que obtuvimos en la detección *in situ* en este trabajo, sabíamos que en los ejes no se acumula sacarosa después de las 12h por lo que procedimos a medir una enzima importante en el uso del carbono proveniente de la degradación de lípidos: la MALATO SINTASA, como estrategia experimental se utilizaron los embriones germinados a diferentes tiempos y se detectó la actividad de la enzima *in situ*, con la finalidad de observar en qué región se localiza la actividad.

La actividad de la Malato sintasa se observó a partir de las 8h de germinación, ya que se detectó la tinción del escutelo y zonas cercanas al eje embrionario, y no hubo señal en el eje embrionario. Conforme la reacción fue avanzando, la tinción aumentó gradualmente su intensidad hasta los 60 min. A continuación se muestran los paneles con las fotografías de los embriones teñidos, en donde en el panel A se encuentran tres líneas de embriones, la primera línea muestra la curva temporal de reacción de los embriones que fueron incubados en el medio de ensayo para medir la actividad de la enzima pero sin la adición de los sustratos, la segunda y tercera línea corresponden a las curvas temporales de monitoreo de la reacción enzimática. En el panel B se muestran las densitometrías de reacción de los dos embriones a lo largo del tiempo de reacción. La pendiente de cada curva corresponde a la actividad de la MS (Figuras 31-36).

A



B

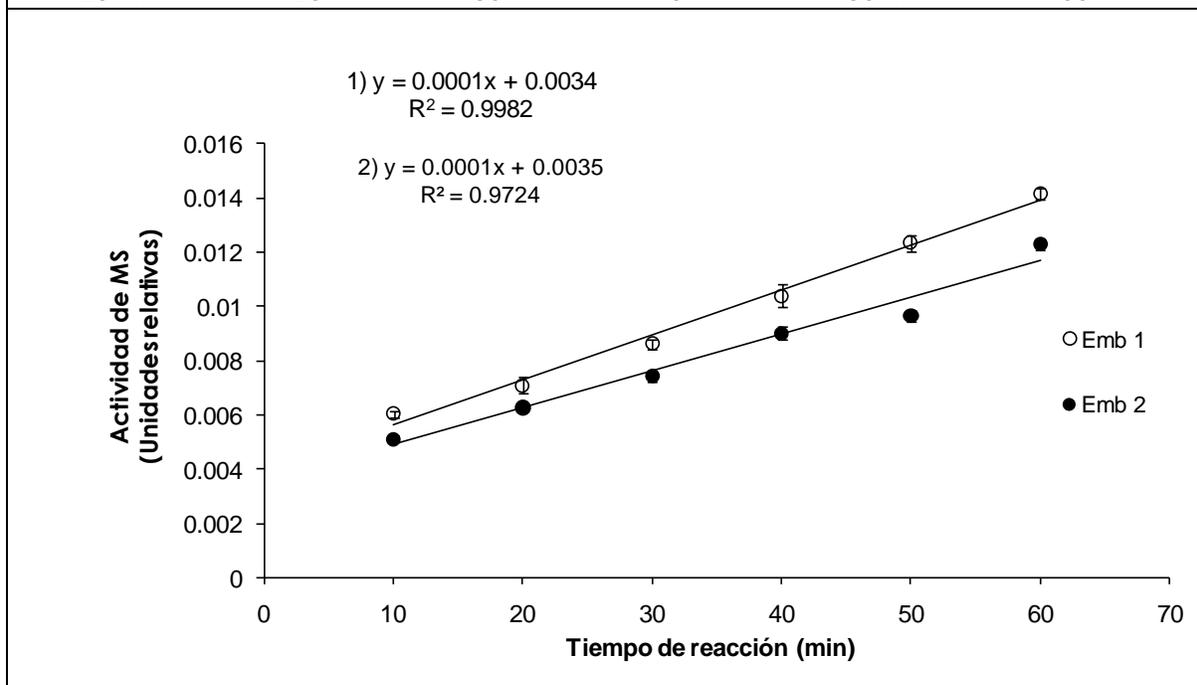
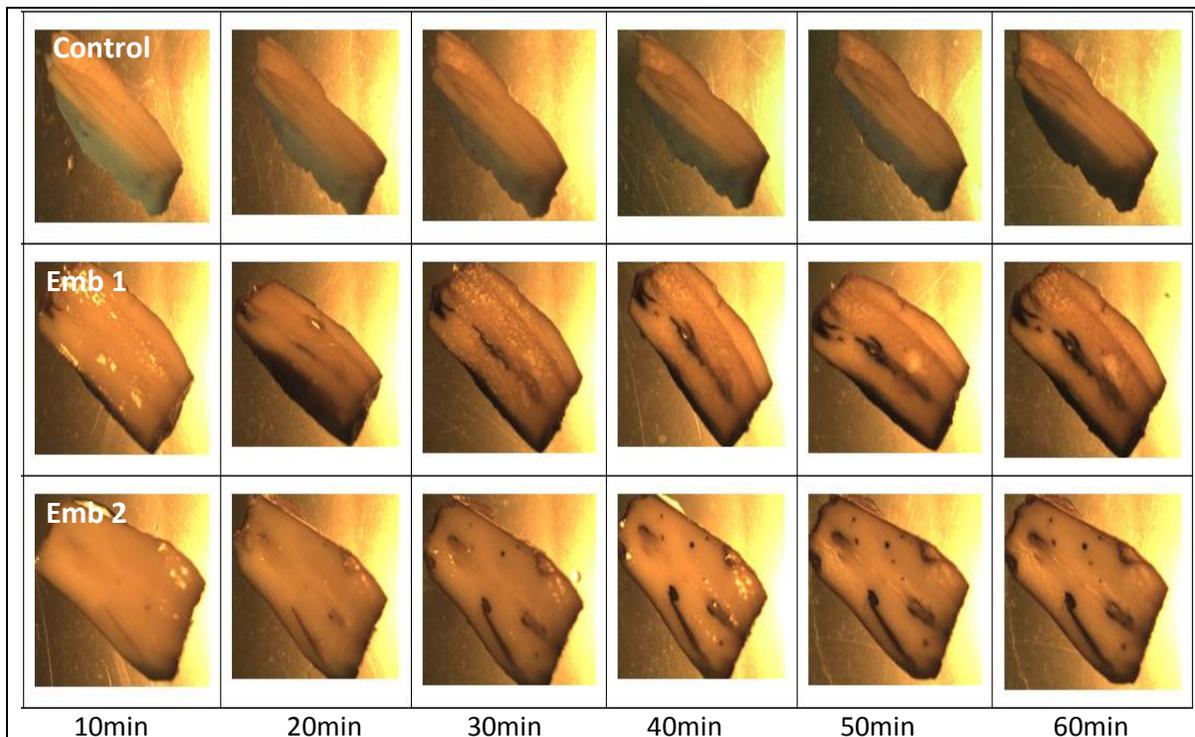


Figura 31. Detección *in situ* de la actividad de la MS en embriones de maíz germinados 8h. Los embriones extraídos de las semillas se fijaron según se describe en la sección de Materiales y métodos, se monitoreó la aparición de la coloración azul en dichos embriones por 60 min. Control: embrión sin adición de los sustratos acetil-CoA ni Glioxilato. Emb 1 y 2: embriones sometidos a la reacción mencionada en Materiales y métodos. A) Se tomaron fotos de los embriones para cada tiempo de germinación y B) se obtuvieron las curvas temporales de actividad de la MS mediante la medición de la intensidad en la coloración usando el programa Motic Images Plus 2.0.

A



B

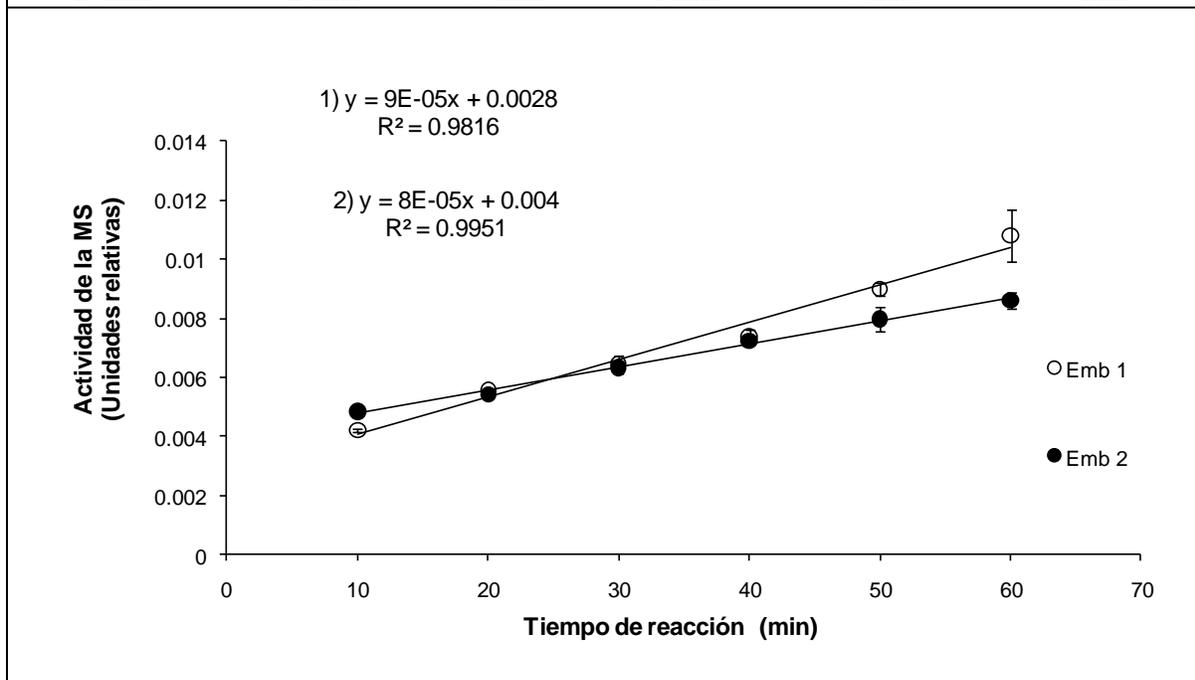
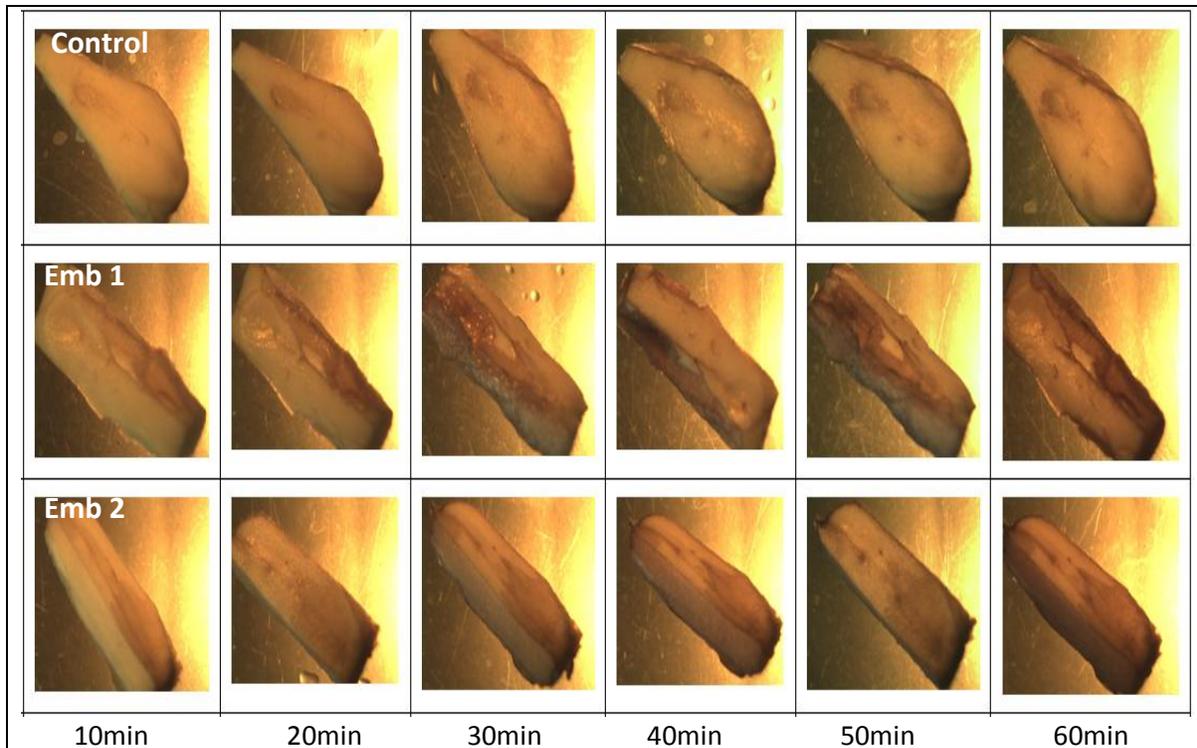
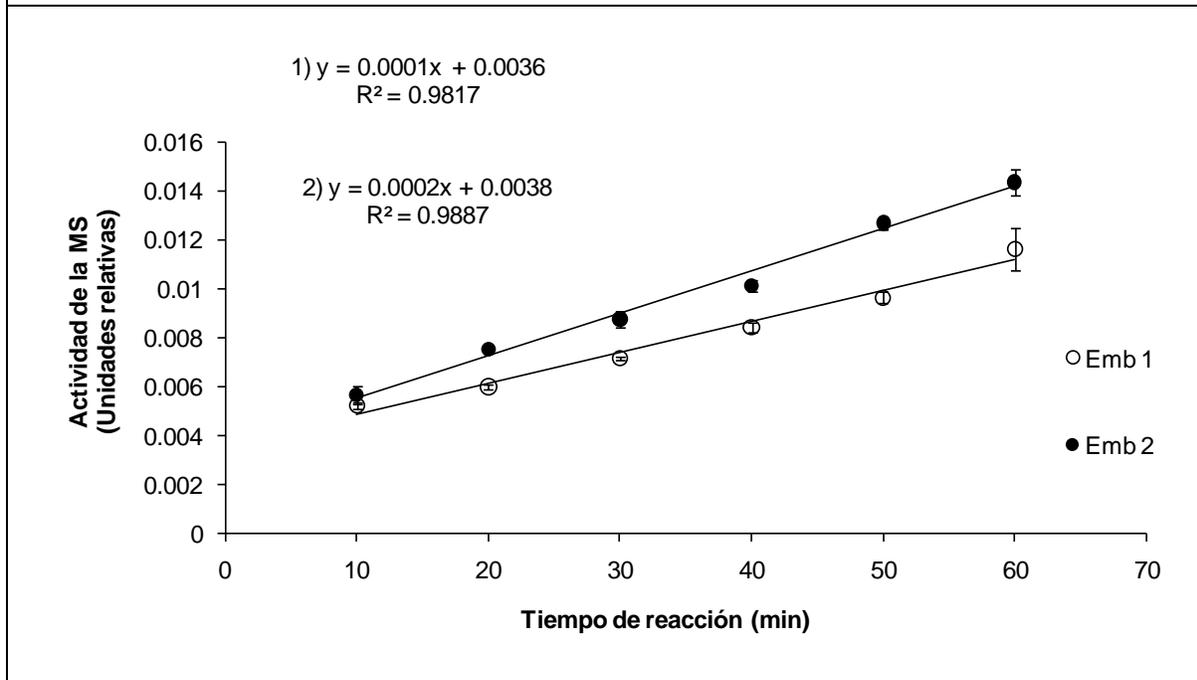


Figura 32. Detección *in situ* de la actividad de la MS en embriones de maíz germinados 12h. Los embriones extraídos de las semillas se fijaron según se describe en la sección de Materiales y métodos, se monitoreó la aparición de la coloración azul en dichos embriones por 60 min. Control: embrión sin adición de los sustratos acetil-CoA ni Glioxilato. Emb 1 y 2: embriones sometidos a la reacción mencionada en Materiales y métodos. A) Se tomaron fotos de los embriones para cada tiempo de germinación y B) se obtuvieron las curvas temporales de actividad de la MS mediante la medición de la intensidad en la coloración usando el programa Motic Images Plus 2.0.

