



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

"CAMBIOS EN EL PATRÓN DE EXPRESIÓN DE LOS TRANSPORTADORES DE SACAROSA Y HEXOSAS POR LA PRESENCIA DE *Fusarium verticillioides* DURANTE LA GERMINACIÓN DE EMBRIONES DE MAÍZ. DETECCIÓN DE LAS PROTEÍNAS POR ANTICUERPOS"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A :

VIRIDIANA CALZADA ALEJO



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:	Dra. Sobeida Sánchez Nieto
VOCAL:	Dr. José Pedraza Chaverri
SECRETARIO:	M. en C. Luis Tonatihut Sánchez Linares
1ER. SUPLENTE	Dra. Nora Andrea Gutiérrez Nájera
2DO. SUPLENTE:	Dra. Vanessa Rebeca Maya Ampudia

El presente trabajo se realizó en el laboratorio 114 del Departamento de Bioquímica, Edificio E, Facultad de Química, UNAM.

Dra. Sobeida Sánchez Nieto
Asesor

Viridiana Calzada Alejo
Sustentante



La vida no te está esperando en ninguna parte, te está sucediendo.

No se encuentra en el futuro como una meta que has de alcanzar, está aquí y ahora, en este mismo momento, en tu respirar, en la circulación de tu sangre, en el latir de tu corazón.

Cualquier cosa que seas, es tu vida y si te pones a buscar significados en otra parte, te la perderás.

Rajneesh Chandra Mohan (OSHO)



AGRADECIMIENTOS

Se agradecen los apoyos recibidos para la realización de este proyecto a:

- PAPIIT IN203708, DGAPA, UNAM
- PAIP 6290-12, Facultad de Química, UNAM.

Se agradece también a las siguientes personas por su apoyo:

Al Dr. Javier Plasencia por proporcionarnos la cepa del hongo *Fusarium verticillioides* para el desarrollo del presente proyecto.

A la QFB María Consuelo Enríquez Arredondo por su apoyo y supervisión en el manejo del conductímetro y la ultracentrífuga de mesa.

Se agradece a los sinodales por sus valiosos comentarios y aportaciones

- M. en C. Luis Tonatihu Sánchez Linares
 - Dr. José Pedraza Chaverri.
-



DEDICATORIAS

Este trabajo está dedicado a todas aquellas personitas especiales que me transmitieron el coraje de no dejarme vencer y poder lograr una de mis metas.

A mis padres por su amor, comprensión y apoyo incondicional a lo largo de mi vida, por todo su esfuerzo y sacrificio para que día a día lograra cada una de mis metas y ser lo que soy hoy, sé que sin ustedes muchos de los logros obtenidos no hubieran sido posibles. Hoy puedo decir que lo logré y eso fue gracias a la confianza que ciegamente siempre han puesto en mi y al cariño que siempre me han dado. No me resta más que decirles GRACIAS por haberme heredado un gran tesoro en la vida, saben que los quiero y que cada uno de los logros que tenga siempre serán suyos.

A mi querida hermana Fernanda, que te puedo decir a ti pequeña, si siempre me has dado tu amor y alegría, que a pesar de tu pequeñes siempre me has ayudado a tu manera, que me entendiste y animaste más de una vez, que me has alegrado la vida con tus ocurrencias y con esa chispa que te caracteriza, pero sobre todo por estar a mi lado siempre a pesar de que luego nos enojamos pero creo que es normal en todos los hermanos jajaja, por ser mi cómplice y porque sé que siempre estaremos juntas a pesar de lo que pueda suceder. Te quiero mucho y sabes que este logro también es tuyo por mil razones.

A mi mamá abuelita Celia, sé que hoy ya no estás a mi lado para ver lo que he logrado y que para ti también era uno de tus sueños, pero de lo que si estoy segura es que desde aquel lugar donde te encuentres te sentirás feliz de que al fin me he convertido en una profesionista, de saber que el esfuerzo, tus regaños como toda una abuelita regaña a sus nietos han valido la pena. Gracias por tu tiempo y dedicación, jamás olvidaré cuando ibas a dejarme al kínder o que ibas conmigo a las actividades deportivas, por preocuparte porque todo estuviera listo para que me fuera a la primaria, en fin, podría escribir tantas cosas que pasamos



juntas y de las cuales siempre estaré muy agradecida contigo. Hoy sé que eres una estrella en el cielo que cuida de mi y que jamás olvidaré. Gracias abue, por siempre te llevaré en mi corazón.

A mis ti@s Gloria, Reyna, Luisa, Pepé, Toño, Matín, por sus consejos, cariño, cuidados y apoyo durante mi vida y porque no por todos aquellos buenos momentos que pasamos juntos en las reuniones familiares. En especial a mi tía Amelia porque sin ella muchos de los aprendizajes obtenidos como el obligarme a que me aprendiera las vocales para aprender a leer jajaja, no hubieran sido posibles, y tu hija postiza (como dice mi papá) hoy te dice mil gracias por tu tiempo y dedicación, este es también tu logro.

A mis primos Migue , Martín, Toño, Lalo, Luis, Ángel, Joel, Gabriel, Rosa Isela, Alejandra, Araceli y Malena, porque con ustedes he compartido muchas alegrías, tristezas, risas, travesuras, charlas, discusiones por no estar de acuerdo con algo como buenos primos, salidas, complicidad en muchas cosas, ocurrencias y creo que aún nos faltan muchas cosas por vivir. Y claro también me han dado consejos o me han regañado, no diré quién para no echarla de cabeza jajaja pero ella sabe que es una gran prima y que cuenta conmigo siempre.

A la doctora Sobeida, por el apoyo brindado a lo largo de mi estancia en el laboratorio, por sus consejos, por las charlas en los tiempos semi libres, por compartir cada uno de sus conocimientos conmigo, por el agradable ambiente que genera en el laboratorio y porque no me queda la menor duda de que aparte de ser una excelente doctora es una gran persona. Mil gracias por todo.

A la doctora Perla por los consejos, por su ayuda durante mi estancia en la carrera pero sobre todo por ser un gran ser humano. De verdad muchas gracias doctora por hacer muy grata mi estancia en la facultad.

A Lupita quien me salvo la vida en muchas ocasiones y por siempre apoyarme y tener una sonrisa al llegar a su cubículo.



A mis amigos y compañeros del laboratorio 114: Fer Guzmán quien iba a decir que nos volveríamos a encontrar en ese laboratorio después de ir juntos en algunas materias de los primeros semestres, gracias por compartir tus habilidades y conocimientos conmigo. A Viri Zu un gran personita, pero sobre todo una gran amiga, gracias tocayis por aquellas comidas y platicas en lo que esperábamos a que nuestros experimentos salieran jajaja y por las porras a lo largo de este camino, tqm. A Pau por los consejos y ánimos cuando los experimentos se rehusaban a salir, y por compartir su sabiduría conmigo jijiji. A mi tocashí Viri Luna por las risas en el laboratorio y su apoyo, a Juan Manuel, Adriana, Silvia, Mariel y Sam por hacer agradable mi estancia en el laboratorio. Y también a Carlos el hijo adoptivo del laboratorio jajaja, que siempre con su sinceridad a flote nos hacia reir bastante y por cuidar de nosotras cuando salíamos tarde del laboratorio.

A mis amigos del CCH-Azcapotzalco: Lety, Magali, Pau, Andrea, Diana, Felipe y César, con ustedes he vivido grandes experiencias y con ustedes empecé a obtener grandes logros, gracias por su amistad, compañerismo, buenas charlas y consejos a lo largo de todo este tiempo; cada uno de ustedes al ser tan diferentes me han enseñado muchas cosas y que no hay imposibles en esta vida, que podemos lograrlo siempre y cuando nos lo propongamos. Gracias por la confianza de incluirme en algunos de sus proyectos aunque vivamos en diferentes facultades, pero sé que lo lograremos y que el conocimiento y disposición de cada uno ayudará.

A uno de mis mejores amigos de la carrera Fernando Navarro, gracias por haber compartido tantas experiencias durante los 5 años en los que la Facultad se convirtió en nuestro hogar, por las risas, las lágrimas, los abrazos, los consejos, los regaños, las aventuras, la complicidad y demás, se que podríamos escribir un libro de cada una de las cosas que pasamos juntos en la facultad, pero hoy sólo te digo gracias por tu tiempo compartido conmigo y porque me dejaste un gran amigo Alejandro Jiménez para el cual también tiene una dedicatoria especial, porque a pesar de la distancia y del poco tiempo que a veces tenemos, el siempre ha tenido un consejo y una sonrisa para mí . Aquí también le doy las gracias a tus papis: el



señor Juan y la señora Guille, así como a tu hermana Rebe, por la confianza, el cariño que me han brindado y sobre todo por su amistad.

A mi mejor amiga de la carrera:

Liliana, quien iba a decirlo desde tercer semestre nos conocimos y empezamos como compañeras de clase hasta que formamos una linda amistad, gracias amiga por las risas y pláticas a escondidas en las clases jejeje, por escucharme, por tus consejos y por darme ánimos cuando lo necesité. Tq amiwita.

A mis amigas QA's:

Pau, Sony, Eri, May y Kary, quien iba a decirlo yo QFB y ustedes QA, irónica la vida no creen?, pero bueno me siento muy contenta de conocerlas y de compartir mil cosas con ustedes, desde cosas tristes hasta cosas muy alegres, saben que las precio mucho y que siempre tendrán una amiga en mí.

Kary mi honguito querido que te puedo decir a ti, gracias porque a pesar del poco tiempo de conocernos creo que hemos formado una linda amistad y que nos hemos complementado en muchas cosas, por tus consejos, por tus regañones, por las saliditas, por las charlas nocturnas en el messenger, por los zapes, en fin muchas cosas, sabes que te tengo un aprecio muy especial, te quiero mi sonorita.

Aaah y en esta parte debo incluir a un gran amigo Héctor Miguel Casillas que aunque estuviera del otro lado del mundo siempre me dio un consejo y tuvo palabras de aliento para mí cuando fue necesario, ha claro y como se empezó a juntar mucho con Kari, también de repente me daba zapes jajaja, sabes que valoró mucho tu amistad y sé que eres una amigo muy valioso.

A mis amig@s de las secciones:

Jesús gracias por haberme hecho parte de la SEQFB en su fundación, Selma siempre tan alegre y sonriente, Lau, Hugo, Roberto, Kikin eres un gran amigo, Hermann no bueno como dices tu eres una gran persona y gran amigo, Gibrán por ser un gran amigo y por la confianza brindada, además de que a pesar de que te



nos fuiste a Monterrey te sigues acordando de mi, Alejandro, Oscar, por las platicas, las risas dentro y fuera de los cubículos, por compartir pequeños y grandes proyectos para superarnos día a día, por sus conocimientos de los diversos temas jajaja, las reuniones y fiestas, en fin por todas las cosas que hemos pasado juntos.

A uno de los mejores amigos que me dejo mi sección la SE-QFB a Ángel Gabriel, que le puedo decir a este muchacho que me ha hecho reir en mil ocasiones desde que estábamos en el cubículo hasta ahora que ve la manera de seguirme jugando bromas y que pareciera que no aprendo y caigo redondita jejeje, gracias por todas las platicas, comidas, cafésines, pero sobre todo por toda la confianza que me has brindado. Gracias por ser un gran amigo.

My Gerard, creíste que me había olvidado de ti, pues no eso no podía pasar jejeje, quien iba a decirlo nos conocimos hace poquito más de un año y quien se iba a imaginar que serías mi incondicional como dice la gente por ahí, porque obvio ya me la creí jajaja, gracias por estar a mi lado, por compartir aventuras, consejos, proyectos, por tus valiosas palabras, por las grandes platicas, por las risas, por los maltratos psicológicos, a claro y como olvidar cuando yo estoy bien entretenida platicando contigo y tu durmiendo (es bromita jejeje), por los abrazos, en fin POR TODO, eres un gran niño conmigo y de eso no me queda la menor duda, por eso y mucho más me queda decirte que ocupas un lugarcito muy especial en mí, lo sabes, y estoy segura de que aún nos faltan muchas cosas por vivir juntos, te quiero mucho horrible.

A mis amigos del HH:

Vere por compartir tus experiencias de la vida y profesionales; Lore por molestarme durante las clases y por las platicas profundas que se nos han presentado y sobre todo por la confianza; y Miguel pues por hacerme reir con tus ocurrencias aunque digas que no eres mi payaso (seguro ya ni te acuerdas cuando me dijiste eso jejeje), por las charlas en el Messenger, en fin por ser una gran personita conmigo , por eso y más ustedes también tenían que aparecer aquí



pues desde hace un año han compartido conmigo grandes cosas, empezamos como simples compañeros y creo que ahora puedo decir que tenemos una amistad, gracias chicos por esas platicas mañaneras, por los ánimos cuando uno está cansado, por esas saliditas a desayunar, comer o a platicar jejeje, entre semana o cuando se nos ocurre. Les tengo un cariño y aprecio especial.

A mis amigos de la Facultad: Nardiux, Areli, Luz Bochm, Piby, Luz Chacón, Luis (Mi rey). Alfredo, el indeseable osea Isaac, Servando, Joel, Itzumi, Javier, Carina Mendoza, Diana Rivera, Sujhey, José, Lupita QA, no por ser los penúltimos son menos importantes, con ustedes también he vivido grandes experiencias a lo largo de este andar. Se les aprecia.

Y no puede faltar el agradecer y dedicar este trabajo a mi amada Facultad de Química y a mi querida Universidad Nacional Autónoma de México, porque a lo largo de estos años se convirtieron en una parte importante de mi vida en donde viví grandes experiencias...Además de que fueron los lugares en donde adquirí grandes y valiosos conocimientos que me han permitido crecer día a día y sobre todo conocí grandes profesores y amigos que han contribuido a mi desarrollo profesional y personal...Gracias!!!

Espero no haberme olvidado de nadie y si lo hice no fue mi intención, saben que todos han sido parte importante para que yo lograra esta meta, una vez más gracias a todos y terminó con la siguiente frase:

En el verdadero éxito, la suerte no tiene nada que ver; la suerte es para los improvisados y aprovechados; y el éxito es el resultado obligado de la constancia, de la responsabilidad, del esfuerzo, de la organización y del equilibrio entre la razón y el corazón!



ÍNDICE GENERAL

I.	ABREVIATURAS	1
II.	RESUMEN	2
III.	INTRODUCCIÓN	4
	1. MAÍZ	4
	1.1 Taxonomía del maíz	5
	1.2 Estructura y composición química de la semilla de maíz	5
	2. GERMINACIÓN	8
	2.1 Fases de la germinación	8
	2.2 Movilización de reservas metabólicas	10
	2.2.1 Movilización de carbohidratos	11
	2.2.2 Movilización de lípidos	12
	2.2.3 Movilización de proteínas	13
	3. FACTORES DE ESTRÉS QUE AFECTAN LA GERMINACIÓN	13
	4. FUSARIUM VERTICILLIOIDES	15
	4.1 Taxonomía de <i>Fusarium verticillioides</i>	16
	4.2 Patogenicidad de <i>Fusarium verticillioides</i> en plantas de maíz	17
	4.3 Producción de toxinas por <i>Fusarium verticillioides</i>	19
	5. TRANSPORTADORES DE CARBOHIDRATOS EN PLANTAS	22
	5.1 Transportador de sacarosa	23
	5.2 Tipos de transportadores de sacarosa	25
	5.3 Transportador de monosacáridos	27
	5.4 Regulación de los transportadores de carbohidratos	29
IV.	JUSTIFICACIÓN	30
V.	HIPÓTESIS	33
VI.	OBJETIVO GENERAL	34
VII.	OBJETIVOS PARTICULARES	35
VIII.	MATERIALES Y MÉTODOS	36



1. Estrategia experimental	36
2. Material biológico.....	37
2.1 Obtención de la suspensión concentrada de conidios.	37
2.2 Conteo de conidios y obtención de la dilución para infectar a los embriones.	37
2.3 Germinación de embriones	38
3. Métodos primera parte del trabajo	38
3.1 Medición del crecimiento radicular	38
3.2 Determinación de la ganancia de peso húmedo y peso seco.	38
3.3 Salida de electrólitos	39
4. Métodos segunda parte del trabajo	39
4.1 Obtención de la fracción microsomal de embriones de maíz control e infectados por el hongo	39
4.2 Determinación de proteínas por Bradford	40
4.3 Obtención del título de anticuerpos para detectar a los transportadores de sacarosa y hexosas en la membrana plasmática.	40
4.4 Técnica de Slot Blot	41
4.5 Técnica luminiscente.....	42
4.6 Técnica de Inmunoréplica tipo Western.....	43
4.7 Densitometría de bandas	44
IX. RESULTADOS	45
A. Evaluación del efecto del patógeno en el crecimiento radicular y en la integridad membranal de los embriones de maíz	45
A.1 Medición del crecimiento radicular	45
A. 2 Determinación de la ganancia de peso húmedo.....	47
A.3 Salida de electrólitos	50
B. Detección de los transportadores de carbohidratos	52
B.1 Transportador de hexosas.....	52
B.2 Transportador de sacarosa.....	57



X.	DISCUSIÓN	62
	A. Análisis del efecto del patógeno en el crecimiento y en la integridad membranal de los embriones de maíz.....	62
	B. Efecto de la infección con el hongo <i>Fusarium verticillioides</i> en los transportadores de sacarosa y hexosas de los embriones de maíz	63
XI.	CONCLUSIONES	71
XII.	PERSPECTIVAS	72
XIII.	ANEXO	73
	ANEXO I. Reactivos de Quimioluminiscencia	73
	ANEXO II. Electroforesis: condiciones y reactivos	73
	ANEXO III. Electrotransferencia: condiciones y reactivos	73
XIV.	REFERENCIAS	76



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Caricatura de una planta madura y fruto del maíz.....	4
Figura 2. Taxonomía del maíz.....	5
Figura 3. Estructura de la semilla de maíz	6
Figura 4. Curva de toma de agua por las semillas	9
Figura 5. Taxonomía de <i>Fusarium verticillioides</i>	16
Figura 6. Formas macroscópicas de <i>Fusarium verticillioides</i>	16
Figura 7. Ciclo de infección y enfermedad en el sistema <i>Fusarium verticillioides</i> -maíz	18
Figura 8. Sistema de transporte de sacarosa en plantas	24
Figura 9. Topología de los transportadores de los tres grupos de la familia SUT	27
Figura 10. Esquema general del trabajo experimental.	36
Figura 11. Titulación de los anticuerpos anti- transportadores de hexosas y anti-transportadores de sacarosa.....	42
Figura 12. Titulación de los anticuerpos anti-transportador de hexosas y sacarosa mediante la técnica de Western-Blot.....	44
Figura 13. Efecto del patógeno <i>Fusarium verticillioides</i> en el crecimiento radicular de los embriones de maíz.	46
Figura 14. Efecto de la infección de los embriones con <i>Fusarium verticillioides</i> en el crecimiento radicular.	47
Figura 15. Curvas temporales de acumulación del peso húmedo y seco en embriones control y en embriones infectados con <i>Fusarium verticillioides</i>	49
Figura 16. Curva temporal de salida de electrolitos de embriones control e infectados con el hongo <i>Fusarium verticillioides</i>	51
Figura 17. Detección del transportador de hexosas en fracciones microsomales de embriones de maíz germinados en presencia o ausencia del hongo <i>Fusarium verticillioides</i>	55



Figura 18. Efecto de *Fusarium verticillioides* en la cantidad de transportador de hexosas de los embriones de maíz 57

Figura 19. Detección del transportador de hexosas en fracciones microsomales de embriones de maíz germinados en presencia o ausencia del hongo *Fusarium verticillioides* 59

Figura 20. Efecto de *Fusarium verticillioides* en la cantidad de transportador de sacarosa de los embriones de maíz 61

Figura 21. Comparación del índice de los niveles de transcrito de ZmSUT1 y ZmHT de embriones infectados /control. 65

Figura 22. Comparación del índice de los niveles de los transportadores de sacarosa y hexosas patógeno/control 66

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición química de las diferentes partes del grano de maíz 7

Tabla 2. Tipos de estrés a los que puede ser sometida una planta 14

Tabla 3. Micotoxinas comúnmente encontradas como contaminantes de los alimentos 20



I. ABREVIATURAS

ABA	Ácido abscísico
ADP	Adenosín difosfato
ATP	Adenosín trifosfato
BSA	Albúmina de suero bovino
DTT	Ditiotreitol
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
FB1	Fumonisina B1
GA	Giberelinas
AG ₃	Ácido giberélico
Glu	Glucosa
HEPES	(N-[2-hidroxietil]piperazina-N'-[2-ácido etanosulfónico])
MST	Transportadores de monosacáridos
PDA	Agar papa dextrosa
Sac	Sacarosa
SDS	Dodecil sulfato de sodio
STP/HXT	Transportadores de hexosas
SUC/SUT	Transportadores de sacarosa
SUT	Transportadores de sacarosa
TAG	Triacilgliceroles
TBS	Solución salina amortiguadora con Tris
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametiletildiamina
TRIS	Trisamina
TTBS	Solución salina amortiguadora con Tris y adicionada con Tween 20
Tween 20	Polioxietilen sorbitán (monolaurato)
ZmHT	Transportador putativo de hexosas
ZmSUT	Transportador de sacarosa de maíz



II. RESUMEN

Fusarium verticillioides es un hongo fitopatógeno que infecta en todos los estadios del desarrollo del maíz, así como diversos tejidos y que ocasiona grandes pérdidas económicas, además de que las toxinas que secreta son potencialmente dañinas para animales e inclusive para el hombre. En el grano de maíz se han encontrado esporas del hongo sin que haya signos de la infección por lo que la germinación del grano puede iniciar el crecimiento del hongo.

Experimentos realizados en el laboratorio han demostrado, que la infección del embrión de maíz con el hongo *Fusarium verticillioides* adelanta la germinación del embrión, aumenta su tasa metabólica y aumenta el nivel de los transcritos para sus transportadores de carbohidratos, si bien a tiempos prolongados de la infección, es decir, después de las 24 h la invasión progresa.

Por lo que el objetivo del presente trabajo fue demostrar que durante la infección temprana por *Fusarium verticillioides* ocasiona un incremento en el número de transportadores de sacarosa y hexosas en las membranas plasmáticas del embrión, sugerente de un intento del embrión de tomar más carbono para sobrevivir al ataque del patógeno.

Se encontró que hay un aumento en el contenido de agua del embrión, debido probablemente a que el hongo penetra en el tejido, lo que explicaría el aumento en el contenido de oxígeno observado con anterioridad, pero proponemos que no está relacionado con un incremento metabólico, ya que la acumulación de peso seco no varió respecto a los embriones control.

Se encontró que el hongo ocasionó daño membranal después de las 24 h de infección, la salida de electrolitos aumentó considerablemente en los embriones germinados por 36 y 48 h.



La detección mediante anticuerpos específicos de dos transportadores de carbohidratos, reveló que solo el transportador de sacarosa aumenta al inicio de la infección, mientras que después de las 24 h de la infección ambos transportadores disminuyen o no se detectan, es probable que ocurra un incremento en la proteólisis de las proteínas del embrión ya que se observan bandas de bajo peso molecular detectadas por los anticuerpos.

El aumento inicial en los niveles del transportador de sacarosa al inicio de la infección podría indicar que la célula vegetal está transportando más sacarosa para continuar con su metabolismo basal y sobrevivir al ataque del patógeno, sin embargo, poco después de que se presenta la proteólisis y probablemente la degradación de los ácidos nucleicos, esto no permite que continúe el desarrollo del embrión para la formación de la plántula y el tejido es degradado para nutrir al hongo.



Figura 1. Caricatura de una planta madura y fruto del maíz. Tomado de <http://www.elmundo.es/elmundo/2009/02/18/verde/1234986215.html> Marzo 2011.

III. INTRODUCCIÓN

1. Maíz

El maíz (*Zea mays*) es la base de la vida rural y parte de la cultura de los mexicanos, tanto es así que se ha convertido en la principal fuente de alimentación humana en América y, por ello es uno de los cereales más utilizados en la actividad económica y productiva de la región.

Zea mays pertenece a la familia de las gramíneas (Poaceae), que son plantas compuestas

principalmente de tejido foliar. La mayoría de las gramíneas tienen inflorescencias bisexuales; sin embargo, el maíz las presenta unisexuales. Las inflorescencias masculinas (estaminadas) se desarrollan a lo largo de las estructuras ramificadas llamadas espigas, las cuales se encuentran en la parte superior de la planta (Figura 1).

Las inflorescencias femeninas (pistilo) se encuentran en una disposición compacta alrededor de un eje y en conjunto forman la mazorca, esta se localiza al final de una rama corta lateral (brote) a lo largo de la región media de la planta (Vincent, 2002). La morfología y taxonomía de la planta de maíz ha ido transformándose a través del tiempo debido a la evolución y domesticación de la misma, por ello la longitud, anchura y número de hojas ha ido cambiando a través

del tiempo. Actualmente se acepta que la filogenia del maíz es la siguiente (Figura 2):

1.1 Taxonomía del maíz



Figura 2. Taxonomía del maíz. Tomado de Grass Phylogeny Working Group-
<http://www.virtualherbarium.org/grass/,2003>.

1.2 Estructura y composición química de la semilla de maíz

La semilla madura está formada por tres estructuras físicas llamadas: pericarpio, endospermo y el embrión (Figura 3).

- ❖ **Pericarpio:** Es la capa exterior dura y transparente de la semilla que envuelve al endospermo y al embrión, por ende, protege a la semilla de los cambios ambientales o del ataque de microorganismos.

- ❖ **Endospermo:** Ocupa aproximadamente las 2/3 partes de la semilla, por ello, contribuye con aproximadamente el 85% del peso de la semilla y es el tejido que actúa como fuente de alimentación del embrión días después de iniciada la germinación. El endospermo contiene una capa continua de grandes células cúbicas, la cual es conocida como **capa de aleurona**, esta contiene gránulos de proteína y es capaz de mostrar pigmentación debido a la presencia de antocianinas, el resto del endospermo está constituido por células que almacenan almidón y algunos lípidos. Como se observa en la tabla 1, la mayor reserva contenida en el endospermo son los carbohidratos en forma de almidón (87.6%).

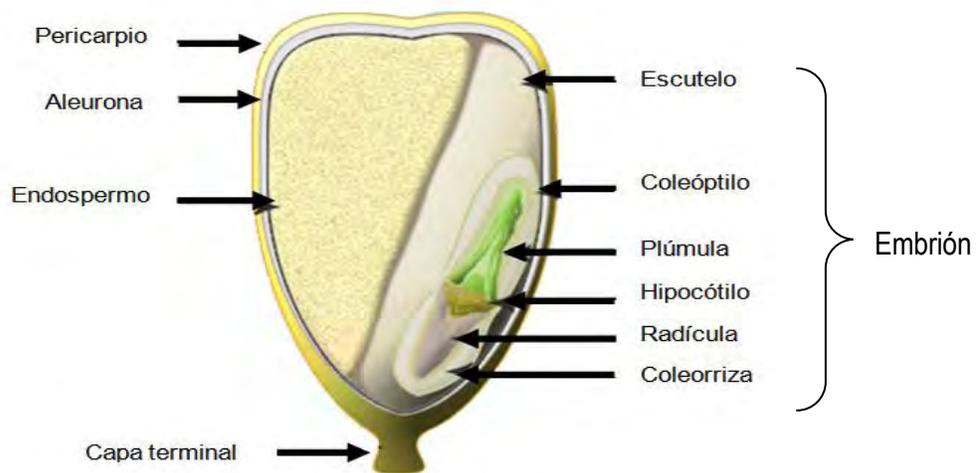


Figura 3. Estructura de la semilla de maíz. Tomada y modificada de GeoChembio (Marzo 2011).

- ❖ **Embrión:** Se encuentra debajo del endospermo, separado por una capa de células epiteliales. Esta estructura está formada por otros tejidos como el escutelo o cotiledón modificado y el eje embrionario.
 - **Eje embrionario:** Está formado por la radícula y la plúmula, esta última cubierta y protegida parcialmente por la coleorriza y, a su vez, todas encerradas y rodeadas por el escutelo.



- **Escutelo:** Cotiledón modificado en órgano absorbente adherido al endospermo. Las células que se encuentran en la capa epitelial del escutelo segregan enzimas hidrolíticas (estereasas, glucosidasas, peptidasas, fosfatasas, tiolasas, fosfolipasas, amilasas, desaminasas y ribonucleasas) durante la germinación, las cuales digieren los nutrientes presentes en el escutelo (lípidos, proteínas y carbohidratos) para que puedan ser absorbidos por el eje embrionario que se encuentra creciendo. Los lípidos son la mayor reserva de carbono en el embrión, 33.2% (Tabla 1), y se conoce que se encuentran principalmente en el escutelo (Luna-Loaiza, 2011).

Componente químico	Grano completo	Pericarpio	Endospermo	Embrión
% Proteínas	10.3	3.7	8.0	18.4
% Lípidos	4.8	1.0	0.8	33.2
% Fibra cruda	-	86.7	2.7	8.8
% Cenizas	1.4	0.8	0.3	10.5
% Almidón	71.5	7.3	87.6	8.3
% Azúcar	2.0	0.34	0.62	10.8
Calcio (mg/100g)	12	-	-	-
Fierro (mg/100g)	5.0	-	-	-
Vitamina B1 (mg/100g)	0.33	-	-	-
Ácido Nicotínico (mg/100g)	1.5	-	-	-
Riboflavina	0.13	-	-	-
Energía (MJ/100g)	1.19	-	-	-
Aminoácido limitante	Triptófano Lisina	-	-	-

Tabla 1. Composición química de las diferentes partes del grano de maíz.

Tomado y adaptado de: FAO (1993) y Paredes L., *et. al.* (2006)



2. Germinación

La germinación de la semilla es la transición del embrión en reposo hacia una planta fotosintéticamente activa: este proceso inicia con la toma de agua por la semilla (imbibición) y culmina con la emergencia de la radícula.

La germinación resulta de una combinación de diversos eventos metabólicos y celulares, regulada por procesos que incluyen la dormancia¹ en las semillas y una capacidad intrínseca para bloquear temporalmente el crecimiento radicular con el fin de optimizar el tiempo de germinación (Bove *et al.*, 2001).

Durante la germinación aumenta la actividad metabólica, incluyendo cambios en la estructura celular, respiración, síntesis de macromoléculas, síntesis de hormonas y finalmente la elongación celular. Sin embargo, la germinación no incluye el crecimiento de la planta, ya que, éste se da una vez que la germinación ha concluido y depende de los metabolitos producidos por la hidrólisis de las reservas almacenadas, como proteínas, carbohidratos y lípidos, contenidos principalmente en el endospermo (Bewley, 2001).

2.1 Fases de la germinación

La toma de agua por las semillas secas y maduras es considerada un proceso trifásico (Figura 4; Bove *et al.*, 2001), en donde al inicio la semilla presenta una rápida toma de agua (**Fase I o de imbibición**) que lleva a la reanudación del metabolismo basal. Durante esta fase, conocida como “imbibición física”, la activación paso a paso de las vías metabólicas es resultado del incremento gradual en la hidratación, por ejemplo: la reparación de ADN, la respiración, la reparación de las mitocondrias, el metabolismo de aminoácidos, la síntesis de

¹ **Dormancia:** Incapacidad del embrión a germinar por alguna insuficiencia inherente (Bewley y Black, 1994). Este proceso implica la interacción entre las giberelinas (GA) y el ácido abscísico (ABA), los cuales son factores de crecimiento (Bove *et al.*, 2001)

proteínas, la síntesis de ARNm. La entrada de agua a las células resulta ser una perturbación temporal de tipo estructural, particularmente de las membranas, las cuales permiten una rápida e inmediata pérdida de solutos y metabolitos de bajo peso molecular en la solución de imbibición que la rodea (Bewley, 1997; Bove *et al.*, 2001).