A

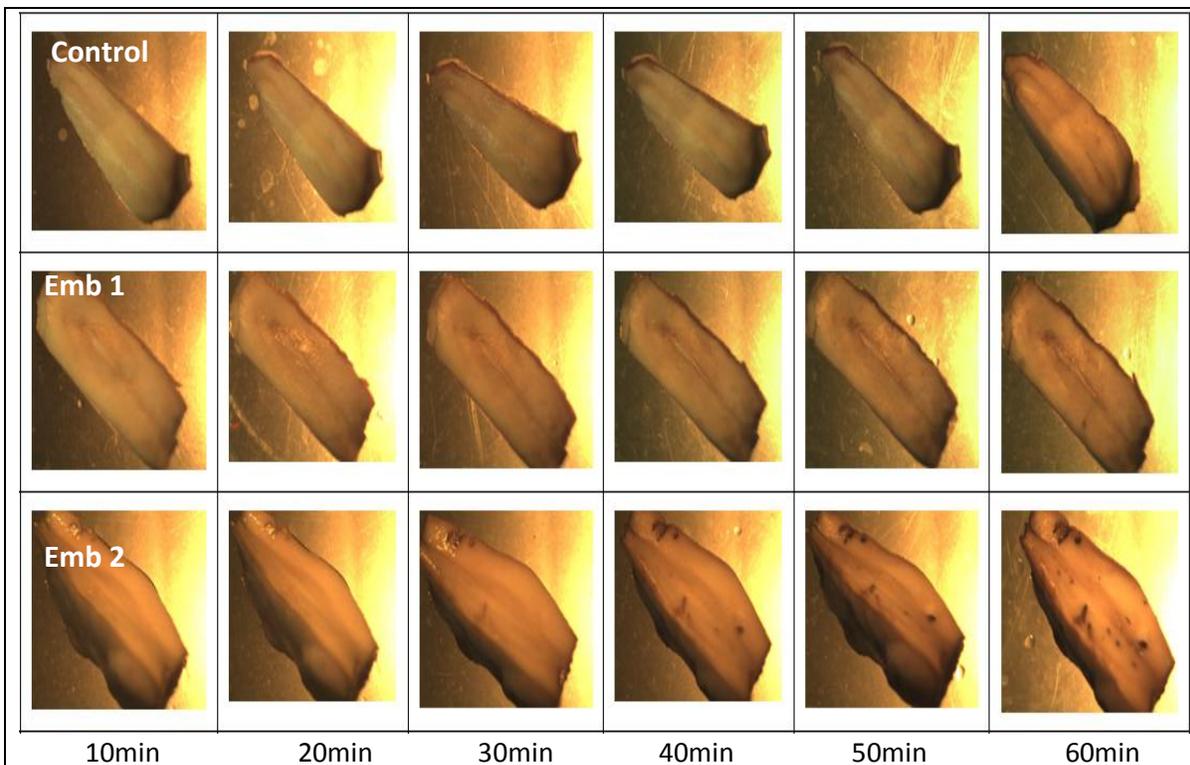


B

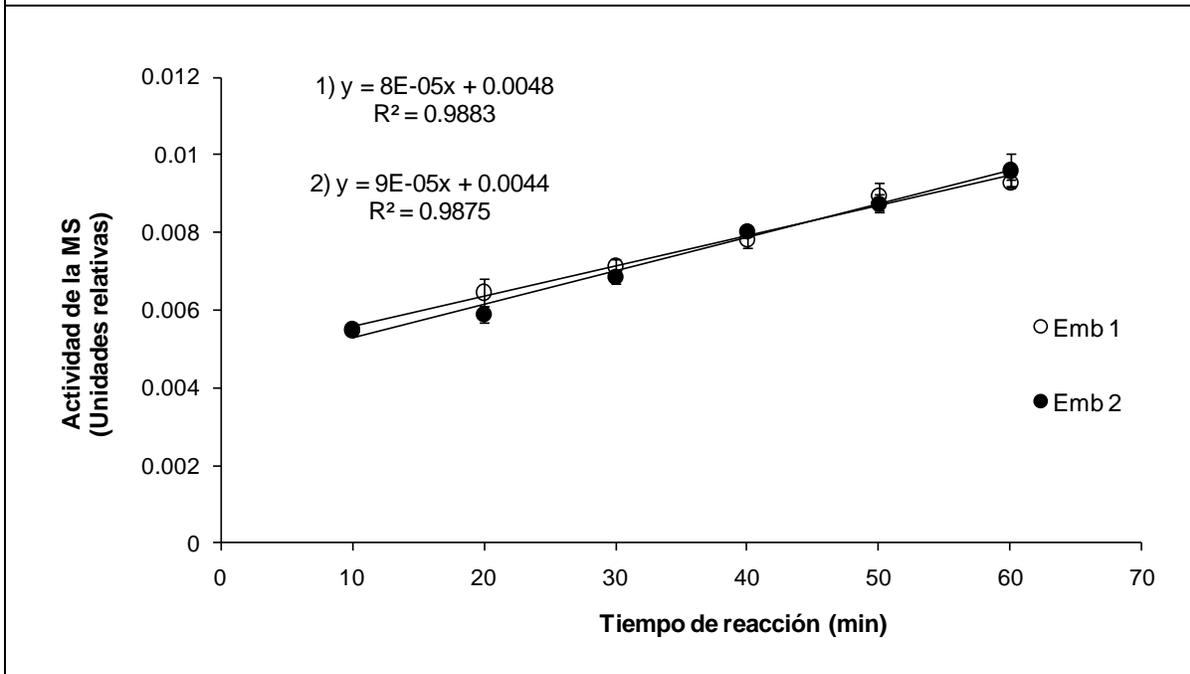


**Figura 33. Detección *in situ* de la actividad de la MS en embriones de maíz germinados 18h.** Los embriones extraídos de las semillas se fijaron según se describe en la sección de Materiales y métodos, se monitoreó la aparición de la coloración azul en dichos embriones por 60 min. Control: embrión sin adición de los sustratos acetil-CoA ni Glioxilato. Emb 1 y 2: embriones sometidos a la reacción mencionada en Materiales y métodos. A) Se tomaron fotos de los embriones para cada tiempo de germinación y B) se obtuvieron las curvas temporales de actividad de la MS mediante la medición de la intensidad en la coloración usando el programa Motic Images Plus 2.0.

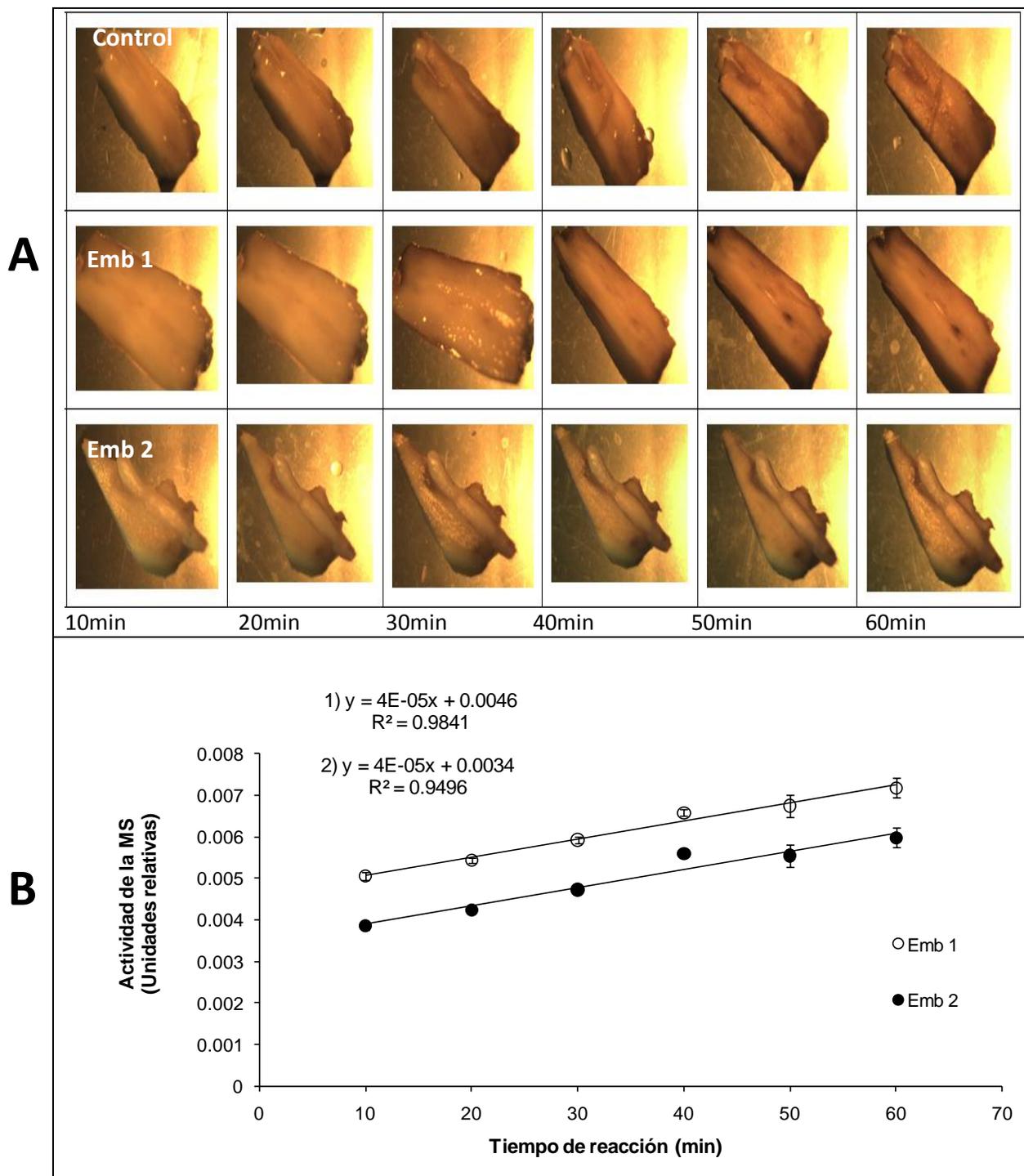
A



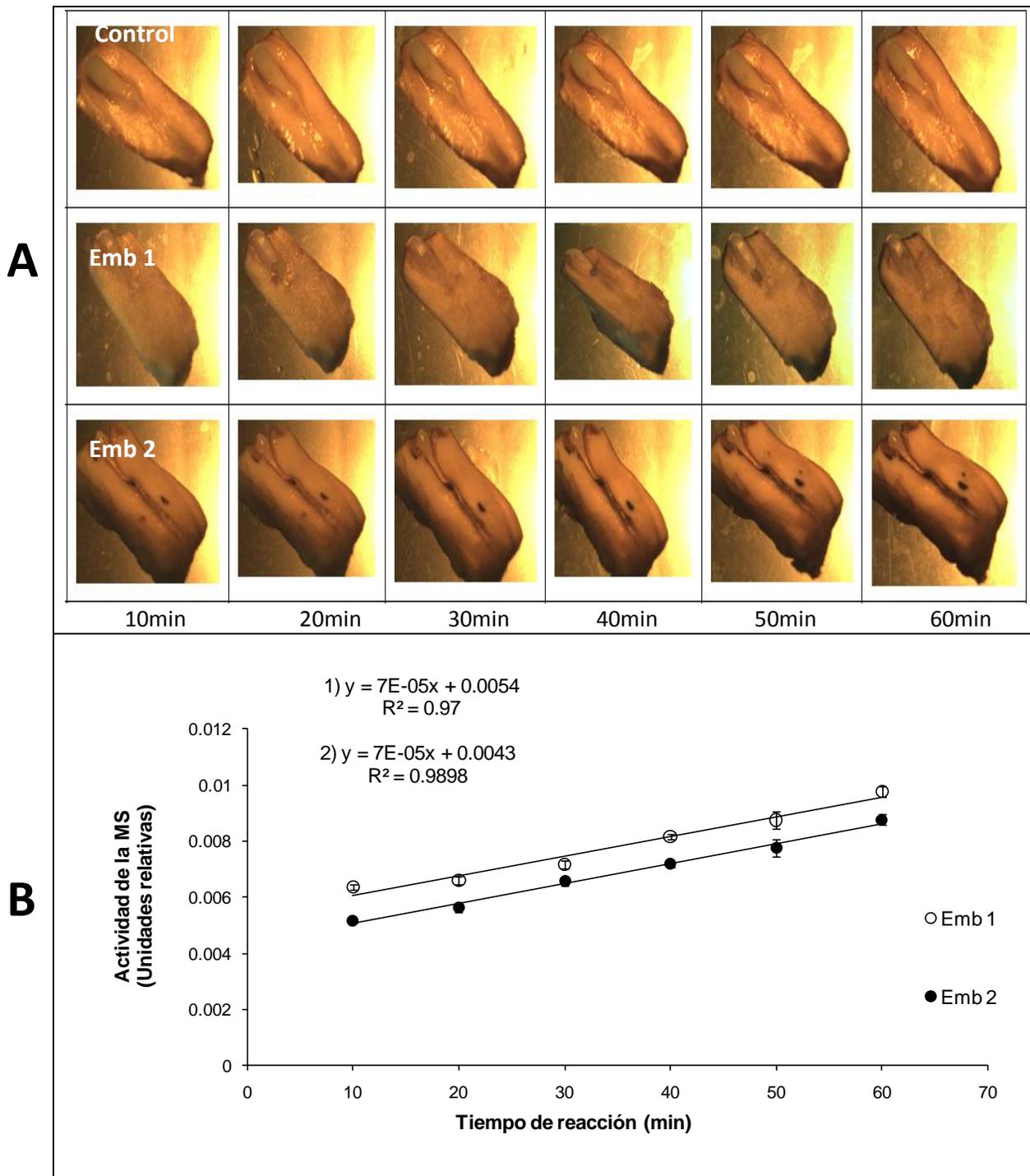
B



**Figura 34. Detección *in situ* de la actividad de la MS en embriones de maíz germinados 24h.** Los embriones extraídos de las semillas se fijaron según se describe en la sección de Materiales y métodos, se monitoreó la aparición de la coloración azul en dichos embriones por 60 min. Control: embrión sin adición de los sustratos acetil-CoA ni Glioxilato. Emb 1 y 2: embriones sometidos a la reacción mencionada en Materiales y métodos. A) Se tomaron fotos de los embriones para cada tiempo de germinación y B) e obtuvieron las curvas temporales de actividad de la MS mediante la medición de la intensidad en la coloración usando el programa Motic Images Plus 2.0.

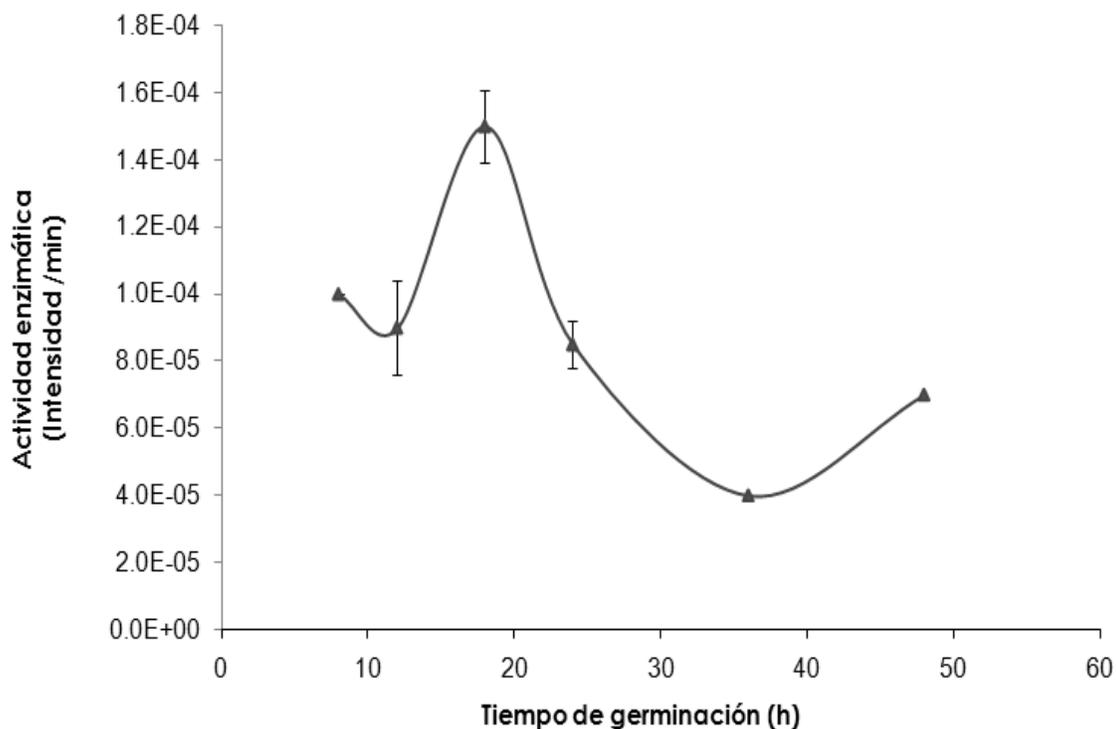


**Figura 35. Detección *in situ* de la actividad de la MS en embriones de maíz germinados 36h.** Los embriones extraídos de las semillas se fijaron según se describe en la sección de Materiales y métodos, se monitoreó la aparición de la coloración azul en dichos embriones por 60 min. Control: embrión sin adición de los sustratos acetil-CoA ni Glioxilato. Emb 1 y 2: embriones sometidos a la reacción mencionada en Materiales y métodos. A) Se tomaron fotos de los embriones para cada tiempo de germinación y B) e obtuvieron las curvas temporales de actividad de la MS mediante la medición de la intensidad en la coloración usando el programa Motic Images Plus 2.0.