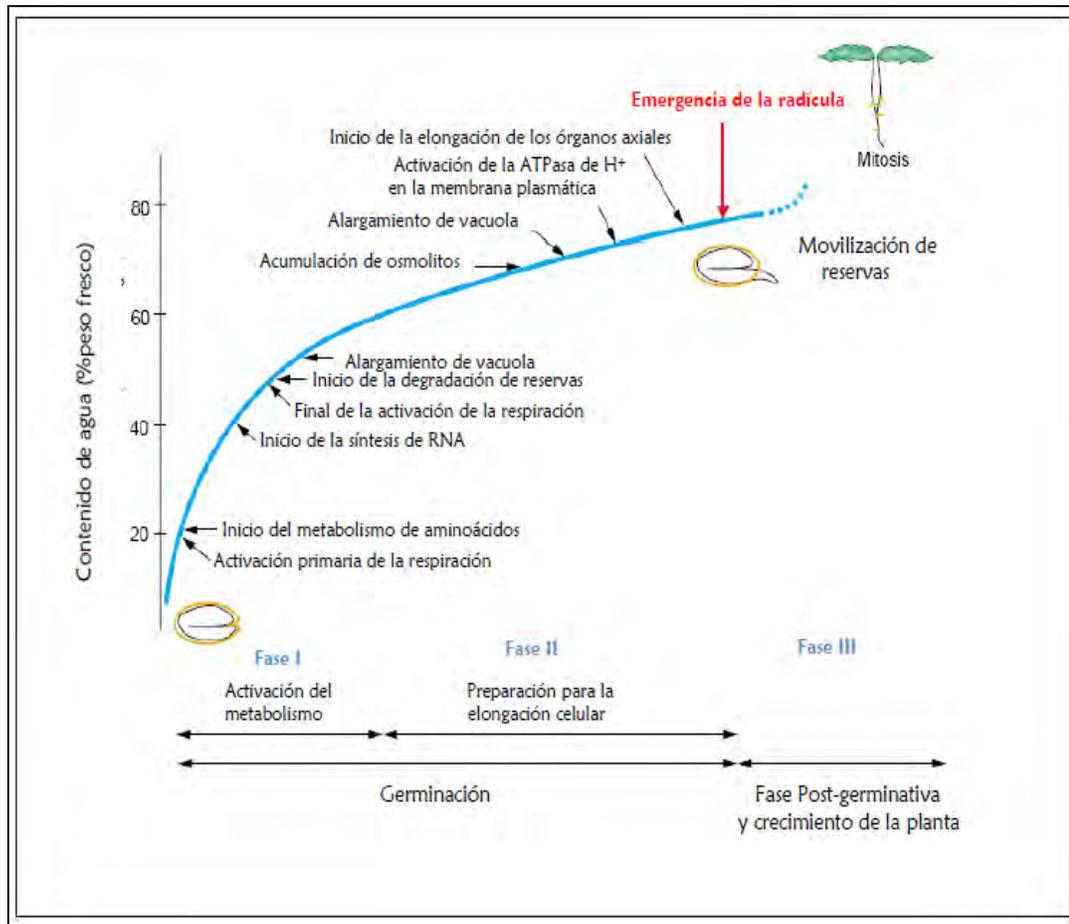


Figura 4. Curva de toma de agua por las semillas (Adaptado de Bove *et al.*, 2001)

Cuando el nivel de hidratación excede el 60%, la velocidad de hidratación disminuye (**Fase II, Fase lag o Fase estacionaria**) y los nuevos mecanismos fisiológicos se preparan para la expansión celular en el eje embrionario, está fase es dependiente de la temperatura. Durante esta fase se acumulan sustancias osmóticamente activas como iones K^+ , azúcares y aminoácidos, y se produce la acidificación de la pared celular lo cual conduce al debilitamiento de los enlaces



entre los polímeros que la conforman. Ambos eventos coinciden con la activación de la ATPasa de H^+ en la membrana plasmática, bomba primaria que funciona estableciendo el gradiente electroquímico de protones necesario para la nutrición celular, la elongación de la pared celular y el mantenimiento del pH intracelular, actividades necesarias en este importante proceso del desarrollo del maíz. Así entonces los eventos que ocurren en la Fase II permiten un aumento adicional en la toma de agua y coincide con el debilitamiento de las estructuras que rodean al eje embrionario (endospermo) permitiendo su elongación lo cual lleva hacia el final de la germinación cuando se observa la emergencia de la radícula (Bove *et al.*, 2001; Bradford, 2004).

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 la fase post-germinativa (**Fase III**) para sustentar a la joven planta en sus primeras etapas de crecimiento antes de que se transforme en un organismo autótrofo (Bove *et al.*, 2001).

2.2 Movilización de reservas metabólicas

Las semillas contienen cantidades importantes de reservas alimenticias (Tabla 1), que permiten el crecimiento y el desarrollo de la plántula hasta que ésta se establece como un organismo autótrofo. Las reservas contenidas en las diversas estructuras de la semilla son compuestos de alto peso molecular; durante su movilización son transformadas en moléculas de menor peso formando cuerpos intracelulares para que se transporten con mayor facilidad a los tejidos demanda (Bewley, 2001).

Una amplia gama de hidrolasas ácidas sintetizadas en la aleurona y el escutelo son las responsables de hidrolizar las reservas de la semilla (Pitchard *et al.*, 2002). Estas reservas pueden ser las proteínas y el almidón en el endospermo,



los lípidos y proteínas en células de la aleurona y los polisacáridos en las paredes de la aleurona y el escutelo (Bewley, 2006).

En el proceso de germinación, el almidón y otros carbohidratos, así como también los lípidos, son convertidos de nuevo en sacarosa para que se transporten al eje embrionario. Por otro lado las proteasas descomponen a las proteínas almacenadas produciendo péptidos y aminoácidos que se utilizan en la síntesis de proteínas o pueden ser enviados a la plántula. Así mismo la fitasa es activada para descomponer a la fitina (mio-inositol 1,2,3,4,5,6-hexa cis-fosfato o formando complejos con cationes plurivalentes y proteínas) liberando así fosfatos y los iones que pueden contener al fitato como el hierro, el calcio y el magnesio, todos ellos útiles en la síntesis de ATP y como coenzima (Bradford, 2004).

2.2.1 Movilización de carbohidratos

La sacarosa, la rafinosa y otros oligosacáridos son la fuente inicial de carbohidratos para el eje embrionario, ya que se encuentran almacenados en él mismo. La movilización de las reservas del endospermo o de la aleurona generalmente inicia después de la potrusión de la radícula, este mecanismo se encuentra bajo el control de hormonas (particularmente el ácido giberélico) el ácido giberélico es sintetizado por el embrión y ejerce su efecto en las células de la aleurona quienes sintetizan enzimas hidrolíticas que se secretan en el endospermo (Bradford, 2004).

El almidón es el carbohidrato de reserva más común en las semillas de cereales, cerca del 70% del peso de la semilla es almidón, compuesto que generalmente se acumula formando glóbulos cristalinos que son hidrolizados por varias enzimas (Nonogaki, 2008). La enzima más estudiada es la α -amilasa, endoamilasa que rompe el enlace glicosídico α -1-4 del almidón. Sin embargo la más abundante en el endospermo es la β -amilasa, exoglucosidasa que también hidroliza el enlace glicosídico α -1-4 que toma de los productos de la hidrólisis de la



α -amilasa; no obstante, tanto las alfa como las beta amilasas no pueden hidrolizar los enlaces α -1,6 de la amilopectina, por lo que, se requiere de enzimas específicas, llamadas desramificantes, que hidrolizan la amilopectina para liberar amilosa, la cual posteriormente podrá ser hidrolizada nuevamente por el conjunto de las α y β amilasas. Por otra parte, la α -glucosidasa convierte a la maltosa en glucosa y esta es transformada a sacarosa por la vía de la UDP-glucosa pirofosforilasa y la sacarosa-6P sintetasa (Bradford, 2004)

Algunas semillas cuentan con inhibidores de la α -amilasa de insectos para prevenir que estos consuman sus reservas, de igual manera, las semillas que tienen a la galactomanana como mayor reserva de carbohidratos presentan otro tipo de enzimas hidrolíticas (Bradford, 2004).

2.2.2 Movilización de lípidos

Los lípidos de reserva predominantes en las semillas son los triacilgliceroles (TAGs) (Pitchard *et al.*, 2002); su oxidación produce dos veces más la energía que la producida en la oxidación de carbohidratos o proteínas (Quettier, *et al.*, 2009).

Los TAGs son hidrolizados por las enzimas llamadas lipasas, las cuales liberan ácidos grasos y glicerol; el glicerol es fosforilado y entra a la vía gluconeogénica después de ser convertido a dihidroxiacetona fosfato por la enzima glicerol-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de NAD^+ . Por su parte los ácidos grasos libres son transportados al glioxisoma (órgano especializado en la movilización de reservas de lípidos), en donde son activados a acil-CoA para entrar a la vía de la β -oxidación. El acetil-CoA producido por la β -oxidación es dirigido hacia el ciclo del glioxilato en donde es convertido a malato y succinato, posteriormente el succinato es convertido a malato en la mitocondria, para que se dirija hacia el citosol y por la acción de la malato deshidrogenasa convertirse en oxalacetato, que a su vez será transformado por la fosfoenolpiruvato carboxicina, en fosfoenolpiruvato que entrará a la vía de la gluconeogénesis con



la finalidad de producir carbohidratos para mantener el crecimiento del embrión (Bradford, 2004; Eastmond y Graham, 2001; Ramírez-Sóstenes, 2008).

2.2.3 Movilización de proteínas

La hidrólisis de las proteínas de reserva está catalizada por diferentes tipos de enzimas proteolíticas (endopeptidasas, aminopeptidasas y carboxipeptidasas), agrupadas todas bajo el nombre de proteasas. A medida que progresa la germinación, estas proteínas de reserva se transforman en moléculas de menor peso molecular, especialmente pequeños péptidos y aminoácidos. Los aminoácidos liberados pueden ser utilizados para la síntesis de nuevas proteínas de la plántula en desarrollo o para proporcionar energía mediante la oxidación de su esqueleto carbonado. En los cereales las proteínas de reserva se localizan en los gránulos acumulados en la capa de aleurona que también es donde ocurre la síntesis de las mismas proteasas, esta síntesis es regulada positivamente por las giberelinas y negativamente por el ácido abscísico (Bradford, 2004; Ramakrishna y Ramakrishna-Rao, 2005). En la mayoría de las semillas dicotiledóneas las proteínas de almacenamiento están presentes en órganos distintos a los cotiledones.

La movilización de proteínas de reserva es realizada en el endospermo y es uno de los eventos post-germinativos más importantes en el desarrollo y crecimiento de la plántula (Nonogaki, 2008).

3. Factores de estrés que afectan la germinación

La capacidad de una semilla para germinar no solo depende de los factores intrínsecos que posea, como la dormancia, la permeabilidad de la testa al agua y oxígeno, así como, la obstrucción de la emergencia de la radícula por el endospermo o la testa y su respuesta metabólica (anteriormente descrita), sino también a diferentes factores ambientales como: la disponibilidad del agua, oxígeno, luz, temperatura y la presencia de patógenos (Bove *et al.*, 2001).



Factores ambientales fuera de lo óptimo son factores denominados de estrés y que contribuyen a modificar el crecimiento de la planta a lo largo de toda su vida (Tabla 2).

El *estrés* es el conjunto de respuestas bioquímicas o fisiológicas que define un estado particular del organismo diferente al observado bajo un rango de condiciones óptimas. Mientras que la *resistencia al estrés* está definida como la capacidad de un organismo para resistir, evitar y escapar a los estímulos ambientales negativos o poder permanecer bajo un estado particular de estrés sin que su fenotipo se modifique de manera significativa; su estado “ideal” se identifica al ser observado bajo condiciones óptimas y se denomina “norma” (Benavides, 2002; Hoth *et al.*, 2010).

TIPO DE ESTRÉS	EJEMPLO
AMBIENTAL	<ul style="list-style-type: none">• Hidratación• Temperatura• Irradiación• Radiación UV• Salinidad• Nutricional• Toxicidad por metales pesados
FISIOLÓGICO	<ul style="list-style-type: none">• Cambios hormonales (ABA, fitocromo, etileno, AG, etc)• Cambios en las estructuras celulares (estomas, cloroplastos, etc)• Respuesta estomática• Tasas de asimilación de CO₂• Tasa de fotorrespiración
BIOQUÍMICO	<ul style="list-style-type: none">• Factores abióticos• Acumulación de metabolitos• Absorción y compartimentación de iones• Cambios en la permeabilidad del agua• Factores bióticos• Genes de resistencia• Resistencia sistemática adquirida (SAR)• Resistencia sistemática inducida (RSI)• Choque oxidativo• Plantas transgénicas con mayor resistencia al estrés oxidativo

Tabla 2. Se muestran los 3 tipos de estrés a los que puede ser sometida una planta cuando cambian sus condiciones de desarrollo (Hoth *et al.*, 2010).



Las plantas al igual que todo organismo vivo, a lo largo de su ciclo de vida no pueden evitar cambios en el ambiente que pueden resultar desfavorables y ser una causa de estrés; es por ello que tienen que adaptarse a las posibles condiciones cambiantes que se presenten durante su crecimiento y desarrollo. Esta adaptación implica una respuesta integrada de factores que se están presentes en el estadio de desarrollo en el que se encuentra la planta para continuar con su crecimiento, así como de factores que contendrán con el estrés al que está expuesta la planta, por ejemplo, si la planta se encuentra ante un estrés por sequía, se induce la producción de ABA, el cierre parcial de estomas en las hojas, la producción de compuestos osmóticamente activos, esto permitirá mantener el metabolismo de la célula por un tiempo; si la sequía es prolongada se redirige el carbono de las hojas hacia los órganos sexuales para la producción de semillas y asegurar la sobrevivencia de la especie (Hoth *et al.*, 2010).

Un proceso o estado infeccioso puede ser considerado como una condición causa de estrés y las plantas están expuestas a la infección por microorganismos patógenos durante todo su ciclo de vida, incluyendo la germinación puesto que las semillas en particular son estructuras con un alto contenido de nutrientes y por ello son susceptibles a ser colonizados por microorganismos patógenos. En el caso de *Zea mays* se ha reportado que su principal patógeno es *Fusarium verticillioides*, este produce metabolitos secundarios tóxicos para humanos, animales y plantas (Ducan *et al.*, 2009; Vismar *et al.*, 2004).

4. *Fusarium verticillioides*

Fusarium verticillioides es un hongo filamentoso y pertenece a la subdivisión *Deuteromycota* (Figura 5). El género al que pertenece este hongo se caracteriza por la producción de estructuras de reproducción asexual denominadas macroconidias (Figura 6A) y que son producidas en forma de racimos llamadas esporodoquios. Además de esta característica *Fusarium*

verticillioides produce esporas unicelulares en el micelio aéreo llamadas microconidias (Figura 6B; Bakan *et al.*, 2002).

4.1 Taxonomía de *Fusarium verticillioides* en plantas de maíz

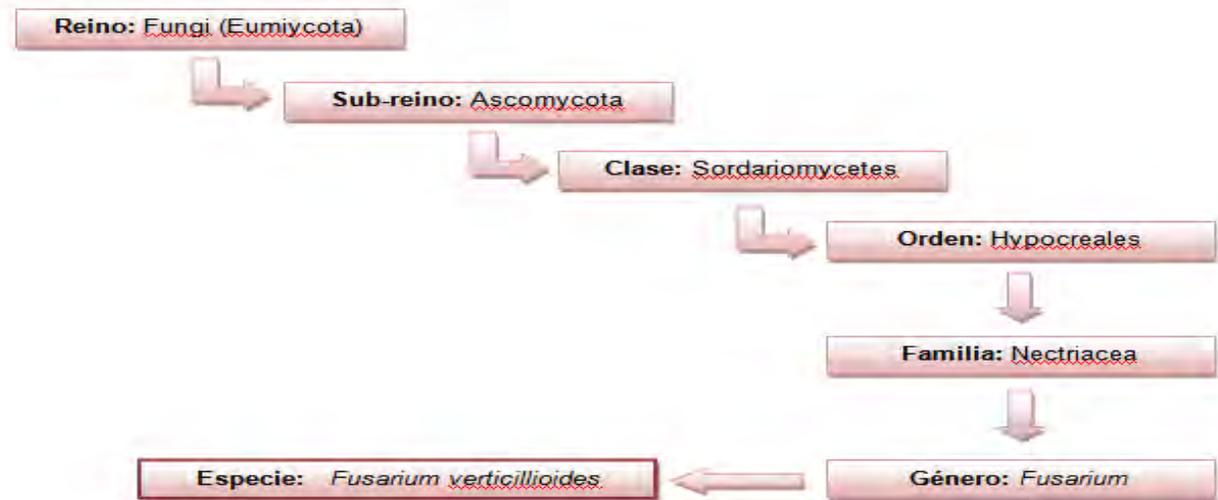


Figura 5. Taxonomía de *Fusarium verticillioides*. Consultado el 10/02/2011 en: <http://www.catalogueoflife.org/details/species/id/5893982>

Las macroconidias tienen forma alargada y por lo general presentan de cinco a seis septos, miden de 31-58 x 2.7-3.6 μm aproximadamente; las microconidias son abundantes de forma ovalada y presentan septos, miden alrededor de 7-10 x 2.5-3.2 μm .

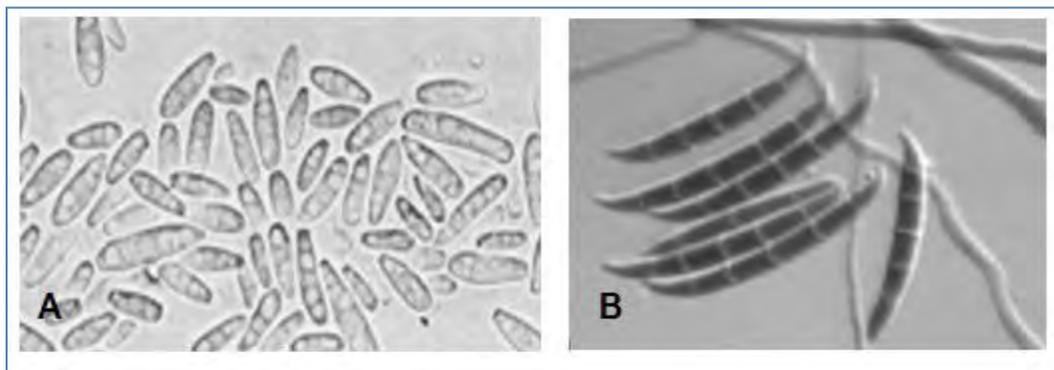


Figura 6. Formas macroscópicas de *Fusarium veticillioides*. A. Macroconidias y B. Microconidias. Tomado y adaptado de Nelson *et al.* (1994) y <http://www.doctorfungus.org/>, (Marzo 2011).



4.2 Patogenicidad de *Fusarium verticillioides* en la planta de maíz

Fusarium verticillioides puede generar diversas enfermedades en el maíz, de entre las cuales podemos mencionar la pudrición de estructuras como la semilla, raíz, tallo y mazorca, así como el marchitamiento completo de la planta, sin embargo, este hongo puede provocar infecciones asintomáticas.

Los conidios de *Fusarium verticillioides* pueden ser depositados en la superficie de la hoja por acción del viento, la lluvia o también por medio de vectores como los insectos, para posteriormente entrar en contacto con los nodos y penetrar al tallo causando la pudrición de éste (Figura 7; Nelson *et al.*, 1994). Los insectos juegan un papel importante en la infección fúngica en el tallo y en la mazorca, ya que estos al actuar como vectores acarrean al patógeno e infectan al maíz, dentro de los vectores que participan en la infección por *Fusarium verticillioides*, encontramos al gusano de maíz en su estado larvario y adulto, y a algunos escarabajos (Munkol y Desjardins *et al.*, 1997).

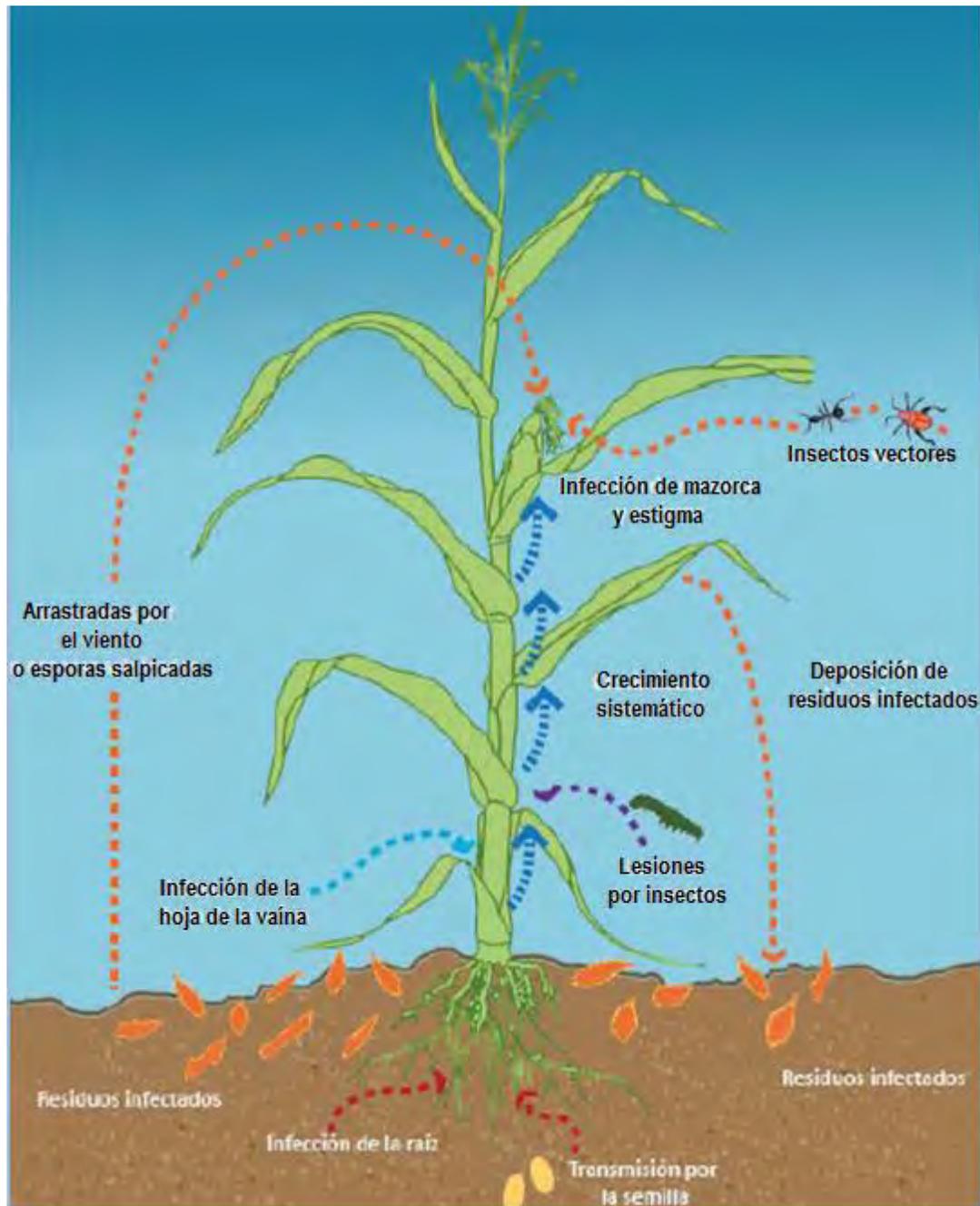


Figura 7. Ciclo de infección y enfermedad en el sistema *Fusarium verticillioides*-maíz (Tomado de Guzmán-Chávez 2010).



La vía de entrada para que se lleve a cabo la infección de la mazorca es a través de la fisura estilar² para crecer y colonizar el pericarpio de la semilla, muy rara vez se ha encontrado en el embrión y el endospermo; este tipo de infección se pudo haber debido a la penetración de la hifa al interior del grano por medio de una fisura en la superficie del pericarpio. Otra vía de entrada es el resultado de una infección sistémica de la semilla, este tipo de infección se puede iniciar con la presencia del hongo sobre la semilla y cuando esta se va desarrollando, el hongo puede trasladarse desde el tallo hacia la mazorca y finalmente a los granos del maíz (Oren *et al.*, 2003).

4.3 Producción de toxinas por *Fusarium verticillioides*

Las micotoxinas son sustancias producidas por ciertos hongos pertenecientes principalmente a los géneros *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium*. Se encuentran en una gran variedad de productos agrícolas y son los contaminantes naturales de los alimentos a nivel mundial. Se consideran altamente mutagénicos, carcinogénicos, teratogénicos e inmunosupresores. Debido a su variedad de efectos tóxicos y a su termorresistencia, la presencia de las micotoxinas en los alimentos es considerada de alto riesgo para la salud humana y de los animales.

La contaminación de los alimentos con micotoxinas depende de las condiciones ambientales, que pueden propiciar el crecimiento del hongo y por ende la producción de toxinas. De la extensa variedad de micotoxinas, alrededor de 20 han sido investigadas y 6 son consideradas importantes desde el punto de vista alimentario (Tabla 3).

² **Fisura estilar:** Es la apertura del pericarpio que llega hasta el carpelo (tejido parte del gineceo) y es donde el embrión se nutrirá (Duncan y Howard, 2010),



Fusarium verticillioides produce algunas micotoxinas dañinas como el ácido fusárico, la moniliformina, fusarinas y fumonisinas, siendo esta última la más abundante e importante por su toxicidad.

Micotoxina	Efectos	Hongo productor	Alimento
Ocratoxina A	Nefrotóxicas Nefrocancerígenas	<i>Penicillium verrucosum</i> <i>Aspergillus ochraceus</i>	Cereales
Zearalenona (F-2 o ZEN)	Estrógenos Genotóxicas	<i>Fusarium graminearum</i> <i>Fusarium culmorum</i>	Cereales
Patulina	Poca evidencia experimental o clínica, de los efectos en humanos.	<i>Penicillium expansum</i>	Jugo de manzana
Tricotecenos Deoxivalenol (DON)	Citotóxicas Inmunosupresoras	<i>Penicillium expansum</i> <i>Fusarium verticillioides</i> <i>Fusarium culmorum</i>	Cereales Harinas
Fumonisinas FB₁, FB₂ y FB₃	Leucoencefalomacia en equinos Edema pulmonar en porcinos Cáncer en humanos	<i>Fusarium verticillioides</i> <i>Fusarium proliferatum</i>	Maíz
Alatoxinas AFB ₁ , AFB ₂ , AFG ₁ y AFG ₂	Cancerígenas Mutágenas Teratógenas	<i>Aspergillus flavus</i> <i>Aspergillus parasiticus</i>	Cereales

Tabla 3. Micotoxinas comúnmente encontradas como contaminantes de los alimentos (Tomada y adaptada de Méndez-Albores y Moreno-Martínez, *et al.*, 2009).

Las fumonisinas son un grupo de al menos 15 micotoxinas producidas principalmente por los hongos *Fusarium verticillioides* y *Fusarium proliferatum*, las cuales se encuentran frecuentemente en todas las regiones productoras de maíz a nivel mundial (Bluhm *et al.*, 2008).

La estructura química de las fumonisinas consiste en un esqueleto de 20 carbonos y un grupo amino en el C-2 y grupos de ácido tricarbóxico esterificado en el C-14 y C-15 (Bush, 2001). Existen al menos tres fumonisinas de ocurrencia



natural, se conocen como FB₁, FB₂ y FB₃, la primera es la más abundante. (Méndez-Albores y Moreno-Martínez *et al.*, 2009).

Durante la colonización en los granos de maíz, *Fusarium verticillioides* produce un grupo de micotoxinas relacionadas estructuralmente con las fumonisinas FB₁ (Vismer *et al.*, 2004). La FB₁ es un potente inhibidor de la ceramida sintetasa (Desai *et al.*, 2002), por lo tanto altera la biosíntesis de los esfingolípidos.

La biosíntesis de FB₁ está influenciada por los componentes del grano de maíz (Shim *et al.*, 2003). Uno de esos componentes es el almidón, que cambia radicalmente en el grano según sea la madurez de este. Los granos inmaduros carecen de almidón, por ello se dice que reprimen la biosíntesis de FB₁ y carecen de capacidad para inducir la expresión de los genes de la biosíntesis de fumonisinas (FUM), pero en los granos maduros el endospermo es rico en almidón, estos altos niveles acumulados favorecen la producción de FB₁ (Bluhm *et al.*, 2008).

Se conoce que durante la infección de una planta hay un aumento en la actividad de las invertasas, y las hexosas producidas de la hidrólisis de la sacarosa son utilizadas por el hongo. Por ello se han buscado los transportadores de carbohidratos tanto en el hongo como en la planta. Recientemente se encontró que *Fusarium verticillioides* expresa de manera específica al gen *fst1*, que codifica para un transportador putativo de hexosas. *fst1* fue expresado en levaduras que carecían de transportador de hexosas y se observó que la levadura no transportaba glucosa, fructosa o manosa, por lo que se propone que *fst1* codifica para una proteína reguladora del transporte de hexosas en *Fusarium* durante el proceso de infección (Kim y Woloshuk, 2011). De hecho una mutante de *Fusarium verticillioides* *fst1* suprimida disminuyó la expresión de sus transportadores de carbohidratos, mientras que la cepa silvestre en presencia de tejido vegetal era capaz de incrementar sus transportadores de carbohidratos, estudio que revela



que el transporte de carbohidratos en el hongo es importante durante la infección y que se encuentra finamente regulado (Bluhm *et al.*, 2008).

En la planta poco se conoce respecto al efecto que la infección ocasiona en sus transportadores de carbohidratos, y es el aspecto que se aborda en este estudio. Por lo anterior, primero se describen los transportadores de carbohidratos más abundantes en las células vegetales, los transportadores de sacarosa y hexosas, y posteriormente algunos aspectos conocidos de su regulación.

5. Los transportadores de carbohidratos de plantas

Los carbohidratos juegan un papel importante tanto como nutrientes como moléculas señal durante el ciclo de vida en las plantas superiores (Büttner, 2007). Las células vegetales producen carbohidratos por la fijación de dióxido de carbono durante la fotosíntesis, sin embargo, en las plantas superiores, no todas las células son fotosintéticamente activas, las hoja maduras “tejidos fuente” son los sitios predominantes de la fotosíntesis y estos producen un exceso de carbohidratos, que los exportarán a otras partes de la planta. Los tejidos no fotosintetizadores llamados “tejidos demanda”, son las raíces, estructuras reproductivas, órganos y tejidos en desarrollo que obtienen carbohidratos de los tejidos fuente (Truernit, 2001).

Factores exógenos como la infección por patógenos o el estrés abiótico pueden afectar la compartimentación y distribución de los carbohidratos, por ello las plantas deben contar con mecanismos que integren la expresión de enzimas productoras de los carbohidratos en los tejidos fuente y su utilización en los tejidos demanda (Roitsch, 1999; Lalonde *et al.*, 1999).



5.1 *Transportador de sacarosa*

El transporte de sacarosa es esencial para la distribución de carbohidratos en las plantas (Truernit, 2001). El transporte a distancia de sacarosa depende de la participación de dos diferentes mecanismos, el llamado transporte simplástico y el transporte apoplástico que se presenta en un conjunto de células especializadas denominadas elementos de la savia (SE) y células acompañantes (CC), transporte simplástico (Lalonde *et al.*, 1999).

En el **transporte simplástico** el movimiento del soluto ocurre a través de las conexiones denominadas plasmodesmata. Los **plasmodesmata** son canales citoplásmicos finos que dividen la pared celular y conectan una célula a las células vecinas en las plantas superiores; cada canal está unido con una membrana plasmática (Stenesh, 1989), además permiten el transporte de nutrimentos entre las células y se encuentran constituidos por un retículo endoplásmico y proteínas, formando un conducto con un diámetro variable que permite el paso de solutos pequeños como la sacarosa o grandes como el ARN de algunos virus.

Mientras que el **transporte apoplástico** se lleva a cabo a través de proteínas transportadoras localizadas en la membrana plasmática, estas proteínas cruzan la membrana con estructuras de α -hélice (Lalonde, 1999).

Las células de los elementos amorfos de la savia se encuentran conectadas para formar un tubo en el cual hay muy poca resistencia al paso de solutos. La entrada de sacarosa al floema y la subsecuente toma de agua que viene del xilema mueve al carbohidrato en un gradiente osmótico que dirige al carbohidrato a las zonas de bajo contenido de azúcares por lo cual finaliza en los tejidos demanda (Turgeon 2006)

Actualmente se tiene un modelo en el cual se presentan el movimiento de sacarosa a través de las dos rutas metabólicas mencionadas anteriormente (Figura 8).

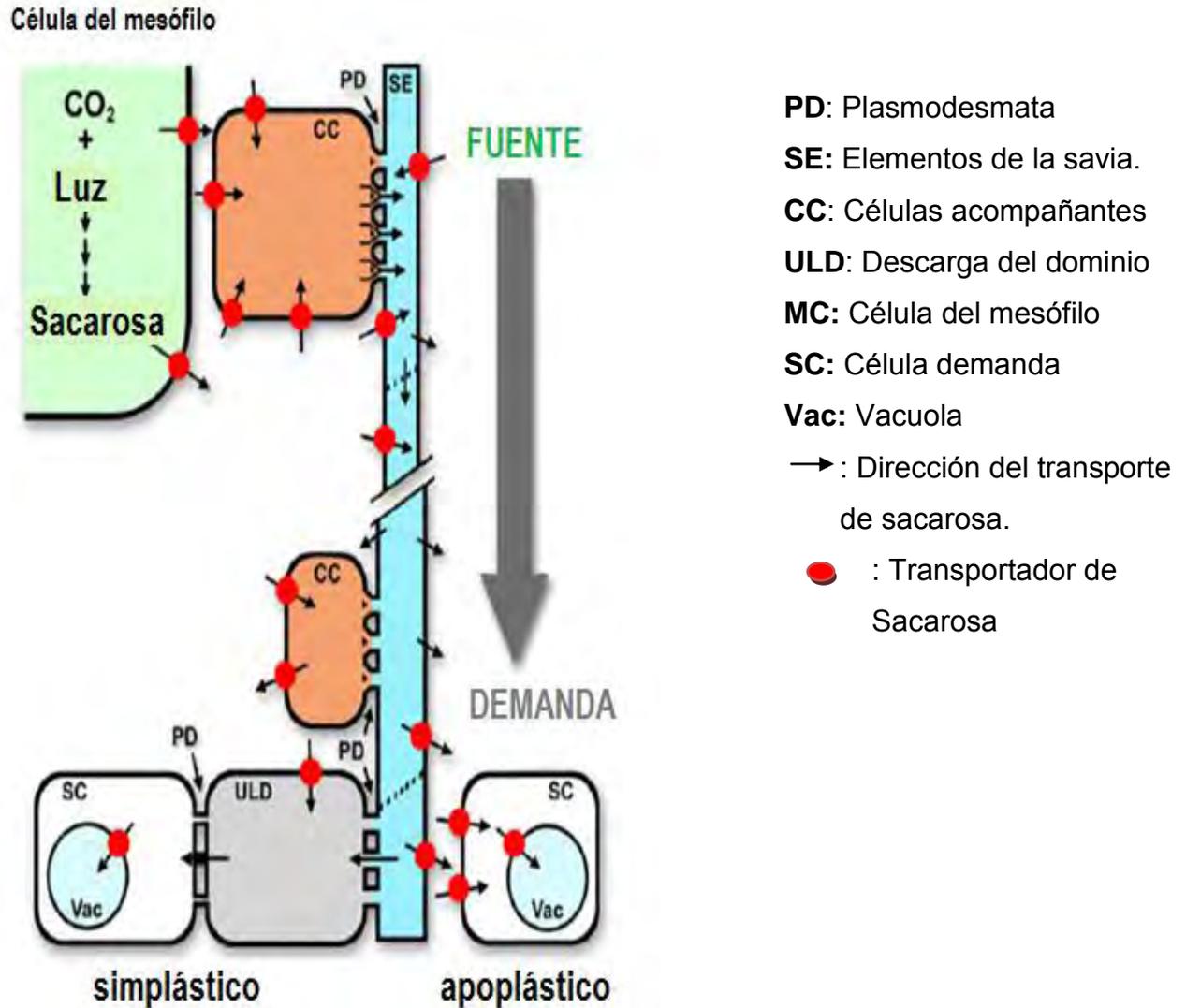


Figura 8. Sistema de transporte de sacarosa en plantas. (Tomado y adaptado de Sauer, 2007). Se muestra el sistema de transporte de sacarosa desde las células fuente hacia el floema (en azul claro) y desde el floema hacia los tejidos demanda. Dos tipos de transporte de sacarosa se evidencian, el transporte simplástico vía plasmodesmata (PD) y el transporte apoplástico debido a los transportadores de sacarosa, distintos dependiendo de su función, transportadores de sacarosa difusivos como los simportadores con protón.