**Figura 36. Detección *in situ* de la actividad de la MS en embriones de maíz germinados 48h.** Los embriones extraídos de las semillas se fijaron según se describe en la sección de Materiales y métodos, se monitoreó la aparición de la coloración azul en dichos embriones por 60 min. Control: embrión sin adición de los sustratos acetil-CoA ni Glioxilato. Emb 1 y 2: embriones sometidos a la reacción mencionada en Materiales y métodos. A) Se tomaron fotos de los embriones para cada tiempo de germinación y B) se obtuvieron las curvas temporales de actividad de la MS mediante la medición de la intensidad en la coloración usando el programa Motic Images Plus 2.0.

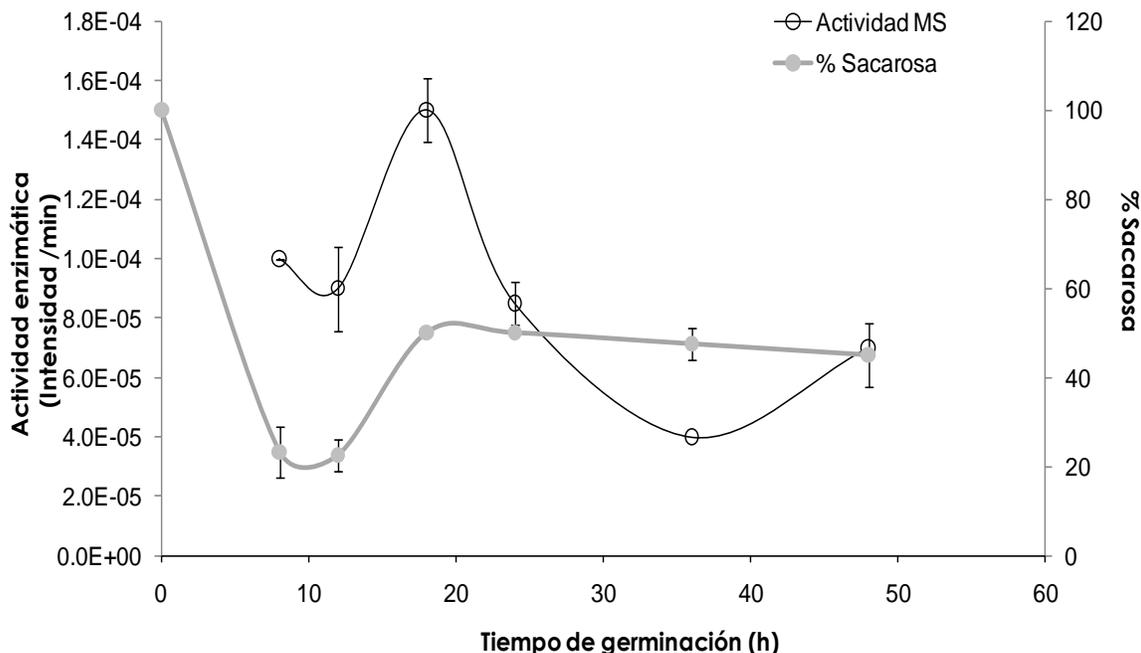
Una vez obtenidas las curvas temporales para cada tiempo de germinación, se graficaron cada una de las pendientes de las mismas para así determinar la actividad de la MS durante todo el proceso de germinación (Figura 37).



**Figura 37. Actividad enzimática de la Malato sintasa a lo largo del proceso de germinación.**

Como se puede observar en la figura anterior, hay actividad de la MS desde las 8 h, se obtiene el pico máximo de actividad a las 18 h, y posterior a las 24 h la actividad disminuye sin llegar a ser 0 a las 48 h de germinación.

Si comparamos la actividad de la Malato sintasa y los contenidos de sacarosa ambos detectados *in situ* (Figura 38), encontramos que cuando se encuentra el pico de actividad máxima de la MS es cuando el contenido de sacarosa aumenta, sin embargo, el que la concentración de sacarosa se mantenga podría hablarnos de que la actividad que se tiene posterior a las 18 h es suficiente para mantener esta concentración, o bien, que la tasa de uso de la sacarosa cercana al eje embrionario ha disminuido o a una combinación de ambos procesos.



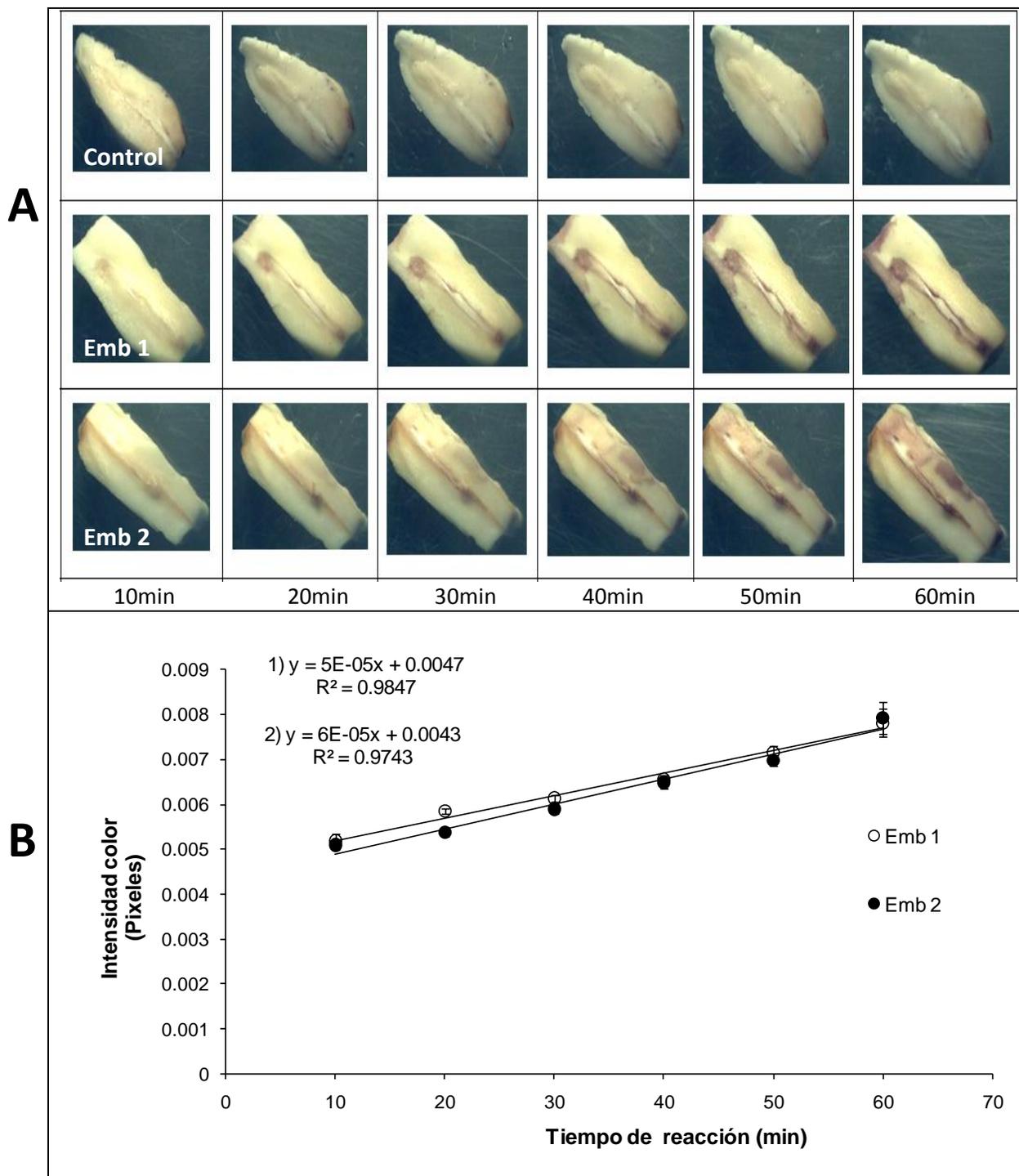
**Figura 38. Comparación de la actividad enzimática de la MS y el contenido de sacarosa a lo largo de la germinación.** Se puede apreciar que a las 18h de germinación se tiene un pico de actividad máxima para la MS, al mismo tiempo se observa un incremento en el contenido de sacarosa.

### ***Determinación del contenido de sacarosa durante la germinación de embriones de maíz infectados con *Fusarium verticillioides****

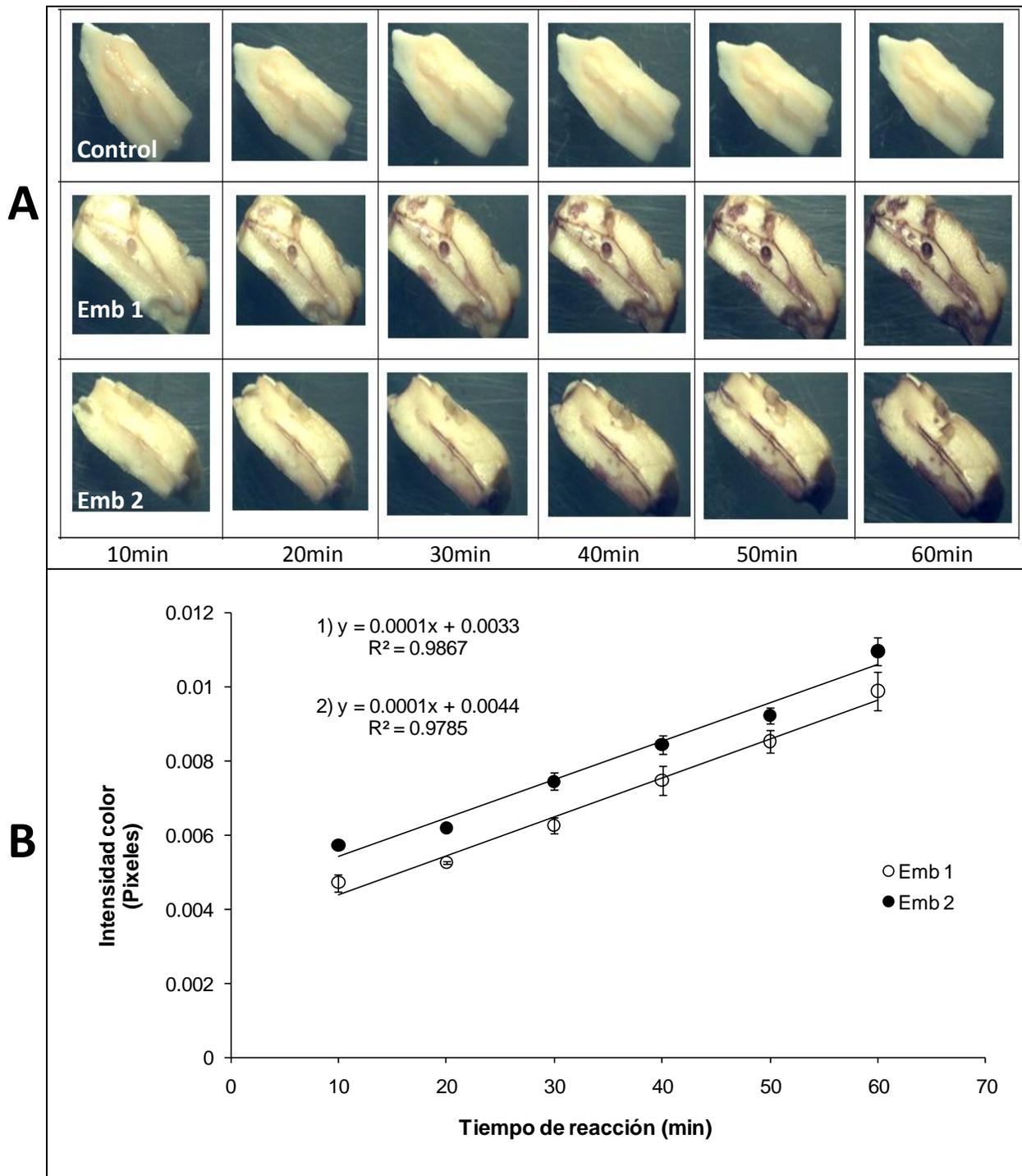
Como se ha mencionado, el metabolismo de carbono incluyendo la síntesis de sacarosa, es un proceso altamente regulado, por lo que es de esperarse que cualquier agente externo que intervenga en dichos procesos cambie el resultado de los mismos. Las plantas están expuestas a muchos factores que pueden modificar su metabolismo, dentro de estos factores están patógenos necrótrofos como el hongo *Fusarium verticillioides*. En la hipótesis del presente trabajo se planteó que al infectar la semilla de maíz con el patógeno, se apreciaría un aumento en la movilización de lípidos para la síntesis de sacarosa. Debido a que en la primera parte del trabajo experimental se confirmó el incremento en el contenido de sacarosa a partir de las 18 h de germinación y que coincide con el

pico máximo de actividad de la malato sintasa, en esta segunda parte se emplearon embriones germinados de maíz infectados con el hongo con el fin de determinar si existe algún cambio en el contenido de sacarosa como primer paso y posteriormente la determinación de la actividad de la malato sintasa.

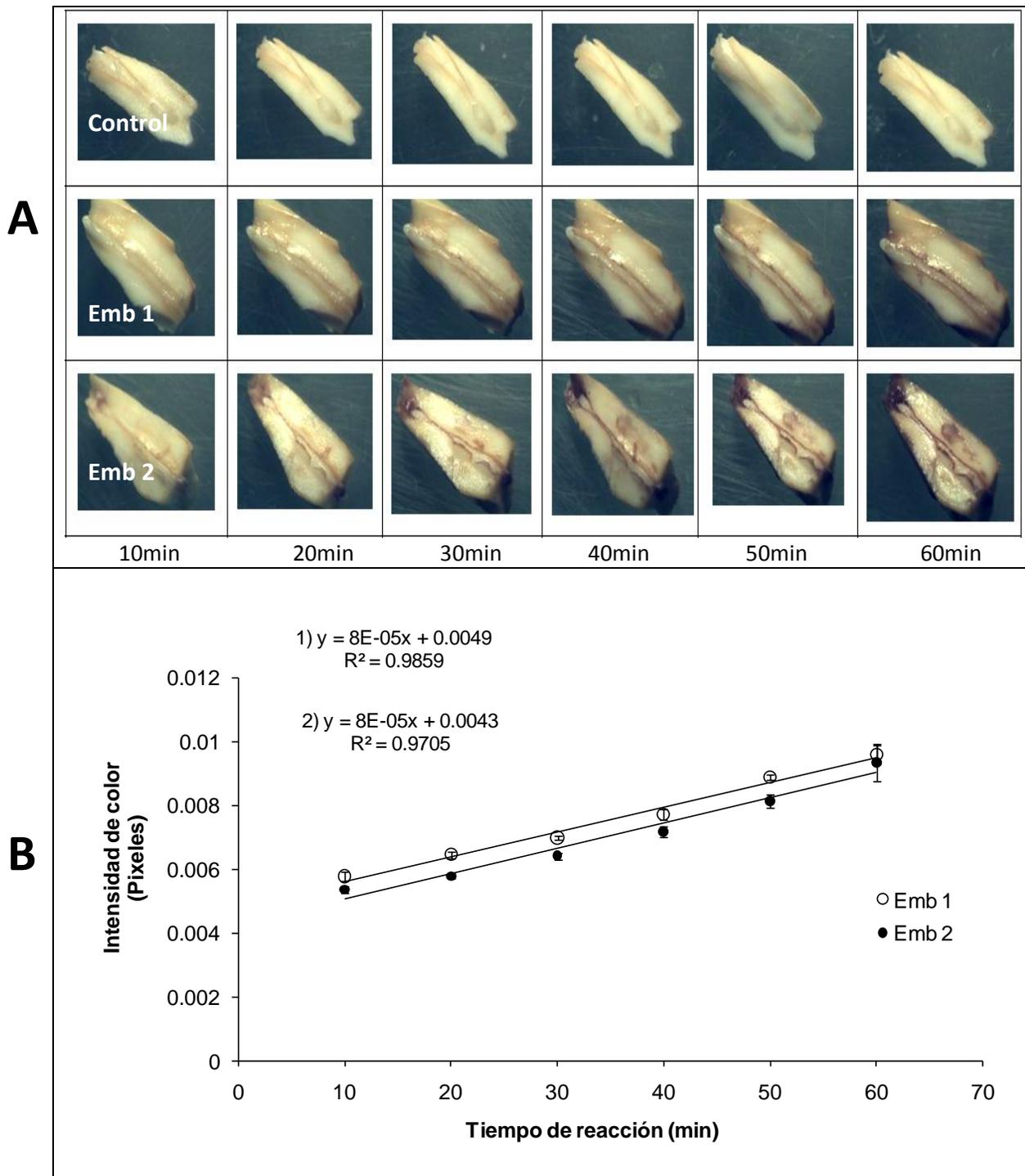
Para cada uno de los tiempos de germinación con el patógeno se muestra en el panel A los embriones teñidos por la precipitación del reactivo de NBT reducido; cada embrión fue incubado y monitoreado durante 1 h, con una distribución similar a la que se mostró en los paneles de detección del contenido de sacarosa en los embriones germinados en ausencia de patógeno. Cabe mencionar que a tiempos largos de germinación en presencia del hongo, es decir, a partir de las 24 h de germinación, comienza a apreciarse una coloración morada, pero ésta se debe al crecimiento notorio del hongo y no por la detección de sacarosa presente en el embrión, de hecho, la coloración se aprecia desde los 10 min iniciales de la reacción, a diferencia de los embriones a tiempos cortos de germinación, en donde la coloración va apareciendo gradualmente conforme la reacción avanza. La densitometría obtenida y que se muestra en los paneles B de cada una de las Figuras son el resultado de la resta de la densitometría del embrión control en el que no hubo incubación con invertasa, menos la densitometría del embrión una vez que se realizó la liberación de la glucosa.