5.2 Tipos de transportadores de sacarosa

Los eventos de salida de la sacarosa de la célula del mesófilo hasta la célula demandante usando la vía apoplástica pueden llevarse a cabo por la existencia de diferentes tipos de transportadores, los cuales son:

1. **Los transportadores de la membrana plasmática**, responsables de la entrada de sacarosa a la célula y son del tipo simportador sacarosa/H⁺.

La acumulación de sacarosa en el floema es un paso importante en la compartimentación, debido a que produce un potencial osmótico el cual genera presión hidrostática positiva que favorece el transporte de sacarosa a distancia.

La asignación de carbono por el simportador sacarosa/H⁺ es importante, ya que, transporta la sacarosa dentro del floema en contra de un gradiente de concentración, las propiedades de transporte y bioenergética del simportador sacarosa/H⁺ inicialmente fueron descritas en sistemas de tejidos intactos; el simportador es un transportador activo secundario que permite el paso de la sacarosa a través de la membrana plasmática por la fuerza generada por la ATPasa de H⁺, el transportador es específico para la sacarosa con una K_m de 1 a 11 mM (Lu y Bush, 1998). El transporte es electrogénico y la estequiometría es de protón:sacarosa (Boorer *et al.*, 1996), este simportador es inhibido por diferentes compuestos, por ejemplo, el ácido p-cloromercuribencensulfónico (reactivo modificador de sulfidrilos), y el Dietil Pirocarbonato (DEPC) el cual inhibe por una modificación química de un residuo de histidina (Lu y Bush, 1998).

Por lo regular en las plantas se pueden encontrar diferentes formas de los transportadores de sacarosa a excepción del maíz en donde el único transportador que se ha encontrado expresado en la planta es el ZmSUT1, si bien en el genoma del maíz recién secuenciado se han encontrado los genes ZmSUT2 al ZmSUT5



(Slewinski y Braun, 2009). Por ejemplo, en *Arabidopsis* se han encontrado aproximadamente 69 transportadores homólogos de carbohidratos y estos han sido clasificados en las siguientes familias: transportadores de sacarosa (SUC/SUTs), transportadores de hexosas (STP/HXT), transportadores de polioles (PLT), transportadores de myo-inositol (ITR/MIT), transportadores plastídicos de glucosa (pGlcT), proteínas sensoras putativas de monosacáridos (AZT/MSSP), SFP y la familia de monosacáridos aún no caracterizada (Shiratake, 2007).

La familia de los transportadores SUT/SUC se ha dividido en tres subfamilias de acuerdo a su homología estructural y su actividad (Figura 9). La subfamilia SUC2/SUT1, los transportadores presentan una K_m de alta afinidad para sacarosa (100 μ M a 2 mM), esta familia se encuentra presente en dicotiledóneas y ausente en monocotiledóneas; la subfamilia SUC4 se encuentra formada por los transportadores de baja afinidad con una K_m alrededor de 5 mM y la subfamilia SUC3/SUT2 formada por miembros que presentan actividad de transporte de sacarosa de baja afinidad, además la mayoría de sus integrantes tienen al dominio central y al *N*-terminal más grande comparado con las otras subfamilias, estos dominios son considerados importantes para la afinidad del transportador por la sacarosa o para la regulación de la actividad de transporte (Lalonde *et al.*, 2004; Shiratake *et al.*, 2007).

Las familias SUC/SUT presentan estructuras similares a las de la Superfamilia de facilitadores mayores (MSF), las cuales tienen 12 dominios transmembranales y 11 asas (Figura 9), mientras que el *N*- y el *C*- terminal están localizados en el citosol (Shiratake *et al.*, 2007). El transportador de sacarosa de maíz *ZmSUT1*, pertenece a la subfamilia SUC3/SUC2.

El transportador de sacarosa en maíz *ZmSUT1* se expresa fuertemente en tejidos fuente (hojas) con un patrón diurno, teniendo su máxima expresión al finalizar el día y su mínimo de expresión durante la noche (Slewinski *et al.*, 2009).

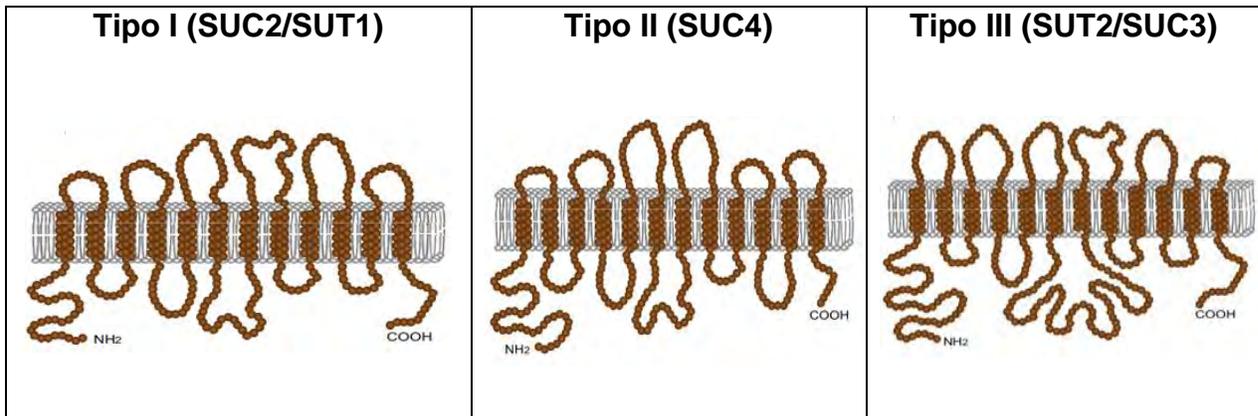


Figura 9. Topología de los transportadores de los tres grupos de la familia SUT.

(Tomado y adaptado de Shiratake, 2007)

- 2. Los transportadores de eflujo de la membrana plasmática** son los responsables de la descarga de sacarosa en los órganos demanda o de la salida de este carbohidrato, desde las células mesófilas al floema.

Hasta el momento se han encontrado una enorme diversidad (isoformas) de transportadores de sacarosa en plantas, todos ellos clasificados como simportadores, por lo que se ha sugerido que el simportador podría funcionar *in vivo* como un transportador difusional de salida basado en resultados que han demostrado que el transporte de sacarosa puede llevarse a cabo en ausencia de un gradiente de protones; en particular en maíz se ha demostrado que el transportador de sacarosa sobreexpresado en ovocitos de *Xenopus* es capaz de exportar la sacarosa en ausencia de la formación de un gradiente de protones (Carpaneto *et al.*, 2005)

5.3 Transportador de monosacáridos

Sabemos que la sacarosa es la principal forma de transporte a distancia de azúcares en el floema, sin embargo, los transportadores de hexosas juegan un papel importante en el intercambio intercelular tanto en los tejidos fuente como en



los tejidos demanda. La glucosa y la fructosa son sintetizados a partir de los productos primarios de la fotosíntesis en el cloroplasto y su movilización intracelular y extracelular es necesaria para su nutrición (Delrot *et al.*, 2001). Sin embargo, los tejidos heterotróficos que por lo regular se encuentran simplásticamente aislados, es decir sin plasmodesmata que permitan la libre difusión de los nutrientes entre el apoplasto y el citoplasma, hidrolizan en los apoplastos a la sacarosa y los monosacáridos resultantes son transportados mediante transportadores de hexosas para ser almacenados o consumidos en la respiración (Kühn *et al.*, 1999).

Lo anterior se ha demostrado, ya que plantas mutantes de zanahoria que tienen una actividad reducida de sus invertasas de la pared celular, disminuyeron el crecimiento de su raíz afectando además el metabolismo de los carbohidratos en las hojas (Tang *et al.*, 1999). Una mutación específica de la invertasa de la pared del endospermo del grano de maíz disminuye el almidón en el desarrollo, denominadas mutantes miniatura (Cheng y Chourey, 1999). Estos resultados señalan la importancia de la hidrólisis de sacarosa extracelular y el posterior transporte de hexosas en el desarrollo de la planta (Büttner *et al.*, 2000).

En *Arabidopsis* se han identificado al menos 53 genes que pertenecen a los transportadores de hexosas y se pueden establecer 7 subfamilias de genes, estas son: 1) Subfamilia STP, en ella se encuentran los simportadores de monosacárido- H^+ en la membrana plasmática con cerca de 20 miembros; 2) Subfamilia VGT, transportadores vacuolares de glucosa que por lo regular se localizan en la vacuola sin embargo se ha encontrado 1 gen de esta familia localizado en el cloroplasto; 3) Subfamilia TMT, transporte tonoplástico de monosacáridos; 4) Subfamilia pGlcT, transportadores de glucosa plastídico; 5) Subfamilia PLT, transportadores de polioles de amplio espectro; 6) Subfamilia INT, simportadores H^+ - miositol o inositol localizados en la membrana plasmática y fuertemente expresados en polen y en células acompañantes; 7) Subfamilia



ERD6-like, transportadores de respuesta temprana que son inducidos por deshidratación, sequía o tratamiento por frío (Büttner, 2007)

La subfamilia STP es la mejor estudiada y se conoce que transportan a los monosacáridos en simporte con protón, se localizan preferencialmente en las membranas plasmáticas de tejidos fuente y tienen un espectro amplio de hexosas que transportan como glucosa, xilosa, galactosa, fructosa entre otras hexosas. La K_m para los transportadores es de alta afinidad en general de 10 a 100 μM con excepción del transportador de azúcares 3 de Arabidopsis, AtSTP3 con una K_m para glucosa de 2 mM (Büttner y Sauer 2000).

5.4 Regulación de los transportadores de carbohidratos

Los transportadores de sacarosa se expresan preferencialmente en las uniones vasculares de las hojas maduras y poco en las hojas jóvenes, es decir existe una transición en el desarrollo de la hoja que induce la expresión de los genes para el transportador de sacarosa, que se inicia de la punta de la hoja y procede hacia la base, posiblemente para aumentar el transporte hacia el floema. Se conoce que en las zonas cubiertas o alejadas de la luz no existe expresión del transportador de sacarosa, por lo que la luz es un factor importante en su regulación (Sauer, 2007). También se ha encontrado que las fitohormonas estimulan la expresión de los transportadores, en especial el ácido abscísico. Recientemente se reportó que en la región promotora del transportador de sacarosa AtSUC1 se encuentra una secuencia ABRE (del inglés “abscisic acid response element”, PyACGTGGC) y mediante experimentos de doble híbrido se sugiere que las proteínas ABI5 y AREB3 interaccionan con este elemento regulando la expresión de AtSUC1 (Hoth et al., 2010). Se conoce poco sobre el papel tanto de ABI5 y AREB3 pero ambas son proteínas miembros de la familia de reguladores transcripcionales de la familia bZIP (proteínas básicas de unión asociado a un dominio de leucinas) que se expresa tanto en tejidos vegetativos



como semillas. Aunque en el caso particular de ABI5 se ha encontrado que la proteína regula algunos de los genes LEA (del inglés “late embryogenesis abundant” (Finkelstein y Lynch, 2000), algunos de manera positiva. Mientras que AREB3 (ABA-responsive element binding protein) se expresa en respuesta a estrés por salinidad o hídrico (Uno *et al.*, 2000).

Por otro lado en la infección por patógenos también se ha encontrado que hay un aumento en las concentraciones de ABA, así como un incremento en la expresión de un transportador de hexosas de uva (Hayes *et al.*, 2010), por lo que es probable que ABA se encuentre regulando la expresión del transportador AtSUC1 en situaciones de estrés, ya que ABA es una hormona que se incrementa cuando la planta ha sido sujeta a estrés de tipo hídrico.

En relación al efecto de regulación de ABA sobre el transportador de sacarosa, hay que hacer notar que numerosos estudios han encontrado que existe una relación muy estrecha entre el metabolismo de carbohidratos y la sensibilidad a ABA, lo que ha permitido encontrar mutantes que inicialmente habían sido descritas como insensibles o resistentes a azúcares como mutantes en los genes de la vía de síntesis o reconocimiento de ABA (Loreti *et al.*, 2001), por lo que no es extraño que una proteína que use carbohidratos, como el transportador también pueda ser regulado por ABA.

Otro de los mecanismos de la regulación propuestos es que el transportador de sacarosa se fosforila y a que ha sido encontrado al menos a AtSUC5 fosforilado en un análisis de fosfoproteoma realizado en *Arabidopsis*, sin embargo a la fecha no se ha demostrado directamente la fosforilación de la proteína y su efecto en la actividad (Sauer, 2007).



IV. JUSTIFICACIÓN

Debido a que sólo pocos tejidos en las plantas sintetizan carbohidratos a partir de la fijación de CO₂, el transporte del carbono a los tejidos no fotosintetizadores (hojas jóvenes, raíces, flores y frutos) es esencial. En los embriones de maíz sabemos que el tejido que provee de carbono durante la germinación es el escutelo, mientras que el tejido que demanda esté carbono es el eje embrionario, tejido que se convertirá en la nueva planta.

En el maíz existe un único transportador de sacarosa (ZmSUT1) (Aoki et al., 1999), este transportador influye en el cargado del floema, ya que la supresión del gen produce un aumento en la concentración de sacarosa en la hoja, reduce el número de raíces y el crecimiento general de la planta se disminuye (Slewinski *et al.*, 2009), la viabilidad de estas plantas sugiere la existencia de otros sistemas de transporte de sacarosa adicional al del transportador ZmSUT1.

Resultados anteriores obtenidos por nuestro grupo de trabajo demostraron la ausencia del transportador de sacarosa en el eje embrionario y su presencia en el escutelo mediante análisis por PCR y por anticuerpos específicos. Por otra parte demostramos la presencia de transportadores de hexosas tanto en el escutelo como en el eje mediante anticuerpos específicos (Gómez-Calderas, 2008; Ramírez-Verdejo, 2009). La expresión de cada uno de estos transportadores se limita al de sacarosa en el escutelo y al de hexosas en el epitelio del escutelo y en el eje embrionario, destacando la zona de la radícula, por lo que la expresión diferencial de ambos transportadores en los tejidos embrionarios debe estar finamente regulada (Ramírez-Verdejo, 2009; Zavala-Zendejas, 2001).

Por otro lado se conoce que la infección por patógenos fúngicos afecta el metabolismo y el contenido de carbohidratos en las plantas (Bacon *et al.*, 2001), siendo adecuado el uso de la infección por patógenos para estudiar la regulación



de los transportadores de carbohidratos en los embriones de maíz durante la germinación, puesto que, el desarrollo de los embriones depende de los nutrientes que estén presentes durante su crecimiento y a su vez de los factores extrínsecos como lo es el estrés por patógenos, ya que pueden alterar el metabolismo del maíz e inhibir su crecimiento hasta llevarlo a la muerte.

Resultados previos en el laboratorio han mostrado que la infección del embrión de maíz con el hongo *Fusarium verticillioides* aumenta el porcentaje de germinación a partir de las 18 h, provoca un aumento en la tasa metabólica e incrementa el nivel de dos transcritos para los transportadores de carbohidratos el ZmSUT y ZmHT (clona parcial clonada en nuestro laboratorio que corresponde al transportador putativo de hexosas en maíz), todo esto se observó a tiempos cortos en los embriones infectados, ya que a tiempos prolongados de la infección (36 y 48 h) el embrión se necrosa y muere (Guzmán-Chávez 2010; Luna-Löaiza 2011).