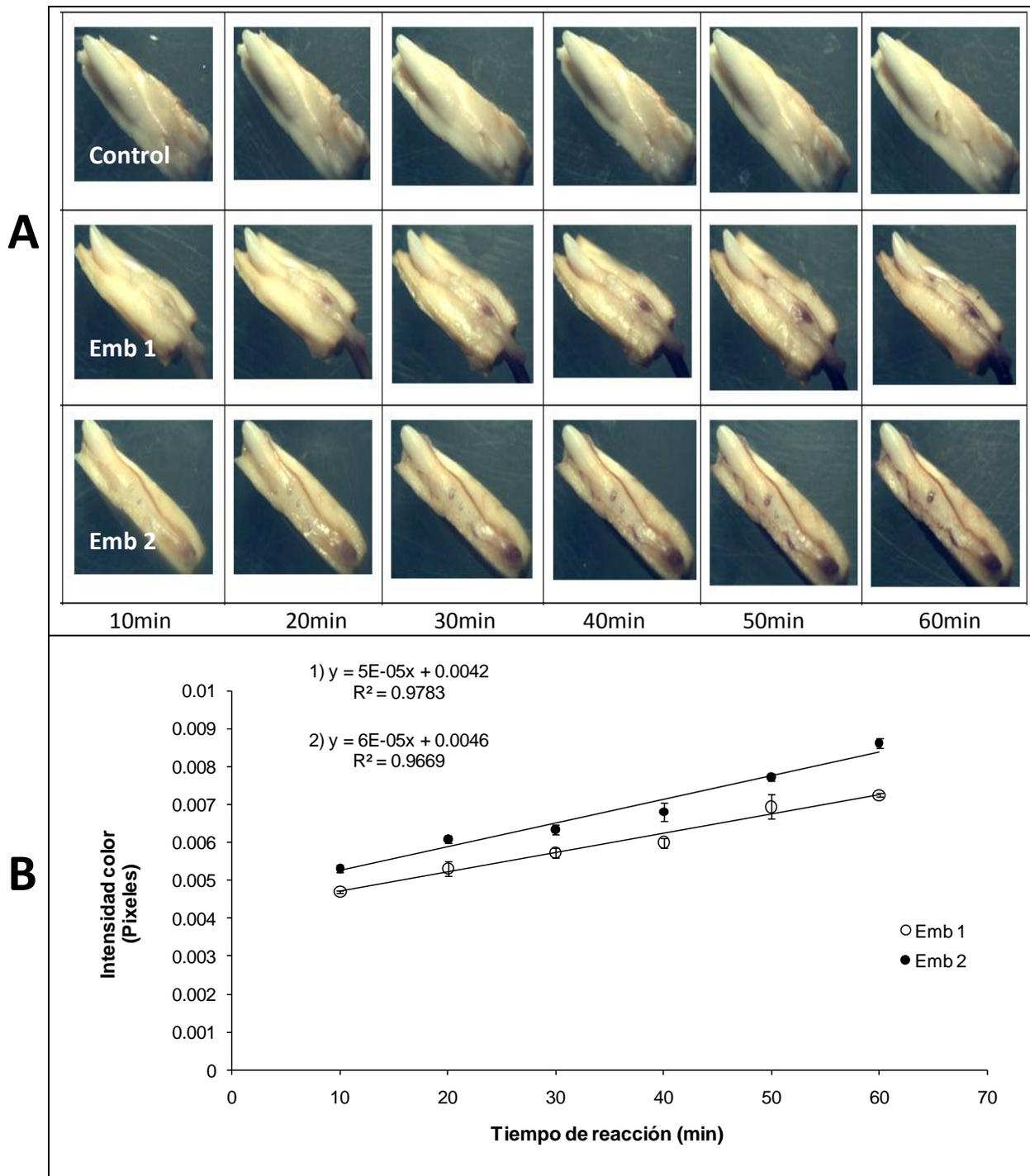
**Figura 39. Detección de sacarosa en embriones de maíz infectados 8 h. A)** Monitoreo del contenido de sacarosa en los embriones de maíz. Control. Embrión sin incubación con invertasa de levadura, Emb 1 y 2 son los embriones incubados con la invertasa de levadura por 1 h a 37°C, la glucosa proveniente de la sacarosa fue cuantificada con el reactivo de ensayo de glucosa de SIGMA donde el producto final es NADPH, el cual posteriormente reduce al reactivo de NBT, éste precipita en el embrión coloreándolo de azul. La intensidad del color es proporcional al contenido de sacarosa inicial. **B)** Densitometría de los embriones mostrados en el panel A.



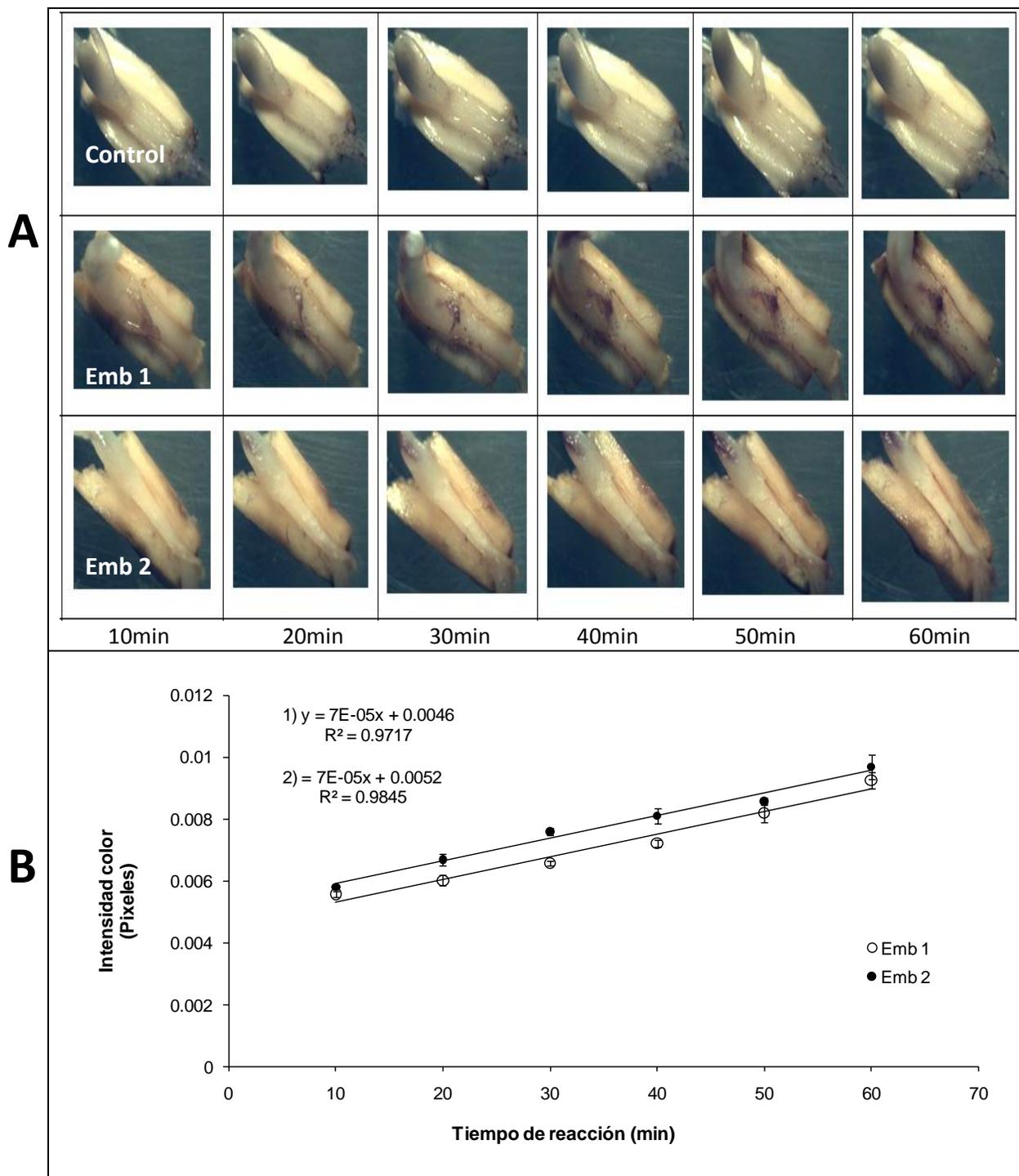
**Figura 40. Detección de sacarosa en embriones de maíz infectados 12h. A)** Monitoreo del contenido de sacarosa en los embriones de maíz. Control. Embrión sin incubación con invertasa de levadura, Emb 1 y 2 son los embriones incubados con la invertasa de levadura por 1 h a 37°C, la glucosa proveniente de la sacarosa fue cuantificada con el reactivo de ensayo de glucosa de SIGMA donde el producto final es NADPH, el cual posteriormente reduce al reactivo de NBT, éste precipita en el embrión coloreándolo de azul. La intensidad del color es proporcional al contenido de sacarosa inicial. **B)** Densitometría de los embriones mostrados en el panel A.



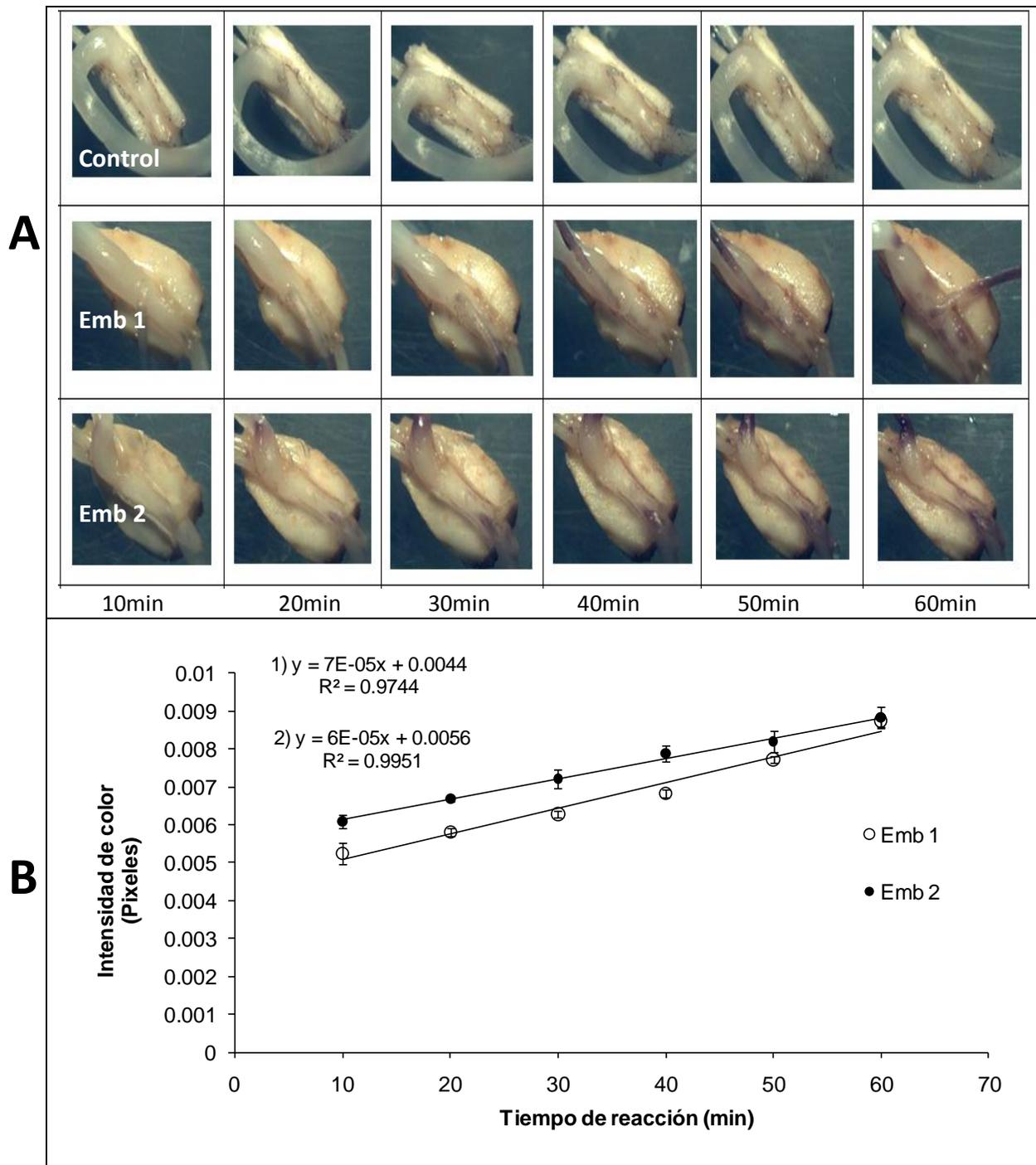
**Figura 41. Detección de sacarosa en embriones de maíz infectados 18h. A)** Monitoreo del contenido de sacarosa en los embriones de maíz. Control. Embrión sin incubación con invertasa de levadura, Emb 1 y 2 son los embriones incubados con la invertasa de levadura por 1 h a 37°C, la glucosa proveniente de la sacarosa fue cuantificada con el reactivo de ensayo de glucosa de SIGMA donde el producto final es NADPH, el cual posteriormente reduce al reactivo de NBT, éste precipita en el embrión coloreándolo de azul. La intensidad del color es proporcional al contenido de sacarosa inicial. **B)** Densitometría de los embriones mostrados en el panel A.



**Figura 42. Detección de sacarosa en embriones de maíz infectados 24h. A)** Monitoreo del contenido de sacarosa en los embriones de maíz. Control. Embrión sin incubación con invertasa de levadura, Emb 1 y 2 son los embriones incubados con la invertasa de levadura por 1 h a 37°C, la glucosa proveniente de la sacarosa fue cuantificada con el reactivo de ensayo de glucosa de SIGMA donde el producto final es NADPH, el cual posteriormente reduce al reactivo de NBT, éste precipita en el embrión coloreándolo de azul. La intensidad del color es proporcional al contenido de sacarosa inicial. **B)** Densitometría de los embriones mostrados en el panel A.

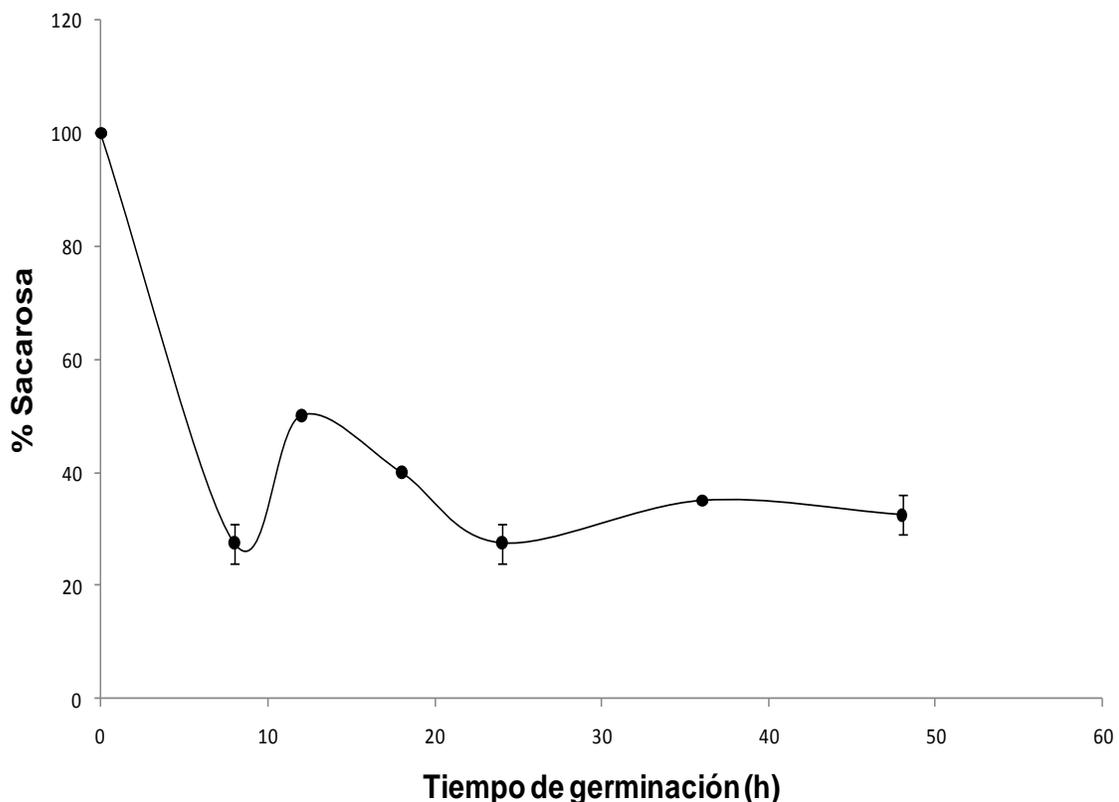


**Figura 43. Detección de sacarosa en embriones de maíz infectados 36h. A)** Monitoreo del contenido de sacarosa en los embriones de maíz. Control. Embrión sin incubación con invertasa de levadura, Emb 1 y 2 son los embriones incubados con la invertasa de levadura por 1 h a 37°C, la glucosa proveniente de la sacarosa fue cuantificada con el reactivo de ensayo de glucosa de SIGMA donde el producto final es NADPH, el cual posteriormente reduce al reactivo de NBT, éste precipita en el embrión coloreándolo de azul. La intensidad del color es proporcional al contenido de sacarosa inicial. **B)** Densitometría de los embriones mostrados en el panel A.



**Figura 44. Detección de sacarosa en embriones de maíz infectados 48h. A)** Monitoreo del contenido de sacarosa en los embriones de maíz. Control. Embrión sin incubación con invertasa de levadura, Emb 1 y 2 son los embriones incubados con la invertasa de levadura por 1 h a 37°C, la glucosa proveniente de la sacarosa fue cuantificada con el reactivo de ensayo de glucosa de SIGMA donde el producto final es NADPH, el cual posteriormente reduce al reactivo de NBT, éste precipita en el embrión coloreándolo de azul. La intensidad del color es proporcional al contenido de sacarosa inicial. **B)** Densitometría de los embriones mostrados en el panel A.

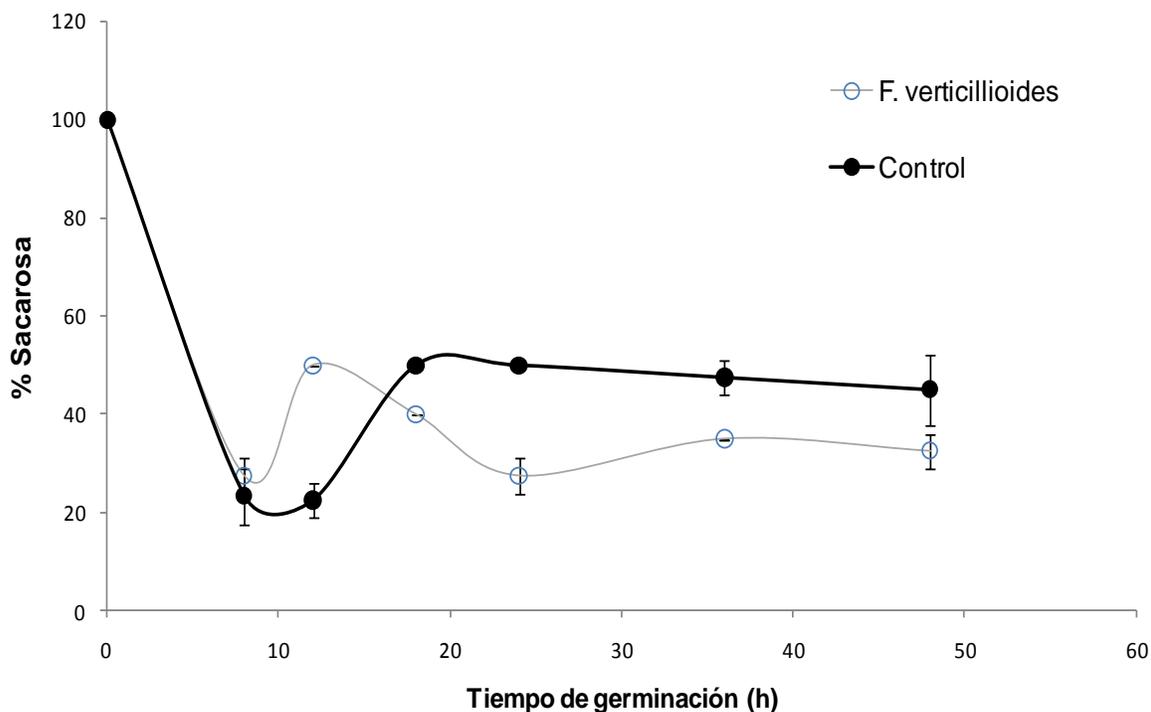
Una vez graficadas las curvas temporales para cada tiempo de germinación, se obtuvo la gráfica de la Figura 45, tomando como 100% el contenido de sacarosa en el embrión sin germinar. Se puede apreciar que de las 0 a las 8 h de germinación el contenido de sacarosa disminuye notablemente, cerca del 70% menos, sin embargo, para las 12 h de germinación se muestra un incremento hasta valores cercanos del 50% de la sacarosa inicial (tiempo 0); transcurrido este tiempo y conforme la germinación avanza el porcentaje de sacarosa en el embrión vuelve a disminuir para mantenerse constante hasta alcanzar las 48h de germinación



**Figura 45.** Contenido de sacarosa durante la germinación de embriones de maíz infectados con *F. verticillioides*.

Como se puede observar, en la primera sección de este trabajo experimental se obtuvo el contenido de sacarosa en embriones “sanos”, para comprobar si este contenido se modificaba en presencia de un patógeno se determinó el contenido de sacarosa en embriones infectados con *Fusarium verticillioides*. Al comparar el

contenido de sacarosa durante la germinación de ambos lotes de embriones encontramos que el pico máximo de sacarosa se presenta 6 horas antes en presencia del patógeno (Figura 46). No obstante lo anterior, el patógeno no induce una síntesis sostenida o una acumulación sostenida, por lo contrario disminuye el contenido de sacarosa a tiempos posteriores, cerca de 20% menos que los que hay en el embrión sano. Probablemente *Fusarium* está utilizando a la sacarosa como una fuente de carbono para su sobrevivencia.



**Figura 46.** Comparación del contenido de sacarosa presente en embriones de maíz durante la germinación. Se presentan los controles (●) y los infectados con *Fusarium verticillioides* (○).

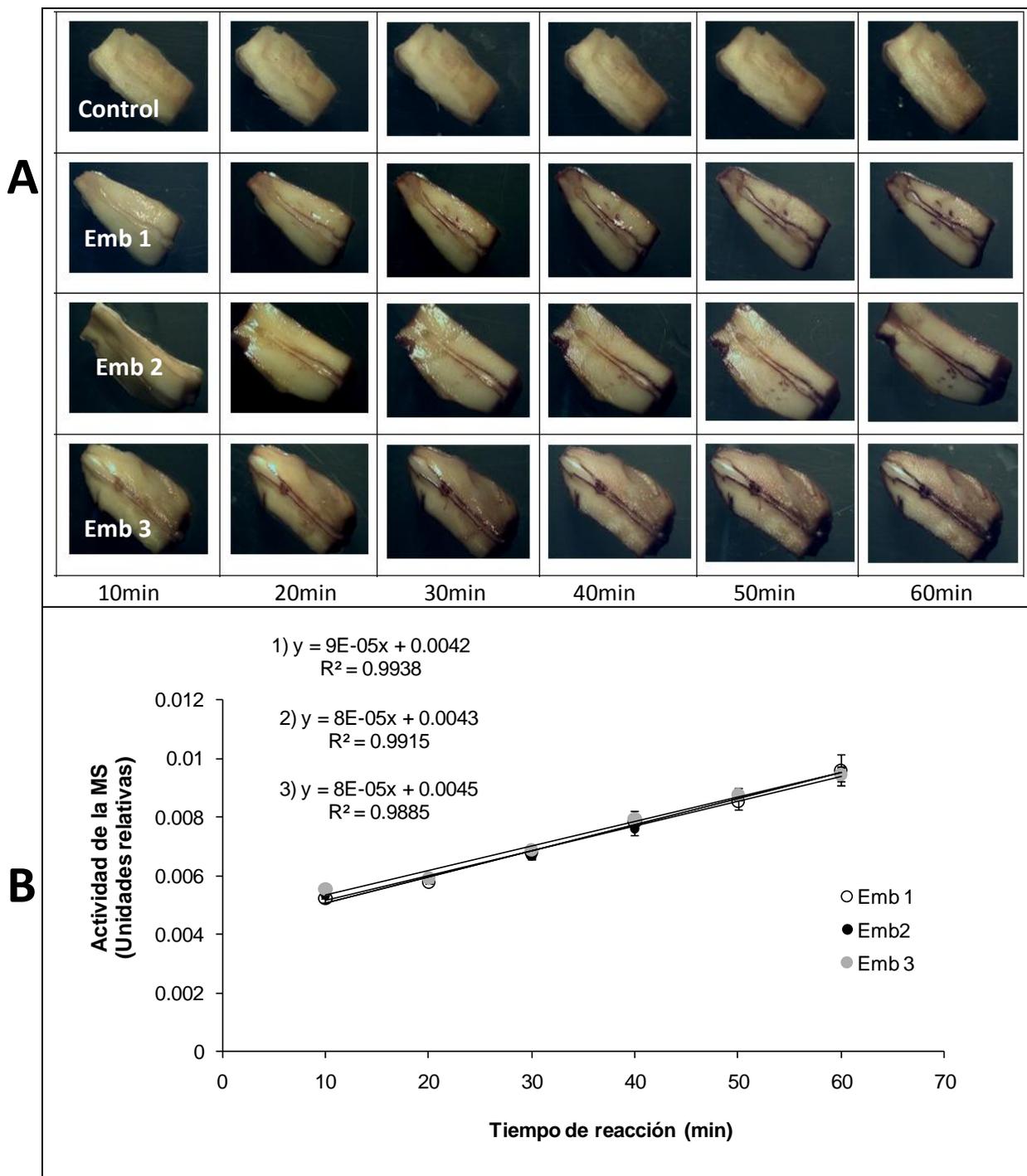
---

***Detección de la actividad enzimática in situ de la Malato sintasa en embriones germinados de maíz infectados con el hongo *Fusarium verticillioides****

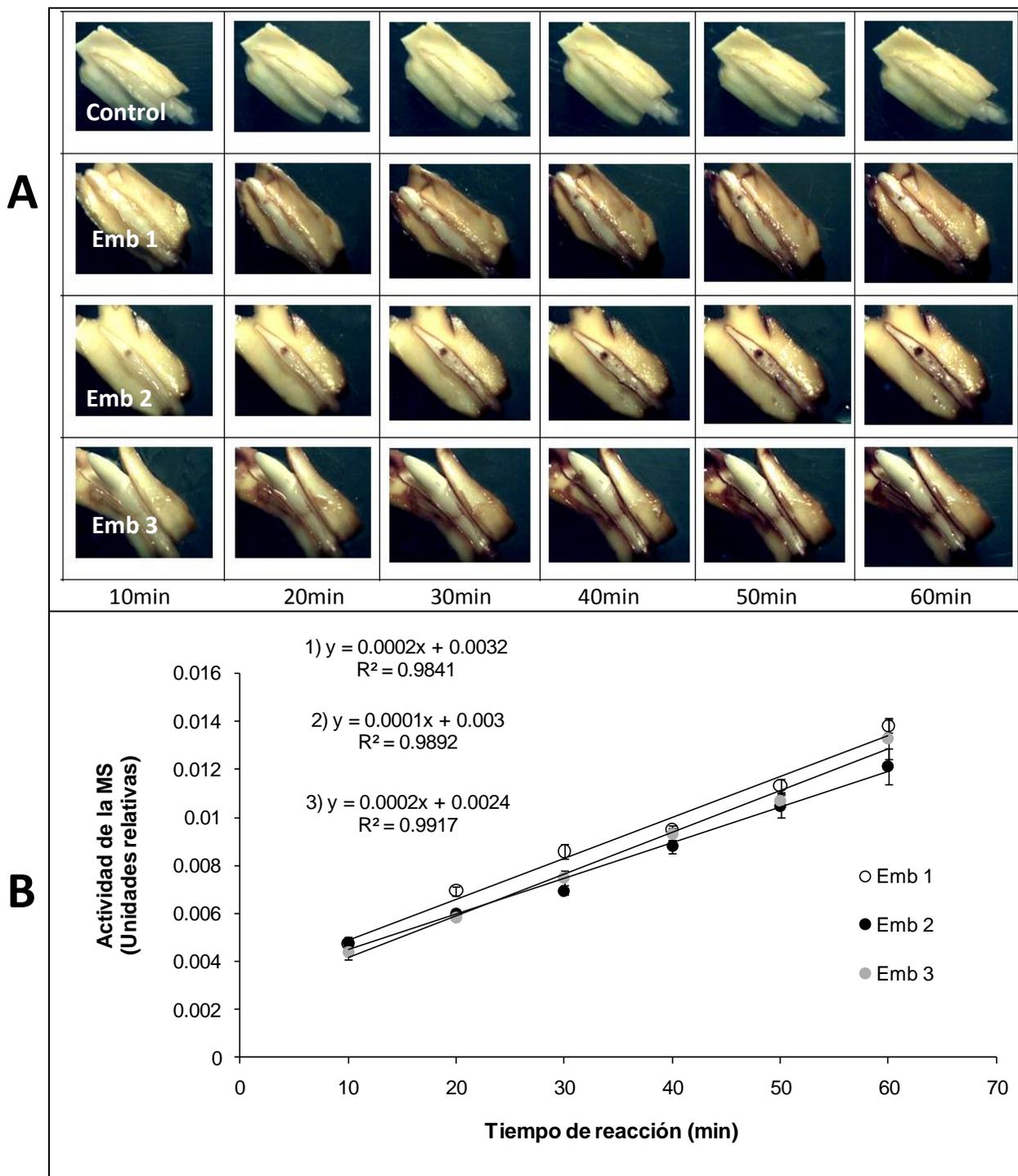
Ya que se observó un incremento transitorio en la concentración de sacarosa a las 12 h de la germinación determinamos entonces si también la actividad de la enzima Malato sintasa había aparecido antes en los embriones infectados con el patógeno.

Una vez germinados los embriones con el patógeno por 8, 12, 18, 24, 36 y 48h (Figuras 47-52), se llevó a cabo la reacción acoplada que se describe en la sección de Materiales y métodos. Se muestran en el panel A los embriones infectados teñidos por la precipitación del reactivo de NBT reducido, cada embrión fue incubado y monitoreado durante 1 h. La primera línea corresponde al embrión control, al cual no se le agregaron los sustratos glioxilato ni acetil-CoA al medio de reacción. Las líneas siguientes corresponden a los embriones infectados en los cuales se llevó a cabo la reacción completa.