Estos antecedentes nos plantean que probablemente al inicio de la infección por *Fusarium*, el embrión cambia su metabolismo para contender con el estrés, siendo parte de esta regulación el cambio en la toma de carbohidratos, por lo que es un modelo interesante a seguir para determinar la forma de regulación de los transportadores de carbohidratos de maíz durante situaciones de estrés, como el estrés por patógenos.

Así pues el objetivo del presente trabajo fue demostrar que la infección temprana por el hongo *Fusarium verticillioides* ocasiona un incremento en el número de transportadores de sacarosa y hexosas en las membranas plasmáticas del embrión, como medio para que la célula vegetal responda al ataque del patógeno.



V. HIPÓTESIS

El proceso de germinación de las semillas de maíz se afecta por la presencia del hongo patógeno *Fusarium verticillioides*, aumentando la transcripción de dos transportadores de carbohidratos en los embriones de maíz al inicio de la infección, entonces se espera un incremento temporalmente similar en la cantidad de los transportadores de sacarosa y hexosas en las membranas plasmáticas del embrión infectado.



VI. OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de la infección de los embriones de maíz con *Fusarium verticillioides* en los niveles de los transportadores de sacarosa y hexosas de la membrana plasmática.



VII. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar el efecto del patógeno en el crecimiento y en la integridad membranal de los embriones mediante la:

1. Medición del crecimiento radicular.
2. Determinación de la ganancia de peso húmedo (acumulación de peso húmedo).
3. Determinación del peso seco del embrión.
4. Salida de electrolitos.

2. Detección de los transportadores de hexosas y sacarosa.

1. Obtener el título de anticuerpos para detectar a los transportadores de hexosas y sacarosas en la membrana plasmática.
2. Obtener las fracciones microsomales de embriones de maíz control e infectados por el hongo.
3. Detectar a los transportadores de hexosas y sacarosa en las fracciones microsomales mediante la técnica de Inmunoréplica tipo Western.
4. Densitometría de bandas.

VIII. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Estrategia experimental.

Constituida en dos partes (Figura 10); en la **primera parte** se determinaron los efectos del patógeno en el crecimiento y la integridad membranal de los embriones, mediante la medición del crecimiento radicular, la determinación del peso húmedo y peso seco del embrión, así como la salida de electrolitos; **en la segunda parte** se detectaron a los transportadores de hexosas y sacarosa en la fracción microsomal por la técnica de Inmunoréplica tipo Western, para ello se obtuvo el título de los anticuerpos para detectar a los transportadores de hexosas y sacarosa en la membrana plasmática, se obtuvieron las fracciones microsomales de maíz control e infectados por el hongo y finalmente se realizó una densitometría de bandas para semi-cuantificar la cantidad de proteína transportadora. Para cada uno de los experimentos se utilizaron embriones control e infectados con el hongo *Fusarium verticillioides* y se realizaron al menos dos réplicas de cada ensayo al menos por triplicado.

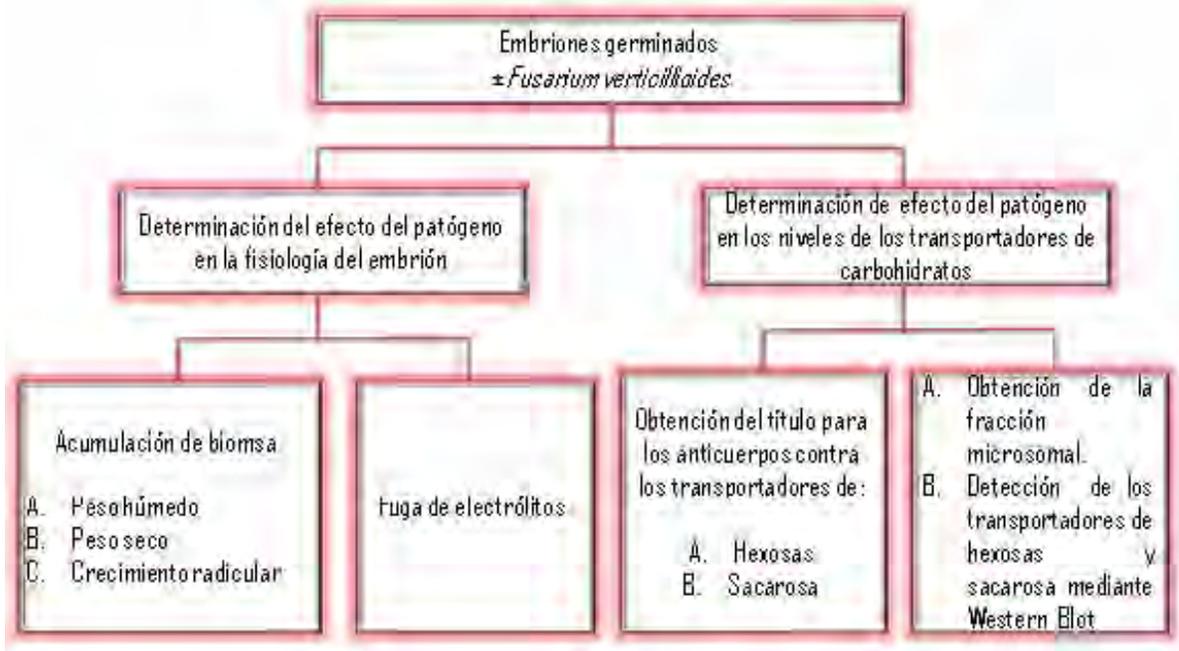


Figura 10. Esquema general del trabajo experimental.



2. Material biológico

2.1 Obtención de la suspensión concentrada de conidios.

Se utilizó un cultivo de *Fusarium verticillioides* de 3 semanas de crecimiento en una caja petri con Papa Dextrosa Agar (PDA) al 0.5X, a esta caja se le agregaron 5 mL de agua estéril desionizada, luego se agitó de manera constante y moderada durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se recolectó la suspensión de conidios en tubos de microfuga estériles de 1.5 mL, estos tubos se centrifugaron a 13 000 rpm (Spectrofuge 16M Labnet™) durante 15 min a 4°C. Posteriormente se desecharon las $\frac{3}{4}$ partes del sobrenadante y se resuspendieron los botones obtenidos, se mezclaron cada uno de los botones en un tubo de microfuga y se aforó a 1.5 mL con agua desionizada estéril. Se lavó el botón centrifugando nuevamente a 13 000 rpm (Spectrofuge 16M Labnet™) por 15 minutos a 4°C. El botón obtenido se resuspendió en 1 mL de agua desionizada estéril, obteniendo así una suspensión concentrada de conidios, a partir de la cual se realizaron las diluciones necesarias para el conteo de conidios y para la infección de los embriones.

2.2 Conteo de conidios y obtención de la dilución para infectar a los embriones.

En un tubo de microfuga de 1.5 mL se colocaron 990 μ L de agua estéril desionizada y 10 μ L de la suspensión concentrada de conidios (dilución 1:100), se tomaron 10 μ L para cargar la Cámara de Neubauer y se realizó el conteo de conidios en cada cuadrante. Con los datos obtenidos se calculó el volumen necesario de la suspensión concentrada de conidios que se necesitaba para infectar a cada embrión con 65,000 conidios. Se ajustó el volumen obtenido del cálculo anterior con agua para que al final cada embrión se bañará con 10 μ L de inóculo.



2.3 Germinación de embriones.

Se obtuvieron los embriones de maíz (*Zea mays variedad Chalqueño*) por disección manual mediante navaja. Posteriormente se lavaron con hipoclorito de sodio al 0.2% por 2 min aproximadamente, y se enjuagaron con agua estéril desionizada. Se germinaron 10 embriones o 3 g de embriones según la parte experimental a desarrollar, estos se colocaron en cajas petri con Agar al 1% y se incubaron a 29°C en oscuridad por 8, 12, 18, 24, 36 y 48 h (embriones control). Para la germinación de embriones de maíz con el patógeno *Fusarium verticillioides* (embriones infectados), se inoculó cada embrión con 10 µL de la suspensión de conidios, para posteriormente colocarlos a germinar en las mismas condiciones y tiempos que los embriones sin infectar.

3. Métodos primera parte del trabajo

3.1 Medición del crecimiento radicular.

A lotes de 10 embriones germinados por diferentes tiempos se les midió el crecimiento radicular utilizando el microscopio estereoscópico Motic Microscopes mediante el programa de procesamiento de imágenes Motic Images Plus 2.0 que se encuentra acoplado al equipo.

3.2 Determinación de la ganancia de peso húmedo y peso seco.

Lotes de 10 embriones infectados o sin infectar, se pesaron antes y después de germinar por diferentes tiempos, después fueron secados en una estufa con vacío a 60°C por 72 h. Se realizó el cálculo de la ganancia de peso húmedo, y la acumulación de peso seco de acuerdo a los siguientes cálculos:



Pf_t = peso fresco al tiempo X

Ps_t = peso seco al tiempo X

Pf_0 = peso fresco inicial

$$\text{Acumulación del peso húmedo} = \frac{Pft - Pst}{Pfo}$$

$$\% \text{ Peso seco} = 100 - \frac{Pst * 100}{Pft}$$

3.3 Salida de electrólitos.

Se utilizaron 10 embriones por cada tiempo de germinación. Inmediatamente después de cumplirse el tiempo de germinación se colocaron en aproximadamente 35 mL de H_2O desionizada y Tween 20 al 0.02%. Se leyó la lectura de la salida de electrólitos utilizando un conductímetro (CONMET 1 Conductivity tester whit ATC HANNA Instruments) cada 10 minutos hasta completar 1 h. La mezcla se mantuvo en agitación constante y moderada a lo largo de cada una de las mediciones.

4. Métodos segunda parte del trabajo

4.1 Obtención de la fracción microsomal de embriones de maíz control e infectados por el hongo.

Se utilizaron 3 g de embriones germinados, los cuales se congelaron con nitrógeno líquido y se molieron en un mortero con el pistilo hasta obtener un polvo fino. El polvo de embriones se colocó en un vaso de precipitados de 30 mL y se añadió amortiguador de homogeneización (50 mM HEPES/KOH pH 7.8, 250 mM



Sorbitol, 1 mM EDTA, 1 mM KCl, 1 mM DTT, 2 mM PMSF y 40 µg/mL de buffer de una mezcla de inhibidores de proteasas (Complete, Protease Inhibitor Cocktail Tablets, marca Roche™); el PMSF y los inhibidores de proteasas se añadieron justo antes de usarse en una relación de 2 mL de amortiguador por 1 g de tejido. Se molió por 60 segundos a 14 000 rpm con el homogeneizador de mano (TISSUE TEAROR MODEL 9852-370). Se filtraron a través de cuatro capas de gasa y el homogeneizado se centrifugó a 5000 rpm (Spectrofuge 16M Labnet™) durante 5 minutos a 4°C en una centrifuga para microtubos (Spectrofuge 16M Labnet™). Se eliminó la capa de grasa que quedó en la parte superior y se tomó con cuidado el sobrenadante. El sobrenadante se centrifugó nuevamente a 13 000 rpm (Spectrofuge 16M Labnet™) por 15 minutos, en este paso se eliminaron las mitocondrias (botón). El sobrenadante que quedó se centrifugó nuevamente pero ahora a 45 000 rpm durante 45 minutos en la centrifuga Optima™ TL. El botón obtenido se resuspendió en un volumen de 100 µL de amortiguador de resuspensión (250 mM Sorbitol, 50 mM HEPES/KOH pH 7.8, Glicerol al 10%, 2 mM DTT, 2 mM PMSF), a esta fracción se le denominó **fracción microsomal**.

4.2 Determinación de proteínas por el método de Bradford.

Se determinó la cantidad de proteína usando el método de Bradford (Bio-Rad Catalog #500-0006) usando como estándar albúmina de suero bovino.

4.3 Obtención del título de anticuerpos para detectar a los transportadores de sacarosa y hexosas en la membrana plasmática.

En un trabajo anterior (Raya-Sandino, 2011) se obtuvieron los anticuerpos contra los transportadores de hexosas y sacarosa, por inoculación de dos secuencias antigénicas ambas conjugadas con hemocianina. Se obtuvieron los sueros de dos conejos para cada anticuerpo y se precipitaron con sulfato de



amonio, solo se determinó la eficiencia de uno de los anticuerpos para un solo conejo por lo que en este trabajo se determinó el título óptimo para el total de los 4 sueros obtenidos. Para realizar la titulación de los anticuerpos, se tomó una muestra de la fracción microsomal de embriones. La titulación de los anticuerpos se realizó mediante Western Blot y en Slot Blot.

4.4 Técnica de Slot Blot

Se colocó la membrana de nitrocelulosa en medio de las dos placas que conforman al equipo (HYBRI-SLOTTMMANIFOLD MOD. 20877), se conectó al vacío y se colocaron las muestras (3 μ L proteína microsomal, 10 μ L de amortiguador de muestra para proteínas) en cada uno de los pozos. Después la membrana se bloqueó con una solución preparada con leche Svelty descremada en polvo al 5% en amortiguador TTBS (Tris/HCl 20 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 0.1%) durante 1 h, posteriormente la membrana se lavó 3 veces cada 10 minutos con amortiguador TTBS. Se cortó la membrana en tiras y a cada tira se le adicionó una cantidad distinta del primer anticuerpo (anticuerpo anti-transportador de hexosas o el anti-transportador de sacarosa). Las diluciones usadas fueron las siguientes: 1:500, 1:1000, 1:2000, 1:3000 y 1:4000 en TTBS al 1%. Las tiras se incubaron con el primer anticuerpo por toda la noche, seguido de esto se lavaron de igual manera como se indicó anteriormente, para finalmente adicionarles la solución del segundo anticuerpo (anticuerpo policlonal anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa) diluido 1:10 000 en TTBS al 1% incubando por 1 h. Se lavaron las membranas nuevamente con TTBS, para proceder al revelado de la placa fotográfica utilizando un sistema de detección luminiscente.

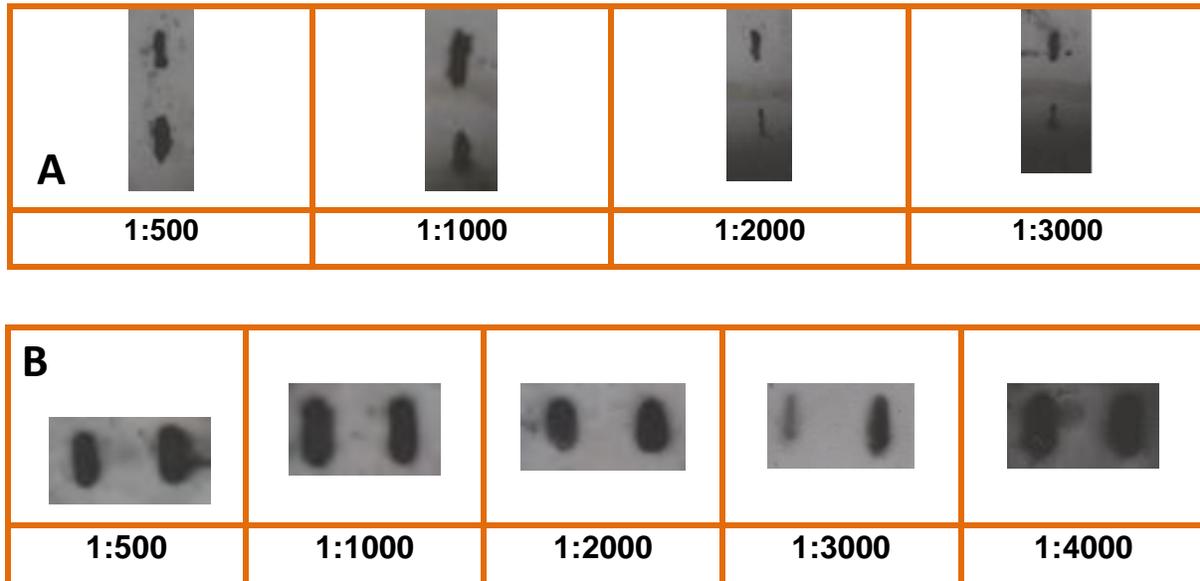


Figura 11. Titulación de los anticuerpos contra los transportadores de hexosas y sacarosa de la membrana de plasmática de plantas por la técnica de slot-blot. **A.** Reacción al anticuerpo anti-transportador de hexosas y **B.** Reacción al anticuerpo anti-transportador de sacarosa.

Por medio de la titulación (Figura 11) se encontró que los anticuerpos tanto para el anti-transportador de hexosas como para el de sacarosa, dan señal en todas las diluciones realizadas. Por ello, se probaron las diluciones 1:3000 y 1:4000 para ambos anticuerpos con una de las muestras con la finalidad de establecer la dilución de trabajo.