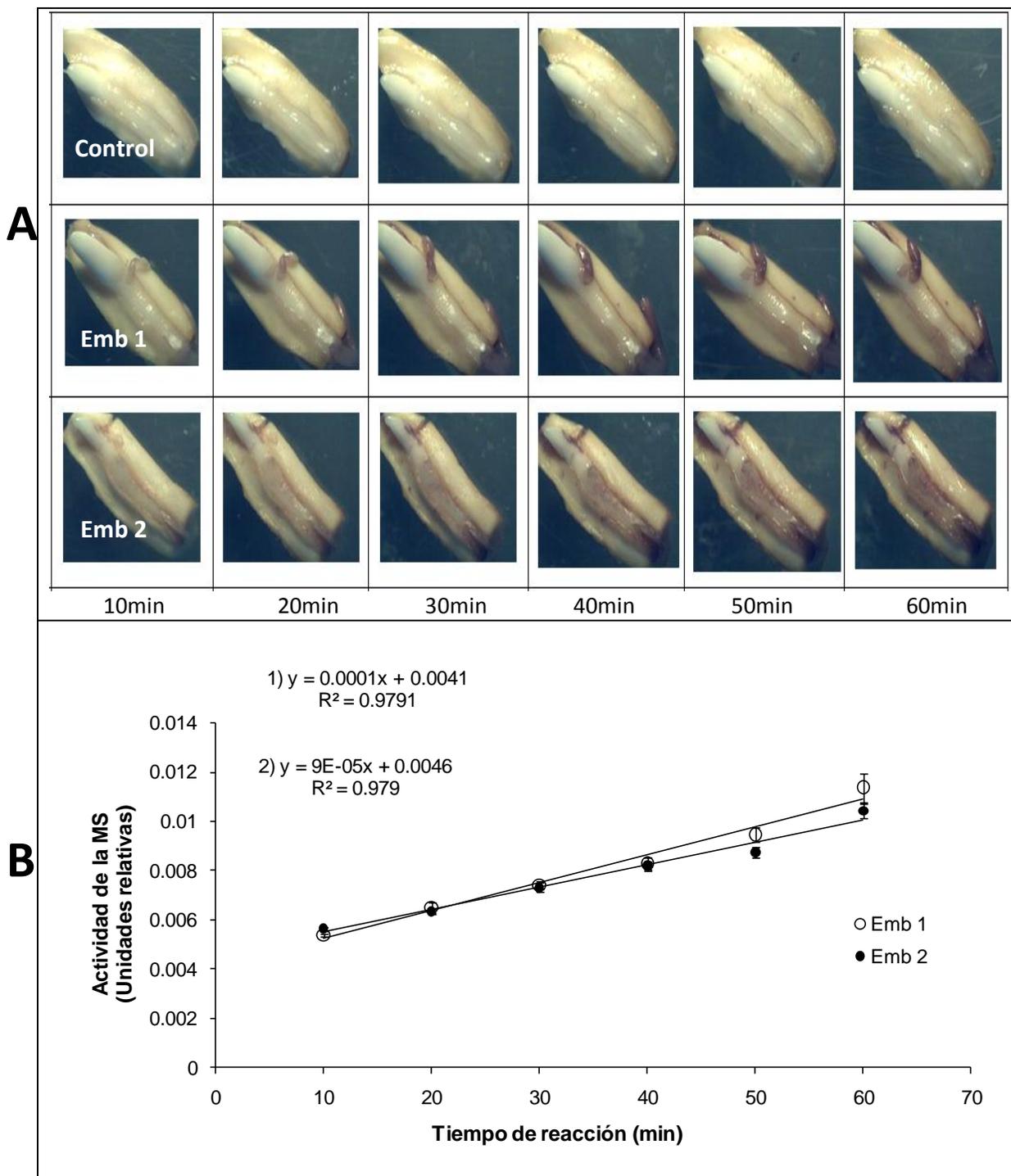
A todos los embriones se les determinó la densitometría y se obtuvieron las curvas temporales de actividad de la MS que se muestran en el panel B, la pendiente obtenida de las mismas corresponde a la actividad de la MS para cada tiempo de germinación.



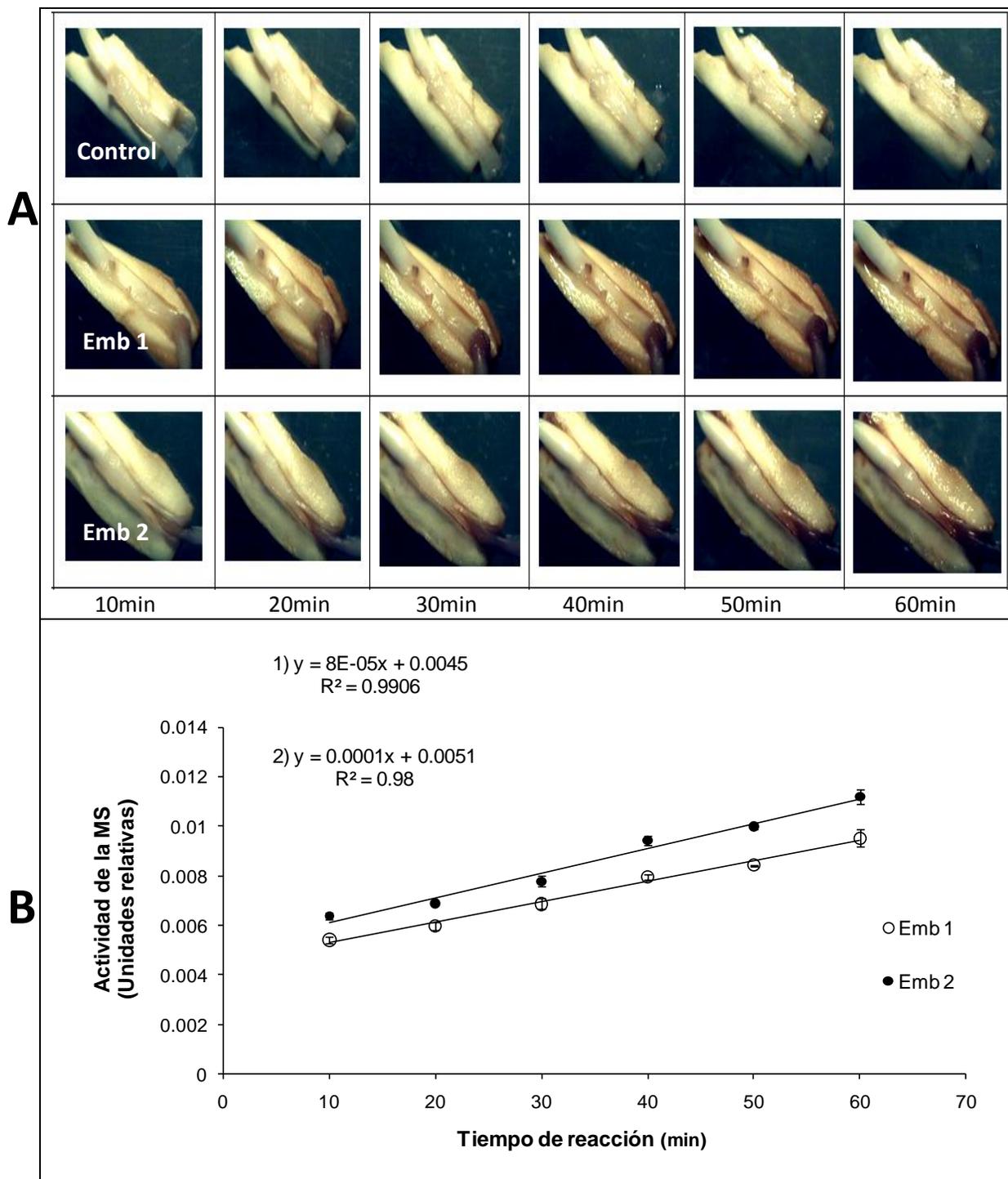
**Figura 47. Detección *in situ* de la actividad de la MS en embriones de maíz germinados 8h con el patógeno.** Los embriones extraídos de las semillas se fijaron y se inocularon con conidios de *F. verticillioides* como se describe en la sección de Materiales y métodos, se monitoreó la aparición de la coloración azul en dichos embriones por 60 min. Control: embrión sin adición de los sustratos acetyl-CoA ni Glioxilato. Emb 1, 2 y 3: embriones sometidos a la reacción mencionada en Materiales y métodos. A) Se tomaron fotos de los embriones para cada tiempo de germinación y B) e obtuvieron las curvas temporales de actividad de la MS mediante la medición de la intensidad en la coloración usando el programa Motic Images Plus 2.0



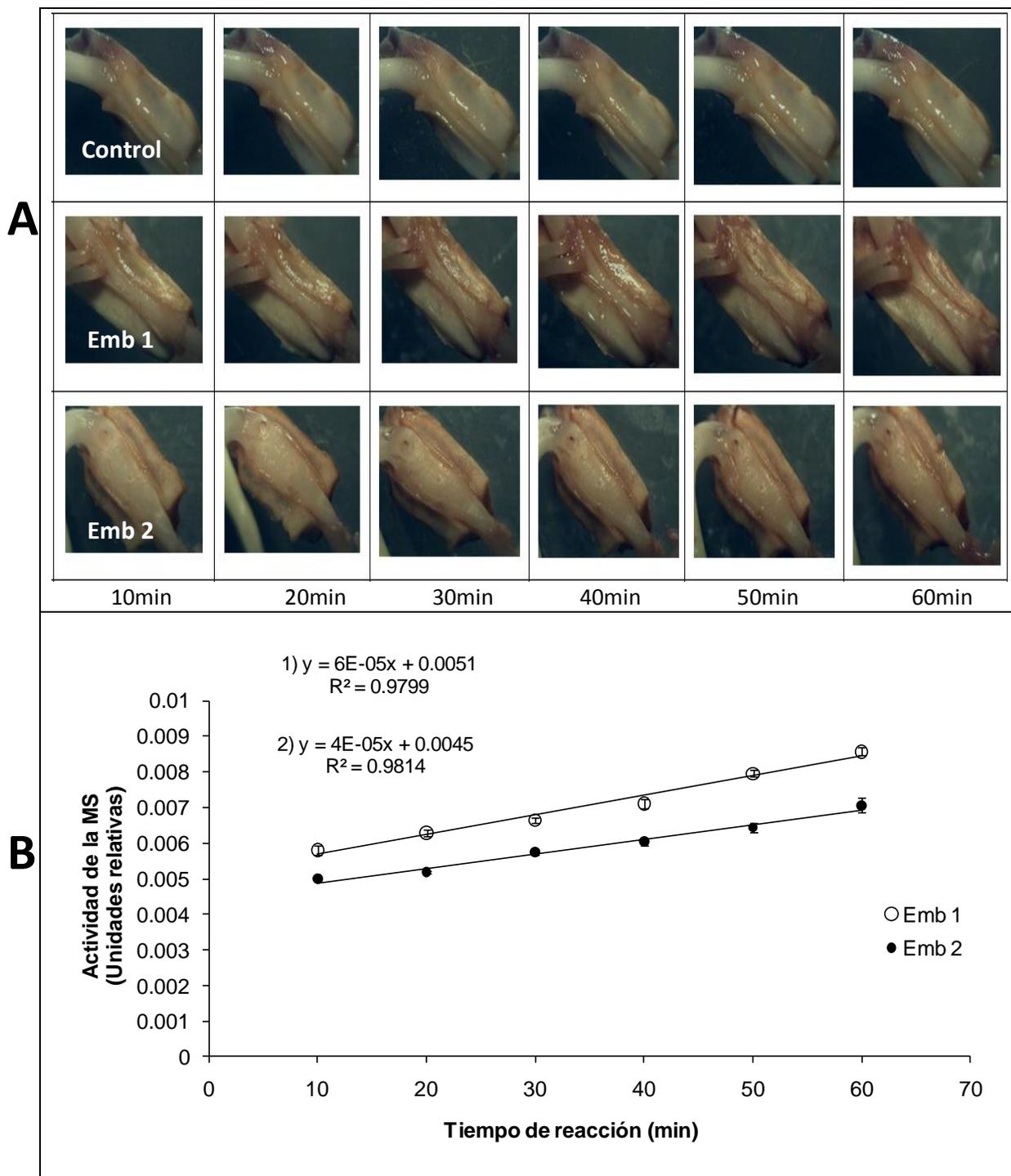
**Figura 48. Detección *in situ* de la actividad de la MS en embriones de maíz germinados 12h con el patógeno.** Los embriones extraídos de las semillas se fijaron y se inocularon con conidios de *F. verticillioides* como se describe en la sección de Materiales y métodos, se monitoreó la aparición de la coloración azul en dichos embriones por 60 min. Control: embrión sin adición de los sustratos acetil-CoA ni Glioxilato. Emb 1, 2 y 3: embriones sometidos a la reacción mencionada en Materiales y métodos. A) Se tomaron fotos de los embriones para cada tiempo de germinación y B) se obtuvieron las curvas temporales de actividad de la MS mediante la medición de la intensidad en la coloración usando el programa Motic Images Plus 2.0.



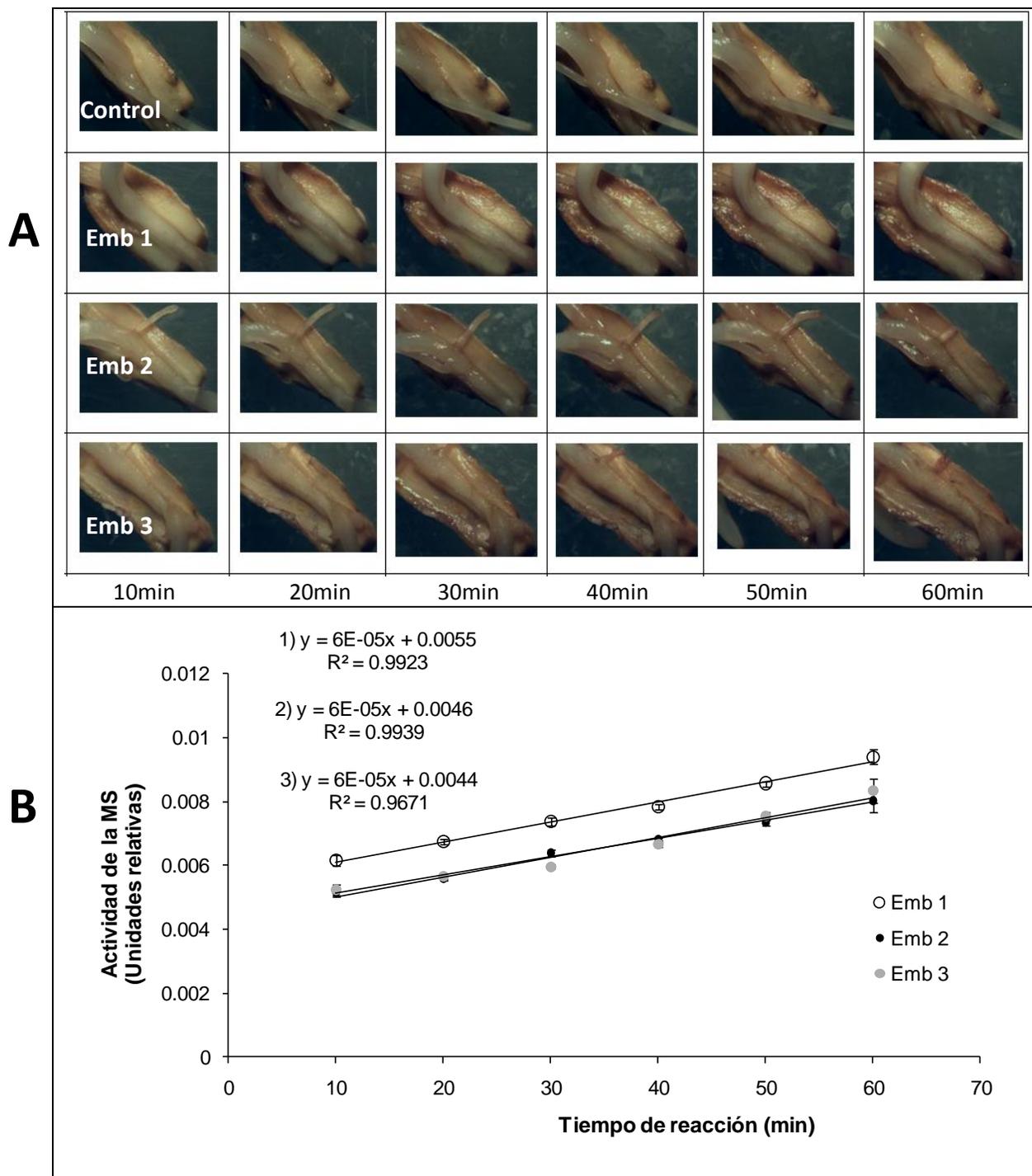
**Figura 49. Detección *in situ* de la actividad de la MS en embriones de maíz germinados 18h con el patógeno.** Los embriones extraídos de las semillas se fijaron y se inocularon con conidios de *F. verticillioides* como se describe en la sección de Materiales y métodos, se monitoreó la aparición de la coloración azul en dichos embriones por 60 min. Control: embrión sin adición de los sustratos acetil-CoA ni Glioxilato. Emb 1 y 2: embriones sometidos a la reacción mencionada en Materiales y métodos. A) Se tomaron fotos de los embriones para cada tiempo de germinación y B) e obtuvieron las curvas temporales de actividad de la MS mediante la medición de la intensidad en la coloración usando el programa Motic Images Plus 2.0.



**Figura 50. Detección *in situ* de la actividad de la MS en embriones de maíz germinados 24h con el patógeno.** Los embriones extraídos de las semillas se fijaron y se inocularon con conidios de *F. verticillioides* como se describe en la sección de Materiales y métodos, se monitoreó la aparición de la coloración azul en dichos embriones por 60 min. Control: embrión sin adición de los sustratos acetil-CoA ni Glioxilato. Emb 1 y 2: embriones sometidos a la reacción mencionada en Materiales y métodos. A) Se tomaron fotos de los embriones para cada tiempo de germinación y B) se obtuvieron las curvas temporales de actividad de la MS mediante la medición de la intensidad en la coloración usando el programa Motic Images Plus 2.0.

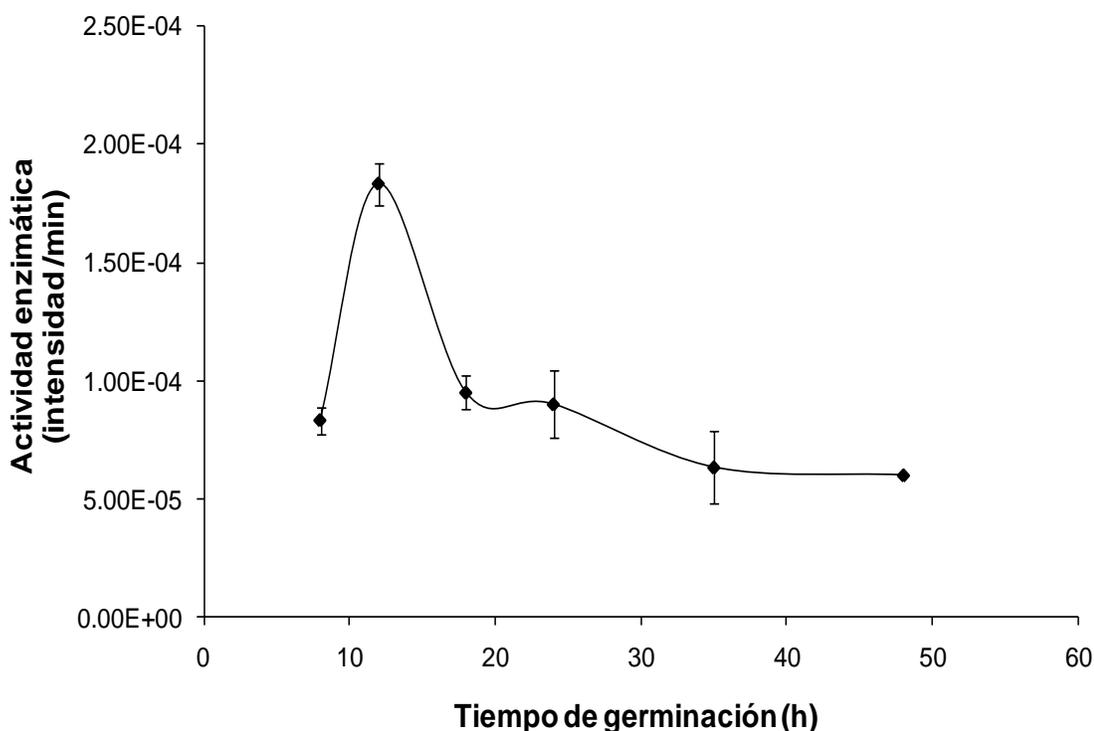


**Figura 51. Detección *in situ* de la actividad de la MS en embriones de maíz germinados 36h con el patógeno.** Los embriones extraídos de las semillas se fijaron y se inocularon con conidios de *F. verticillioides* como se describe en la sección de Materiales y métodos, se monitoreó la aparición de la coloración azul en dichos embriones por 60 min. Control: embrión sin adición de los sustratos acetil-CoA ni Glioxilato. Emb 1 y 2: embriones sometidos a la reacción mencionada en Materiales y métodos. A) Se tomaron fotos de los embriones para cada tiempo de germinación y B) se obtuvieron las curvas temporales de actividad de la MS mediante la medición de la intensidad en la coloración usando el programa Motic Images Plus 2.0.



**Figura 52. Detección *in situ* de la actividad de la MS en embriones de maíz germinados 48h con el patógeno.** Los embriones extraídos de las semillas se fijaron y se inocularon con conidios de *F. verticillioides* como se describe en la sección de Materiales y métodos, se monitoreó la aparición de la coloración azul en dichos embriones por 60 min. Control: embrión sin adición de los sustratos acetil-CoA ni Glioxilato. Emb 1, 2 y 3: embriones sometidos a la reacción mencionada en Materiales y métodos. A) Se tomaron fotos de los embriones para cada tiempo de germinación y B) e obtuvieron las curvas temporales de actividad de la MS mediante la medición de la intensidad en la coloración usando el programa Motic Images Plus 2.0.

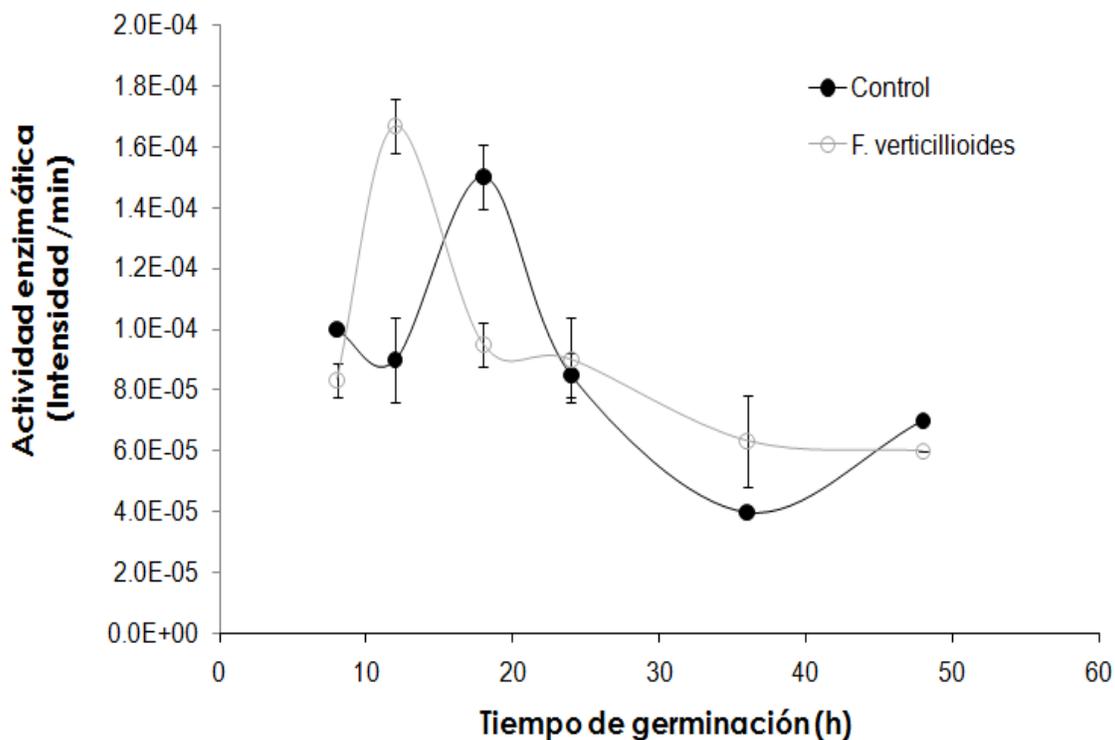
Cada una de las pendientes obtenidas se graficaron con respecto al tiempo de germinación (Figura 53), con el fin de obtener la actividad de la Malato sintasa a lo largo de la germinación de los embriones junto con el hongo. Observamos nuevamente que hay un pico máximo de actividad pero a diferencia de los embriones en ausencia de patógeno es a las 12 h de germinación. Nuevamente posterior a este tiempo la actividad de esta enzima disminuye notablemente hasta las 48 h de germinación que fue el tiempo máximo en el que se incubaron los embriones.



**Figura 53.** Actividad de la Malato sintasa en embriones de maíz germinados en presencia del hongo *Fusarium verticillioides*.

De igual modo, se hizo una comparación entre la actividad obtenida en la primera parte experimental usando embriones no infectados y la actividad obtenida usando embriones infectados. Los embriones sanos presentan el máximo de actividad de la Malato sintasa a las 18 h de germinación mientras que, en los embriones infectados con el hongo, este máximo en la actividad se observó a las 12 h, representando un incremento del 85% con respecto al control no inculado.

Además, haciendo una comparación de los máximos obtenidos para cada lote, se obtuvo un incremento del 11% en el máximo de actividad en presencia del hongo con respecto al máximo de actividad en el control (Figura 54).



**Figura 54.** Comparación de la actividad de la MS en embriones de maíz durante la germinación. Se presentan los controles (●) y los infectados con *F. verticillioides* (○).

---

## DISCUSIÓN

### ***Movilización de sacarosa en los embriones de maíz***

En un trabajo previo en el laboratorio encontramos que el contenido de sacarosa en el eje embrionario se reduce conforme avanza la germinación, 60% a las 8 h y llega a las 36 h a un contenido del 5% respecto al inicial. Sin embargo, cuando el eje embrionario está recubierto del escutelo -embrión- después de las 24 horas de la germinación la sacarosa no continúa disminuyendo si no que se incrementa, alcanzando el 36 % del que presentaba al tiempo cero (Martínez-Marcelo, 2008). Con la finalidad de examinar en qué tejido se producía el aumento de la sacarosa, realizamos en este estudio la detección *in situ* de la sacarosa, en lugar de la determinación de glucosa por la maceración del embrión o eje embrionario. Confirmamos que después de que el contenido de sacarosa baja en las primeras horas de la germinación, la sacarosa de los escutelos aumenta a partir de las 18 h, para representar el 50% de sacarosa respecto al tiempo cero y se mantienen los niveles hasta las 48 h de germinación.

Resultados similares se encontraron en los cotiledones de las semillas de *Phaseolus vulgaris*, el contenido de sacarosa disminuyó a partir de las 6 h de la germinación, y a tiempos posteriores el carbohidrato se incrementó (Collins y Wilson, 1972; Moneri *et al.*, 1986). El incremento en sacarosa fue mayor cuando el eje fue removido del cotiledón del frijol (Monerri *et al.*, 1986), lo anterior sugiere que la sacarosa se sintetiza para ser transportada al eje embrionario y cuando éste se remueve se acumula en el tejido.

Aunque no en todas las semillas se ha detectado aumento de sacarosa en los cotiledones conforme progresa la germinación, encontrándose una continua disminución en la germinación de semillas de soya (Kuo *et al.*, 1990) y *Arabidopsis thaliana* (Pritchard *et al.*, 2002), o un aumento constante en los cotiledones

durante la germinación de semillas de *Araucaria araucana* (Cardemil y Varner, 1984).

***Movilización de lípidos durante la germinación de ejes embrionarios y escutelos de maíz.***

El aumento en el contenido de sacarosa se atribuye a la utilización del carbono presente en los lípidos. Los lípidos pueden ser conducidos hacia varias vías metabólicas como son: la  $\beta$ -oxidación para la producción de acetyl-CoA y poder reductor (FADH<sub>2</sub> y NADH), el recambio de los lípidos membranales y la producción de glicerol para la formación de nuevos compuestos que entran a la gluconeogénesis (Voet & Voet, 1995).

Determinamos que en los escutelos la cantidad de lípidos totales constituye el 40% del peso del tejido, mientras que en el eje embrionario es 30% menos. Sorprendentemente, encontramos que a pesar de comenzar en contenidos de lípidos distintos la movilización de estos es muy similar. Por esto buscamos diferencias en su movilización determinando el contenido de triacilgliceroles durante la germinación de ejes y escutelos. Nuevamente comenzaron en contenidos de TGA distintos 0.414 mg/g escutelos y 0.347 mg/g ejes, sin embargo las velocidades de uso fueron similares.

Las diferencias en el contenido de lípidos totales y su variación con el tiempo entre los escutelos y los ejes embrionarios, pueden explicarse por la suma de dos eventos esenciales y que son cuantitativamente diferentes en cada tejido: el eje embrionario sigue creciendo, aumentando su superficie membranal y formando nuevos organelos, preparándose para la duplicación celular y continuar con su crecimiento, por lo que los lípidos están experimentando el recambio hacia nuevos lípidos membranales, mientras que los escutelos no continuarán su crecimiento y por tanto la síntesis de nuevos lípidos membranales es menor que en los ejes embrionarios. La segunda es que los escutelos usarán esos lípidos principalmente

para la síntesis de sacarosa y su exportación hacia el eje embrionario en crecimiento, una función clara de tejido fuente, mientras que los ejes embrionarios, comportándose como tejido demanda, serían incapaces de sintetizar sacarosa y sólo usarían ese carbono.

Está ampliamente documentado que la conversión de los TGAs hacia azúcares comienza en la segunda fase de la germinación, con la vía gluconeogénica encendida, y la conversión de sacarosa a expensas de la función completa de los glioxisomas (Bewley y Black, 1994; Canvin y Beevers, 1961; Eastmod y Graham, 2001; Graham, 2008). Lo anterior se demostró inicialmente en experimentos en los que a endospermos de ricino se les incubó con [ $^{14}$ -C]-acetato, encontrándose que la distribución del carbono radiactivo se encontraba tanto en succinato, malato, glucosa y sacarosa. Aceptándose desde entonces que a partir del acetyl-CoA y pasando por el ciclo del glioxilato y la gluconeogénesis se producía sacarosa (Canvin y Beevers, 1961).

Por lo que determinamos si la actividad del ciclo del glioxilato se encontraba funcional en los escutelos de maíz y no en los ejes y que explicará la velocidad similar de degradación de lípidos entre ejes y escutelos.

### ***Actividad del ciclo del glioxilato***

Longo y Longo (1970) en escutelos de maíz demostraron que a las 24 h existe una fracción de organelos que presenta características similares a los peroxisomas y glioxisomas de ricinos y cacahuete, y que éstos continúan en formación obteniéndose su máximo a los 4 días de germinación. En este estudio determinamos la actividad de la Malato sintasa, enzima clave del ciclo del glioxilato en los embriones germinados por diferentes tiempos, y a diferencia del estudio de Longo y Longo (1970) no germinamos la semilla completa y luego extrajimos el escutelo, sino que en el embrión completo se detectó la actividad de la enzima.

Encontramos, a diferencia de Longo y Longo (1970), que la actividad de la enzima muestra su máximo en los escutelos a las 18 h de germinación y que después de este tiempo la actividad disminuye 1.7 veces a las 24 h, después continúa disminuyendo la actividad pero se mantiene entre las 36 y 48 h en 2.1 veces menos que en el máximo de su actividad. A pesar de que el resultado no es similar al del Longo-Longo (1970) en el sentido de que el máximo de actividad aparece 3 días antes en este trabajo y que no se mantiene por más tiempo, el resultado sugiere que existen en el endospermo una o algunas moléculas que inhiben la actividad o la transcripción de la enzima y que al separar a los embriones del endospermo no entran en contacto y por tanto la actividad se expresa antes. Una de las moléculas que se sabe reprime la actividad de la Isocitrato liasa (ICL) y que no se ha documentado para la Malato sintasa es el ácido abscísico, ya que mutantes que no presentan sensibilidad al ABA o que tienen disminuida su síntesis presentan una actividad mayor de la ICL (Graham, 2008). Adicionalmente, la presencia de glucosa en el medio se ha sugerido que disminuye la actividad de degradación de lípidos y la actividad del ciclo del glioxilato (Graham, 2008). Por lo que, es posible que ambas moléculas tanto el ABA como la glucosa se encuentren en mayor proporción en el endospermo y que al removerlo obtengamos la actividad enzimática en tiempos cortos de la germinación.

Otras enzimas dentro de la vía de síntesis de sacarosa han sido estudiadas previo a la salida de la radícula, como la aconitasa, la catalasa y la fosfoenolpiruvato carboxicinasas en *Arabidopsis* (Ryllot *et al.*, 2000; Gallardo *et al.*, 2002). La regulación propuesta para la aparición de la actividad es a través de la modulación de la transcripción. Recientemente se ha encontrado la secuencia TAACAAA que es homóloga a la secuencia GARE, y que une factores de transcripción en respuesta a GA. La secuencia está presente en la posición -1403 y -233 de los genes que codifican para la Isocitrato liasa y la Fosfogliceromutasa, respectivamente (Gallardo *et al.*, 2002). Lo anterior confirma la hipótesis de que ambos genes son directamente controlados por el ácido giberélico (GA) y no

descartamos que en maíz el ciclo del glioxilato, a través de la Malato sintasa, esté controlado por GA durante la germinación.

A pesar de que la vía del ciclo del glioxilato se encuentra regulada por ABA, azúcares y los niveles de GA, se ha demostrado que el ciclo no es vital para que la germinación ocurra, sin embargo sí es importante para que la planta se establezca y sobreviva (Eastmond *et al.*, 2000).

Respecto a la actividad del ciclo del glioxilato y el contenido de sacarosa en los embriones, encontramos que a las 18 h coinciden tanto el máximo de actividad de la enzima como el incremento en el contenido de sacarosa en los escutelos. Estos resultados sugieren que el ciclo del glioxilato es funcional y lleva a la síntesis de sacarosa en los escutelos. Cabe mencionar que no encontramos actividad de la Malato sintasa en los ejes embrionarios, por lo que la degradación de lípidos que observamos en ese tejido probablemente se movilice hacia la síntesis de nuevos componentes membranales, posibilidad que no estudiamos en este trabajo, pero que en las semillas de *Opuntia tomentosa* observamos como una cantidad incrementada y variada de fosfolípidos entre las semillas secas y después de diferentes tiempos de germinación (Ramírez-Sóstenes, 2008).