4.5 Técnica quimioluminiscente.

Una vez incubada la membrana de nitrocelulosa con el segundo anticuerpo y posteriormente lavada con TTBS, se le añade la solución de quimioluminiscencia (Anexo 1) suficiente para cubrir la membrana. Se elimina el exceso de reactivo y



se pone la membrana entre dos acetatos limpios y secos, para llevarlos al cassette de revelado en donde se cubre la membrana con la placa fotográfica, se cierra el cassette y se deja así por un minuto aproximadamente. Una vez culminado el tiempo, se toma la placa y se introduce en la solución de revelado (Solución reveladora, KODAK, CAT 190 1875) agitándola por unos segundos hasta que se vea la señal de las bandas, después se enjuaga con un poco de agua limpia para trasladar la placa al recipiente que contiene la solución fijadora (Solución fijadora y reforzador, KODAK, CAT 190 1895) agitándola por unos segundos hasta que adquiera una coloración grisácea. Se saca la placa y se enjuaga con agua limpia. Finalmente se deja secar la placa por unos minutos.

4.6 Técnica de Inmunoréplica tipo Western.

Se realizaron geles de poliacrilamida-SDS al 12% según la técnica de Laemmli (1970), se corrieron las fracciones microsomales de embriones infectados y/o sin infectar a los diferentes tiempos de germinación (Anexo 2). Posteriormente se realizó la transferencia de las proteínas a la membrana de nitrocelulosa en una cámara de transferencia húmeda (EBU 204) a 250 mA durante 2 h a 4°C (Anexo 3)

Una vez realizada la transferencia se lavó la membrana con TBS (Tris/HCl 20 mM, NaCl 150 mM) y se realizó el procedimiento de detección de la proteína con anticuerpos como se describió anteriormente con el slot (Figura 12).

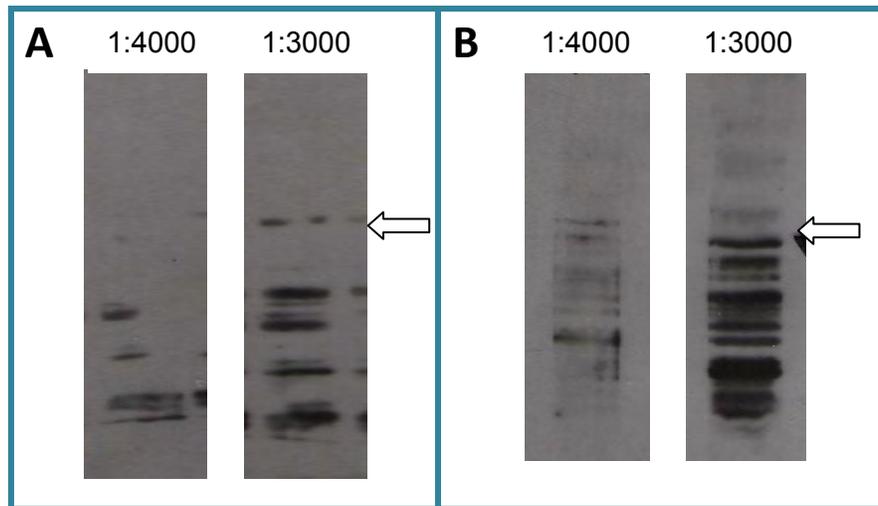


Figura 12. Titulación de los anticuerpos anti-transportador de hexosas y sacarosa mediante la técnica de Western-Blot. **A.** Detección del transportador de hexosas **B.** Detección del transportador de sacarosa.

Se encontró que la dilución óptima para trabajar es 1:3000, esto es a pesar de observar bandas de bajo peso molecular utilizamos el anticuerpo ya que si producía una banda de 55 kDa que es el peso esperado para el transportador. Posterior a ello, se procedió a trabajar con las fracciones microsomales de los embriones infectados y sin infectar para detectar a los transportadores de hexosas y sacarosa.

4.7 Densitometría de bandas.

Las imágenes de las placas fotográficas resultantes de las inmunoreplicas fueron procesadas con el equipo Fluor-STM Multimager (Bio-Rad) para realizar el análisis de la densitometría de las bandas con el software propio del equipo.



IX. RESULTADOS

A. EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL PATÓGENO EN EL CRECIMIENTO RADÍCULAR Y EN LA INTEGRIDAD MEMBRANAL DE LOS EMBRIONES DE MAÍZ

A.1 Medición del crecimiento radicular

La germinación es el resultado de diversos eventos metabólicos y celulares, y morfológicamente se observa que culmina con la emergencia de la radícula. La germinación es afectada por factores tanto ambientales (agua, oxígeno, luz, presencia de patógenos, entre otros) como por factores intrínsecos (hormonales y nutrimentales entre otros) (Bove *et al*, 2001).

Por lo anterior, se evaluó si la presencia del hongo *Fusarium verticillioides* afectaba la emergencia de la radícula y el crecimiento radicular. En la Figura 13 se muestran dos series de embriones germinados por diferentes tiempos en presencia (infectado) o ausencia (control) del hongo. Es evidente que la radícula emerge tanto en tejido infectado como no infectado y que el embrión infectado comienza a tomar una coloración morado-magenta, este pigmento que es característico de la presencia del hongo es producto del metabolismo secundario del hongo.

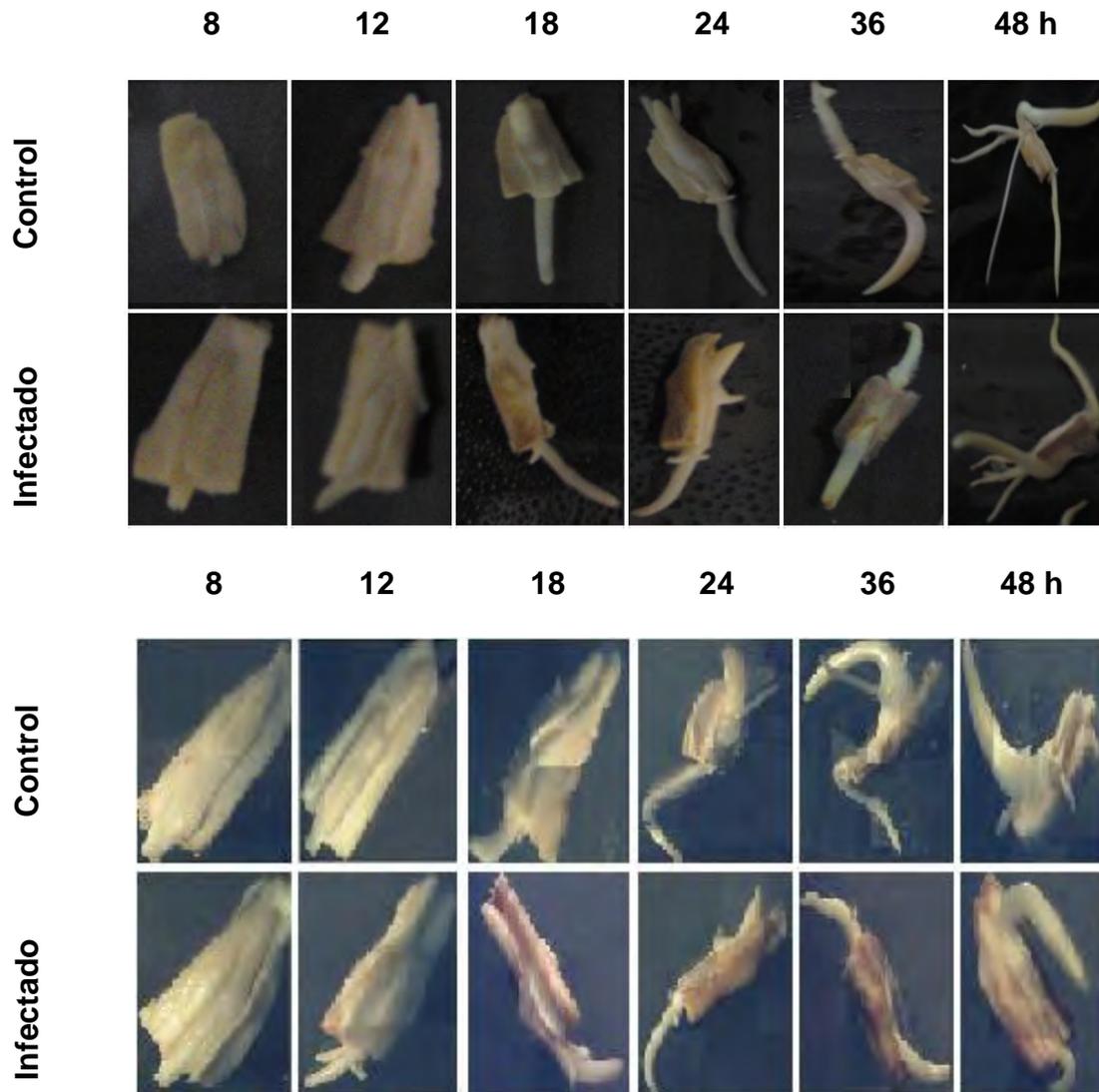


Figura 13. Efecto del patógeno *Fusarium verticillioides* en el crecimiento radicular de los embriones de maíz. a) Panel del crecimiento de la radícula en embriones control e infectados por el hongo *Fusarium verticillioides*, imágenes tomadas con cámara fotográfica. b) Panel del crecimiento radicular en embriones control e infectados por el hongo *Fusarium verticillioides*, imágenes tomadas con el microscopio estereoscópico Motic Microspores mediante el programa de procesamiento de imágenes Motic Images Plus 2.0 acoplado al equipo.

Se midió la longitud de la radícula tanto para embriones infectados como de los controles (Figura 14). Observamos que el tamaño de la radícula en los embriones control se incrementa conforme transcurre el tiempo de germinación,

siguiendo una tendencia casi lineal. Pese a que *Fusarium* es conocido como un patógeno del maíz, cuando los embriones se encuentran infectados por el hongo la emergencia de la radícula no disminuye respecto a los embriones control, es más a las 18 y 24 h de germinación es ligeramente mayor que los controles, aunque a tiempos posteriores 36 y 48 h, el crecimiento llega a ser similar al de los controles. Sugerimos que el crecimiento no continúa siendo más alto en los embriones infectados debido a que el hongo ha dañado el embrión, ya que la textura de los embriones ha cambiado, se hicieron más suaves y pegajosos.

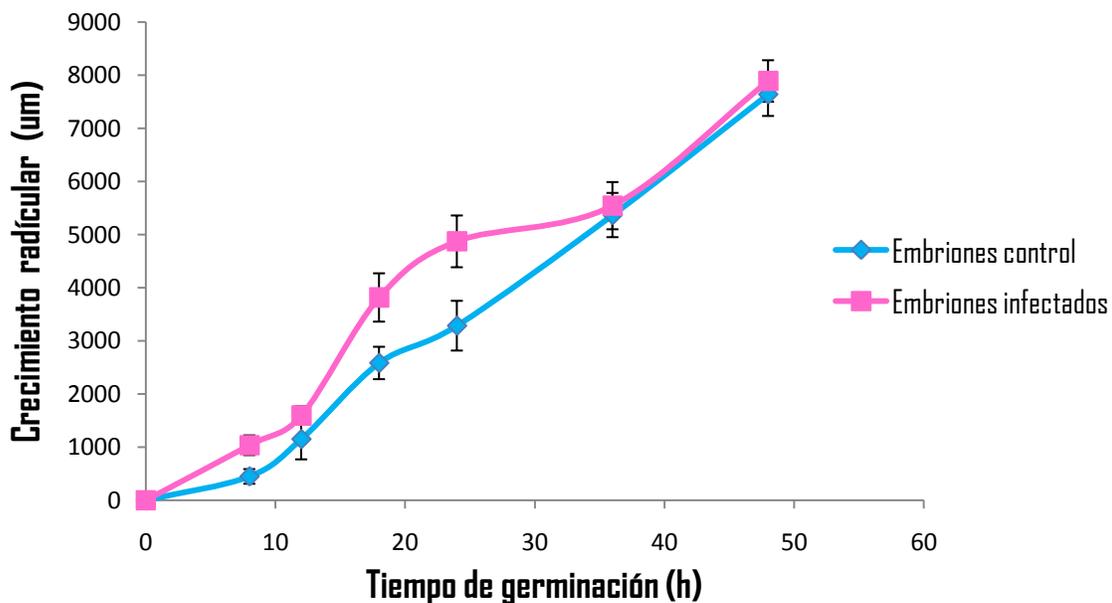


Figura 14. Efecto de la infección de los embriones con *Fusarium verticillioides* en el crecimiento radicular. Se midió el tamaño de la radícula a los diferentes tiempos de germinación con la ayuda del software de procesamiento de imágenes Motic Images Plus 2.0 acoplado al equipo del microscopio estereoscópico Motic.

A.2 Determinación de la ganancia de peso húmedo

Debido a que encontramos un ligero aumento en el crecimiento de la radícula, analizamos el efecto que el hongo produjo en la ganancia de agua por el



embrión así como en la acumulación de peso seco, parámetros que podrían indicar si efectivamente el hongo mejoraba el crecimiento del embrión.

La curva de toma de agua tanto para embriones control como para embriones infectados fue similar en cuanto tendencia, logramos apreciar las tres fases de la toma de agua características de la germinación (Bewley y Black, 1994), es decir, ambas curvas presentaron una acumulación de agua alta al inicio de la germinación para posteriormente reducir la velocidad de toma de agua. Pero destaca que los embriones infectados presentaron por un tiempo más prolongado la velocidad alta de toma de agua, esto fue hasta las 18 h, mientras que los controles redujeron su velocidad 6 h antes (Figura 15A). El aumento en la toma de agua en los embriones infectados explicaría el adelanto en la emergencia de la radícula, ya que al hidratarse más rápidamente el metabolismo de la célula se activa (Figura 14).

Al determinar la acumulación de peso seco se observa que tanto los embriones sin infectar como los infectados, se encuentran formando más biomasa ya que el peso seco del embrión se acumula conforme avanza la germinación, tendencia esperada y ya reportada en la literatura (Bove et al., 2001). Al comparar las curvas de toma de agua con las de peso seco se observa, que a pesar de que el embrión infectado presentó una acumulación incrementada en el peso húmedo del embrión infectado, no se observa en una ganancia mayor en peso seco en el embrión infectado respecto al control (Figura 15B).

Este experimento nos sugiere que el hongo no está mejorando la germinación del embrión, pero no nos explica porqué el embrión parece continuar su crecimiento, cuando visiblemente observamos que la textura se modificó.

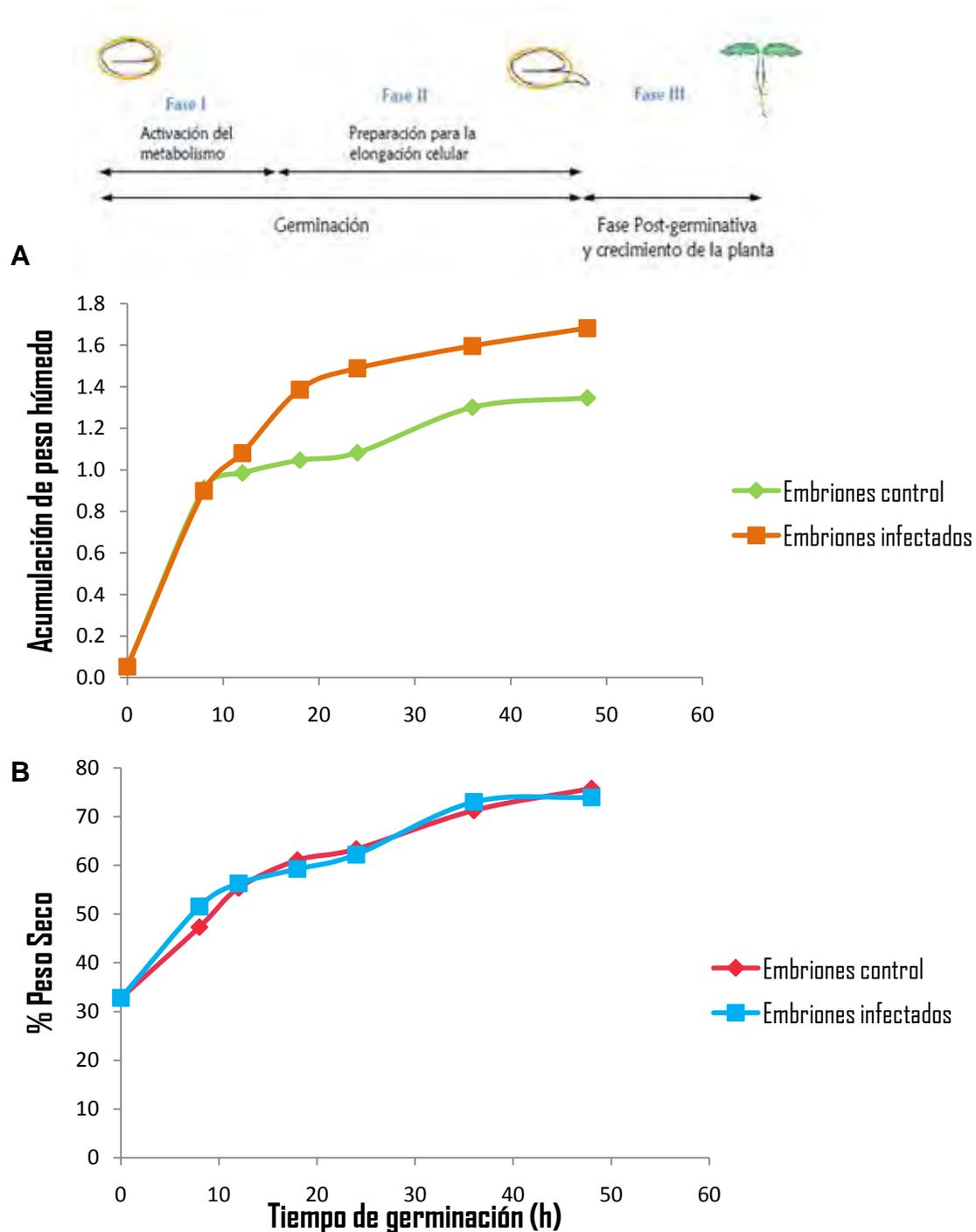


Figura 15. Curvas temporales de acumulación del peso húmedo y seco en embriones control y en embriones infectados con *Fusarium verticillioides*. **A)** Acumulación de peso húmedo y **B)** Porcentaje de ganancia en peso seco. Se utilizaron 3 lotes de 10 embriones de infectados y control, los cuales se pesaron antes y después de ser germinados, posteriormente se secaron durante 72 h a 60°C con vacío y se pesaron nuevamente los embriones. Se realizaron los cálculos según se indicó en materiales y métodos.