### ***Efecto de patógenos en el metabolismo de carbono***

Se conoce que la  $\beta$ -oxidación tiene un papel crítico, principalmente en el desarrollo post-germinativo, ya que el acetil-CoA producido se metaboliza a través del ciclo del glioxilato desde el inicio de la fase II hasta que los cotiledones se vuelven verdes y presentan su capacidad fotosintética (Eastmond *et al.*, 2002).

Recientemente se ha sugerido que la degradación de lípidos es importante en la respuesta a estrés, ya que algunas de las moléculas implicadas en la señalización por estrés como el ácido jasmónico, son sintetizadas a partir de lípidos.

La vía de síntesis del ácido jasmónico es compleja y en ella participan varios compartimentos subcelulares. El ácido linolénico se libera de las membranas y después de subsecuentes reacciones redox en los cloroplastos se convierte en ácido 12-oxo-10,15(Z)-octadecatrienoico. Posteriormente por un mecanismo aún desconocido, es transportado hacia los peroxisomas donde es reducido a través de tres pasos de la  $\beta$ -oxidación para dar jasmonato (Schaller 2001).

Cruz-Castillo y colaboradores (2004) demostraron que al ocasionar un daño mecánico en hojas de *Arabidopsis* existe una inducción en algunas de las enzimas que participan en la  $\beta$ -oxidación como son la acil-coenzima A oxidasa (ACX) y 3-cetoacil-CoA tiolasa (KAT), estrés que supone un incremento en el ácido jasmónico. Un estrés diferente se cree que es debido a la activación de otras isoformas de las mismas enzimas, lo cual confirmaron en el estudio de Cruz-Castillo (2004) al adicionar ABA a las hojas.

Por lo anterior, en este trabajo buscamos el efecto que la presencia de un patógeno producía en la actividad del ciclo del glioxilato, evaluando específicamente la actividad de la Malato sintasa. Encontramos que en los embriones infectados alcanza su máximo 6 horas antes que en los embriones control. Esto se refleja también en la acumulación de sacarosa en el tejido escutelar, 6 h. A pesar del adelanto en la actividad de la MS y en la concentración de sacarosa, el embrión a las 24 h es invadido por el hongo y necrosado. Es posible que la presencia del patógeno promueva la síntesis de más carbohidrato para defenderse del ataque, sin embargo, el patógeno toma estas reservas para su crecimiento.

Guzmán-Chávez (2010) encontró que la exposición de los embriones al patógeno *Fusarium verticillioides*, promueve la transcripción de los genes para el transportador de sacarosa y para uno putativo de hexosas muy al inicio de la invasión. Lo que hace suponer que el metabolismo de carbono está siendo afectado de manera general. Sin embargo, la coincidencia en tiempos de

acumulación de sacarosa, de la elevación en los transcritos de ambos transportadores de carbohidratos y la actividad de la Malato sintasa, también nos permite especular que hay una intersección entre las vías que encienden la transcripción de estos genes y que sugerimos podría ser el ácido abscísico.

Lo anterior lo consideramos ya que en la adición exógena de ABA en embriones, conduce a una reducción en la transcripción de los genes para el transportador de sacarosa, un cambio en el contenido de carbohidratos en el embrión, así como a una reducción en el balance GA/ABA (Aguilera-Alvarado, 2010).

Por lo anterior, se hace necesario explorar si bajo diferentes concentraciones de ABA, giberélico o bien del patógeno se modifican las concentraciones de las hormonas y si hay un efecto en la transcripción del gen para la Malato sintasa, lo cual nos daría mayor información sobre la regulación de la enzima, del ciclo del glioxilato y de cómo el estrés puede modificar el metabolismo germinativo.

## CONCLUSIONES

- La degradación entre lípidos totales y TGAs durante la germinación, es similar tanto en ejes embrionarios como en escutelos, sin embargo, los destinos son distintos.
- En los escutelos, la degradación de TGAs se lleva hacia sacarosa, ya que:
  - ✓ Encontramos un máximo en la síntesis de sacarosa a las 18 h de germinación.
  - ✓ Son los que presentaron actividad de la enzima Malato sintasa.
  - ✓ Se obtuvo un pico máximo de actividad a las 18 h de germinación para posteriormente disminuir cuando la radícula sale.
- La presencia de *Fusarium verticillioides* en los embriones ocasiona un aumento y un adelanto en la actividad de la Malato sintasa, la actividad se presenta 6 horas antes que en los embriones sin inocular.
- También el incremento en el contenido de sacarosa se adelanta 6 horas en presencia del patógeno.
- Probablemente el embrión está adelantando la movilización de sus reservas de carbono como una forma de defensa al ataque de *Fusarium*.
- Este trabajo también aporta evidencia de que tanto ABA, carbohidratos y lípidos están conectados a través de una misma vía de señalización.

## PERSPECTIVAS

- I. Evaluar el efecto de ABA, GA, ácido salicílico y ácido jasmónico en la activación del ciclo del glioxilato para determinar el papel del estrés en la activación del metabolismo del carbono.

---

**REFERENCIAS**

- Aguilera-Alvarado GP. 2010. Regulación hormonal y osmótica de la expresión del transportador de sacarosa y un transportador de hexosas putativo en embriones germinados de maíz. Tesis de licenciatura. Facultad de Química, UNAM.
- Bacon CW; Yates IE; Hinton DM; Meredith F. 2001. Biological Control of *Fusarium moniliforme* in Maize. Environmental Health Perspectives. Vol 109.
- Baud S; Graham A. 2006. A spatiotemporal analysis of enzymatic activities associated with carbon metabolism in wild-type and mutant embryos of *Arabidopsis* using in situ histochemistry. The plant journal 46, 155-169.
- Beeckmans S; 2001. Glyoxylate Cycle. Encyclopedia of life sciences. 1-12.
- Bewley DJ. 2001. Seed germination and reserve mobilization. Encyclopedia of life sciences. 1-3.
- Bewley DJ. 1997. Seed germination and dormancy. Plant cell 9. 1055-10667.
- Bewley DJ; Black M.1994. Seeds: Physiology of development and germination. 2<sup>nd</sup> edition. Plenum Press. NY.
- Bluhm BH; Kim H, Butchko AE; Woloshuk CP. 2008. Involvement of ZFR1 of *Fusarium verticillioides* in kernel colonization and the regulation of FST1, a putative sugar transporter gene required for fumonisin biosynthesis on maize kernels. Molecular Plant Pathology. 203–211
- Buckeridge MS; Pessoa SH; Tiné SM. 2000. Mobilization of storage cell wall polysaccharides in seeds. Plant Physiology and Biochemistry. 141-156.

- 
- Bush BJ. 2001. *Fusarium verticillioides* Infection, Fumonisin Contamination and Resistance Evaluation in North Carolina Maize. Tesis de doctorado.
- Canvin DT; Beevers H. 1961. Sucrose synthesis from acetate in the germinating castor bean: Kinetics and pathway. *Plant Physiol.* 34: 403-409
- Cardemil L, Varner JE. 1984. Starch degradation metabolism towards sucrose synthesis in germinating *Araucaria araucana* seeds. *Plant Physiol.* 1047-1054.
- Cioni, M; Pinzaut G; Vanni P. 1980. Comparative biochemistry of the glyoxylate cycle. Istituto di Chimica biologica, Università di Firenze, Firenze, Italia.
- Collins DM, Wilson AT. 1972. Metabolism of the axis and cotyledons of *Phaseolus vulgaris* seeds during early germination. *Phytochem.* 11, 1931-1935
- Cruz Castillo M, Martínez C, Buchala A, Métraux JP, León J. 2004. Gene-specific involvement of  $\beta$ -oxidation in wound-activated responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 135, 85–94.
- Desjardins AE; Hohn TM. 1996. Mycotoxins in Plant Pathogenesis. *Molecular Plant-Microbe Interactions.* 147-152.
- Desjardins AE; Munkvold GP. 1997. Fumonisin in Maize. Can we reduce their occurrence? *Plant Disease.* 556-565.
- Duncan KE; Howard RJ. 2009. Biology of Maize Kernel Infection by *Fusarium verticillioides*. *Molecular Plant-Microbe Interactions.* 6-16.

- Eastmond PJ, Germain V, Lange PR, Bryce JH, Smith SM, Graham IA. 2000. Postgerminative growth and lipid catabolism in oilseeds lacking the glyoxylate cycle. *Plant Biology*. 5669-5674.
- Eastmond PJ; Graham IA. 2001. Re-examining the role of the glyoxylate cycle in oilseeds. *Trends in Plant Science*. 6: 72-78.
- Gallardo K, Job C, Groot SPC, Puype M, Demol H, Vandekerckhove J, Job D. 2002. Proteomics of *Arabidopsis* seed germination. A comparative study of wild-type and gibberellin-deficient seeds. *Plant Physiol*. 129, 823-837.
- Glenn AE. 2007. Mycotoxigenic *Fusarium* species in animal feed. *Animal Feed Science and Technology*.137: 213–240
- Glenn AE; Hinton DM; Yates IE; Bacon CW. 2001. Detoxification of Corn Antimicrobial Compounds as the Basis for Isolating *Fusarium verticillioides* and Some Other *Fusarium* Species from Corn. *Applied and Environmental Microbiology*. 2973-2981
- Glenn AE; Richardson EA; Bacon CW. 2004. Genetic and morphological characterization of a *Fusarium verticillioides* conidiation mutant. *Mycologia* 96. 968-980.
- Graham IA. 2008. Seed Storage Oil Mobilization. *Annual Review of Plant Biology*. 59, 115-142.
- Granjo CA; Alves dos Reis T. 2007. Morphogenesis and growth kinetics of *Fusarium verticillioides*. *Mycopathologia*. 164:119–126

- Guzmán-Chávez F. 2010. Efecto de *Fusarium verticillioides* sobre la expresión de los transportadores de carbohidratos en la germinación de embriones de maíz. Tesis de licenciatura. Facultad de Química, UNAM.
- Hawker JS; 1970. Enzymes concerned with sucrose synthesis and transformations in seeds of maize, broad bean and castor bean. *Phytochemistry*. 2313-2322.
- Hill LM; Morley-Smith ER; Rawsthorne S. 2003. Metabolism of Sugars in the Endosperm of Developing Seeds of Oilseed Rape<sup>1</sup>. *Plant Physiology*. 228-236
- Hussein S; Brasel JM. 2001. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology*.101-134
- Karunagaran D; Ramakrishna RP. 1990. Mode and control of starch mobilization during germination of seeds of horse gram. *Plant Science*. 155-159
- King MW. 2002. Glycogen, Starch and Sucrose Synthesis. *Encyclopedia of life sciences*. 1-8.
- Kisselbach TA. *The structure and reproduction of corn*. 50th Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Kuo TM, Doehlert DC, Crawford CG. 1990. Sugar metabolism in germinating soybean seeds. Evidence for the sorbitol pathway in soybean axes. *Plant Physiology* 93, 1514-1520.
- Leszek P; Vincent D. 2002. *Zea mays (Maize, Corn)*. *Encyclopedia of life sciences*. 1-7.

- Longo P y Longo GP. 1970. The development of glyoxysomes in peanut cotyledons and maize scutella. *Plant Physiol.* 45, 249-254.
- Martínez-Marcelo V. 2008. Expresión de la actividad de las invertasas ácidas en la germinación de tejido embrionario en carbohidratos metabolizables y su relación con el contenido de carbohidratos. Tesis de licenciatura. Facultad de Química, UNAM.
- Monerri C, García LA, Guardiola JL. 1986. Sugar and starch changes in pea cotyledons during germination. *Physiology Plantarum* 67, 49-54.
- Morales-Flores F. 2010. Fraccionamiento biodirigido de la planta *Cecropia obtusifolia*. Bertol, para la obtención de metabolitos secundarios con posible actividad herbicida. Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas. Facultad de Química, UNAM.
- Nelson PE; Desjardins AE; Plattner RD. 1993. Fumonisin, mycotoxins produced by *Fusarium* species: Biology, chemistry and significance. *Phytopathol.* 31:233-252.
- Nelson PE; Dignani C; Anaissie EJ. 1994. Taxonomy, Biology, and Clinical Aspects of *Fusarium* Species. *Plant Pathology.* 7: 479-504.
- Norhasima W; Abdulmir AS; Bakar A; Son R; Norhafniza A. 2009. The Health and Toxic Adverse Effects of *Fusarium* Fungal Mycotoxin, Fumonisin, on Human Population. *American Journal of Infectious Diseases.* 283-291.
- Oren L; Ezrati S; Cohen D; Sharon A. 2002. Early Events in the *Fusarium verticillioides*-Maize Interaction Characterized by Using a Green Fluorescent Protein-Expressing Transgenic Isolate. *Applied and Environmental Microbiology.* 1695-1701.

- Pereira P; Nesci A; Castillo C; Etcheverry M. 2010. Impact of bacterial biological control agents on fumonisin B1 content and *Fusarium verticillioides* infection of field-grown maize. *Biological Control*. 53: 258–266
- Pritchard SL, Charlton WL, Baker A, Graham IA. 2002. Germination and storage reserve mobilization are regulated independently in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 31, 639-647.
- Quettier AL; Eastmond PJ. Storage oil hydrolysis during early seedling growth. *Plant Physiology and Biochemistry*. 485-490
- Ramírez-Sóstenes JL. 2008. Alteraciones en el metabolismo de carbono durante priming natural de semillas de *Opuntia tomentosa*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM.
- Rylott EL, Hooks MA, Graham IA. 2001. Co-ordinate regulation of genes involved in storage lipid mobilization in *Arabidopsis thaliana*. *Biochemical Society Transactions* 29, 283-287.
- Sánchez Rangel D, SanJuan Badillo A, Plasencia J. 2005. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 8565-8571.
- Schaller F. 2001. Enzymes of the biosynthesis of octadecanoid-derived signalling molecules. *Journal of Experimental Botany* 52, 11-23.
- Srivastava LM. 2002. Seed Germination, Mobilization of Food Reserves, and Seed Dormancy. *Plant Growth and Development*. 447-471.
- To JPC, Reiter WD, Gibson SI. 2002. Mobilization of seed storage lipid by *Arabidopsis* seedlings is retarded in the presence of exogenous sugars. *Plant Biology*. 2-4.

- Voet D; Voet JG. Biochemistry. 2<sup>nd</sup> edition. John Wiley & Sons. 1995.
- Weber H; Borisjuk L; Wobus U. 1997. Sugar import and metabolism during seed development. Trends in Plant Science. 1360-1385.
- Wind J; Smeekens S; Hanson J. 2010. Sucrose: Metabolite and signaling molecule. Molecular Plant Physiology. 71: 1610–1614
- Wu F. 2007. Measuring the economic impacts of *Fusarium* toxins in animal feeds. Animal Feed Science and Technology. 137:363–374

### REFERENCIAS ELECTRÓNICAS

- [www.fao.org/docrep/t0395s/t0395s02.htm](http://www.fao.org/docrep/t0395s/t0395s02.htm) El maíz en la nutrición humana (Colección FAO: Alimentación y nutrición, N°25) ISBN 92-5-303013-5.
- [http://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search\\_topic=TSN&search\\_value=42269](http://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=42269) ITIS Report. Información obtenida el 12 de Septiembre de 2010.
- <http://www.geochembio.com/biology/organisms/maize/#kernel> *Zea mays*, corn, maize, mealie. 2008.
- [http://itzamna.bnct.ipn.mx:8080/dspace/bitstream/123456789/1079/1/379\\_2004\\_CICATA-ALTAMIRA\\_DOCTORADO\\_laria\\_menchaca\\_julio.pdf](http://itzamna.bnct.ipn.mx:8080/dspace/bitstream/123456789/1079/1/379_2004_CICATA-ALTAMIRA_DOCTORADO_laria_menchaca_julio.pdf) Información obtenida el 17 de Septiembre de 2010.
- <http://www.veterinaria.org/revistas/recvet/n01a0407.html> Leucoencefalomalacia equina en dos ponis por consumo de maíz contaminado. RECVET. Vol. II, N° 01-04, Enero 2007.

## APÉNDICE

***Determinación de TGAs en extractos lipídicos de escutelos y ejes embrionarios de maíz a diferentes tiempos de germinación.***

Se extrajeron los lípidos mediante cloroformo:metanol y se aplicaron en placas de TLC, se corrieron utilizando la fase móvil compuesta por hexano: éter etílico: ácido acético (70:30:1, v/v). La muestra aplicada fue diluida 1:20 tanto para los escutelos como para los ejes embrionarios. Se realizó este experimento por triplicado y a continuación se muestran las tres placas obtenidas.