A.3 Salida de electrólitos

Para evaluar si existía daño en el tejido embrionario durante su germinación en presencia del hongo, monitoreamos la salida de electrolitos a los diferentes tiempos de germinación (Figura 16).

Se conoce que la salida de electrolitos de la semilla o en este caso de los embriones sanos o control es alta al inicio de la germinación y va decreciendo conforme aumenta el tiempo de germinación (Figura 16A). Es evidente que los embriones al tiempo cero tienen una permeabilidad incrementada ya que la salida de electrolitos es al menos el doble que a las 8 h de germinación. A las 8 h se observa que la salida de electrolitos es menor y a tiempos posteriores de la germinación la salida de electrolitos es más baja que la de 8 h y prácticamente muestran curvas idénticas de salida de electrolitos (12, 18, 24, 36 y 48 h).

La disminución en la salida de electrolitos del embrión se debe a que la membrana plasmática que inicialmente presentaba una fase muy estructurada debida a la escasez de agua en el embrión seco, pasa por una transición que le permite más movilidad, que es donde se observa una salida de electrolitos alta de la semilla. Posteriormente la membrana llega a presentar la fluidez característica de la membrana y evita la salida inespecífica de los electólitos o cualquier otro compuesto intracelular, asegurando su permanencia para continuar su metabolismo y el crecimiento del embrión (Bove et al., 2001).

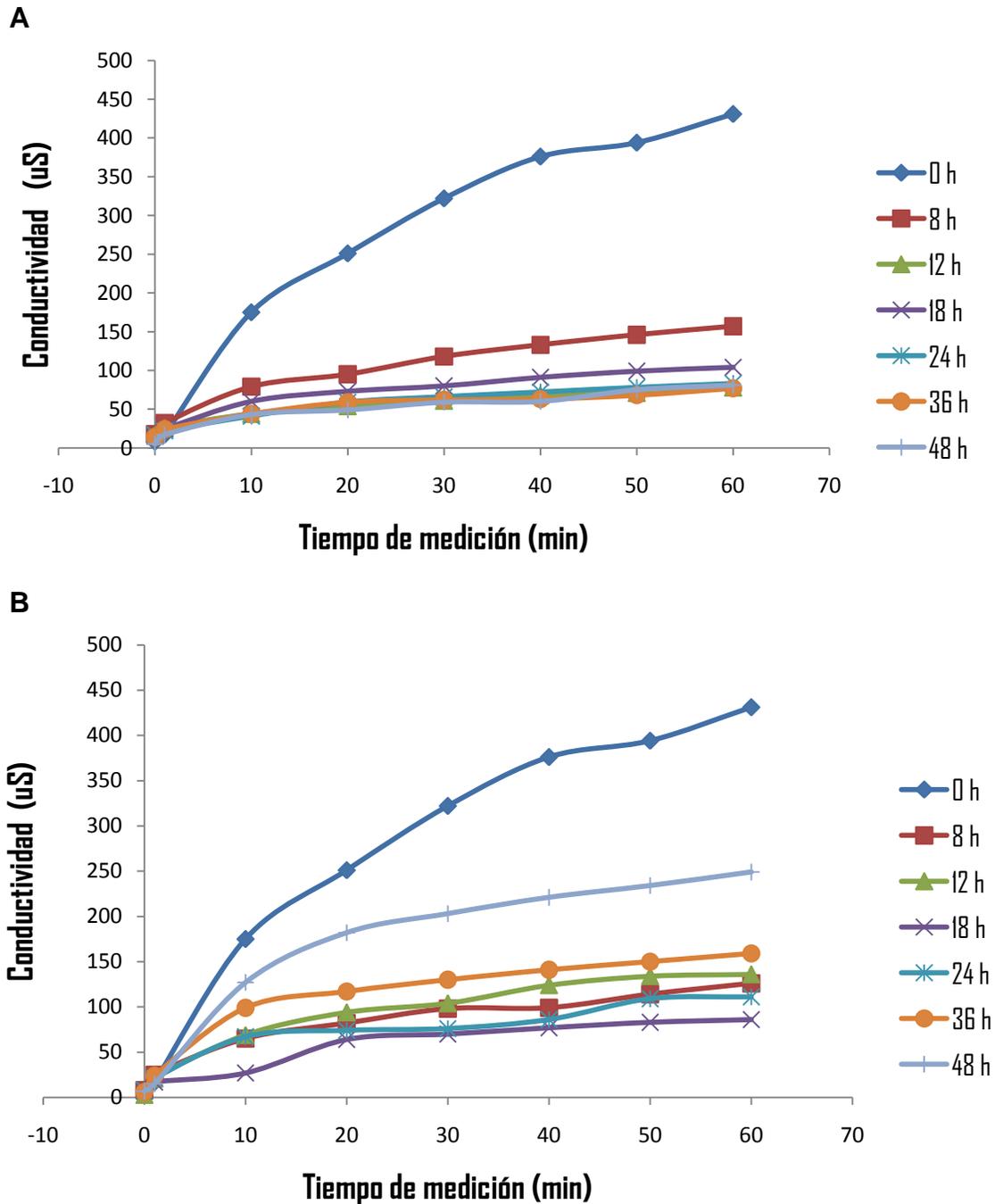


Figura 16. Curva temporal de salida de electrolitos de embriones control e infectados con el hongo *Fusarium verticillioides*. **A** Salida de electrolitos en embriones de maíz germinados sin infectar y **B** Infectados con el hongo *Fusarium verticillioides*.

Por su parte, los embriones infectados también presentan una reducción en la salida de electrolitos de las 0 h a las 8 h, sin embargo las curvas a las 12, 18 y



24 se asemejan a la curva de salida de electrolitos de los embriones control a las 8 h de imbibición (Figura 16B). Y a las 36 y 48 h es evidente que los embriones se encuentran dejando salir más electrolitos que en el tiempo de 8 h, síntoma de que el hongo ha generado daño membranal. Es de destacarse que el aumento en la salida de electrolitos coincide con los tiempos en los que observamos que los embriones son más blandos a las 36 horas.

B. DETECCIÓN DE LOS TRANSPORTADORES DE CARBOHIDRATOS

B.1 TRANSPORTADOR DE HEXOSAS

Como se demostró con los experimentos anteriores los embriones de maíz al ser infectados por el hongo patógeno *Fusarium verticillioides*, no presentan un retraso en su germinación o en la acumulación de peso húmedo, sin embargo tenemos resultados que muestran la afección por la presencia del hongo que lleva a los embriones de maíz a perder su contenido celular indicado por la salida de electrolitos.

La reactivación del metabolismo celular debida a la hidratación de los componentes celulares, así como la reestructuración de la función membranal, es evidente en tiempos cortos de la germinación. Sin embargo, se asume que el proceso germinativo es un fenómeno que involucra exclusivamente el movimiento de agua y no la de un transporte diferencial de solutos entre el tejido que recubre al eje embrionario durante su crecimiento. En nuestro laboratorio hemos encontrado que durante la germinación el eje embrionario tiene un escaso



transporte de sacarosa, aunque si un transporte importante de hexosas, a pesar de que su actividad de ATPasa (bomba primaria) es similar tanto en el eje embrionario como en el embrión completo. Lo anterior indica que si hay un movimiento diferenciado de solutos en los tejidos embrionarios de la semilla de maíz y a su vez el establecimiento en el transporte diferencial en cada tejido debe ser sujeto de una regulación estricta.

En los experimentos realizados en el laboratorio usando el mismo modelo experimental, se demostró que al inicio de la germinación se incrementa la transcripción del transportador de hexosas y del transportador de sacarosa de maíz en presencia del hongo *Fusarium verticillioides* (Guzmán-Chávez, 2010), sin embargo desconocemos si esto se traduce en un incremento en la cantidad de estas proteínas. El aumento en los transportadores de carbohidratos aumentaría la entrada de carbohidratos al tejido embrionario para favorecer su crecimiento, como una medida de mantener su desarrollo para contender con el estrés biótico al que se encuentra sometido el tejido.

Por lo anterior, era importante determinar si efectivamente la cantidad de proteína transportadora se incrementaba al inicio de la germinación en presencia del hongo. Para lo cual se utilizaron anticuerpos específicos para detectar a los transportadores de hexosas y sacarosa de la membrana plasmática de los embriones. Se obtuvieron las fracciones microsomales de los embriones control e infectados, se separaron las proteínas en geles de poliacrilamida-SDS y se realizó la inmunoréplica tipo Western de las proteínas (Figura 17).



El resultado obtenido de la inmunoréplica tipo Western de las fracciones microsomales de embriones control germinados a los diferentes tiempos, muestra que al inicio de la germinación hay una mínima cantidad de transportador de hexosas al tiempo cero, y se encuentran bandas por debajo del peso molecular esperado para el transportador que es de aproximadamente 55 kDa (Figura 17B), que podrían ser producto de proteólisis, a pesar de haber utilizado un cocktail de inhibidores de proteasas. Cabe mencionar que en todas las preparaciones de membranas que se obtuvieron de los embriones del tiempo cero se encontraron estas bandas adicionales.

Al hidratar al embrión control ya se observa la banda en el peso molecular esperado, si bien en una cantidad baja pero que permanece casi constante hasta las 24 h, después de este tiempo hay un incremento de la banda para el transportador de hexosas a las 36 y 48 h. Se realizó la densitometría de la banda de 55 kDa detectada con el anticuerpo y se observa que la cantidad de proteína en los embriones no infectados es mayor a tiempos posteriores a las 24 h 4 veces más que el tiempo cero y 2 veces más que entre las 8 y 18 h (Figura 17C).

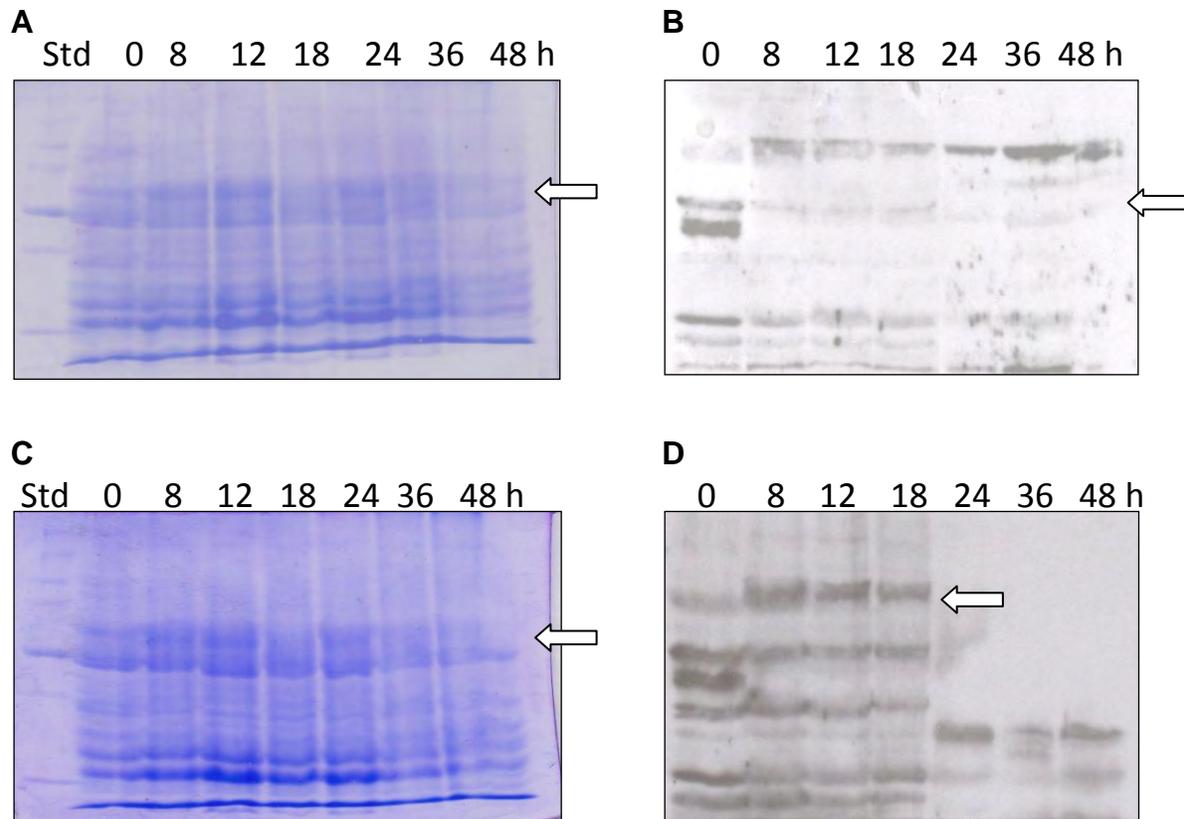


Figura 17. Detección del transportador de hexosas en fracciones microsomales de embriones de maíz germinados en presencia o ausencia del hongo *Fusarium verticillioides*. **A.** Gel de poliacrilamida-SDS teñido con azul de Coomasie en donde se presenta la separación de las proteínas de las fracciones microsomales de embriones de maíz sin infectar germinados durante diferentes tiempos. **B** Inmunoréplica tipo Western de un gel similar al que se presenta en el panel A, la banda de interés se detectó al usar el anticuerpo contra el transportador de hexosas de membrana plasmática. **C.** Gel de poliacrilamida-SDS teñido con azul de Coomasie que presenta la separación de las proteínas de las fracciones microsomales de embriones de maíz infectados con *Fusarium verticillioides* y **D** Inmunoréplica tipo Western de un gel similar al que se presenta en el panel C, la banda de interés se detecto al usar el anticuerpo contra el transportador de hexosas de membrana plasmática.

En cuanto de las fracciones microsomales de los embriones infectados con *Fusarium verticillioides*, se aprecia que al tiempo 0 h hay una cantidad mínima de transportador detectado, y que a los tiempos de 8, 12 y 18 h hay un aumento



considerable del transportador de hexosas, mismo que ya no es detectado a las 24, 36 y 48 h de la germinación (Figura 17D).

Como se muestra en las figuras 17 B y D, el anticuerpo utilizado (anti-transportador de hexosas) no solo detecta a nuestra banda de interés, esto puede deberse a que no es tan específico para el transportador, ya que, se detectaron varias bandas en las membranas de nitrocelulosa, no obstante lo anterior, hay que resaltar que en los controles (embriones sin infectar) la intensidad y cantidad de las bandas detectadas de bajo peso molecular es baja en los embriones sin infectar, mientras que es mayor en los embriones infectados. Lo anterior sugiere que desde las 8 h de la infección de los embriones está ocurriendo la proteólisis debida a la infección y que lleva a que a las 24 h ya no se tenga suficiente proteína completa como para ser detectada por el anticuerpo (Figura 18C).

Guzmán-Chávez (2010) encontró que aumentaban los niveles de transcrito para el transportador de hexosas a las 12 h de germinación, aumento que probablemente el embrión produce para no disminuir su toma de hexosas, ya que el hongo produjo la degradación de su proteína membranal.

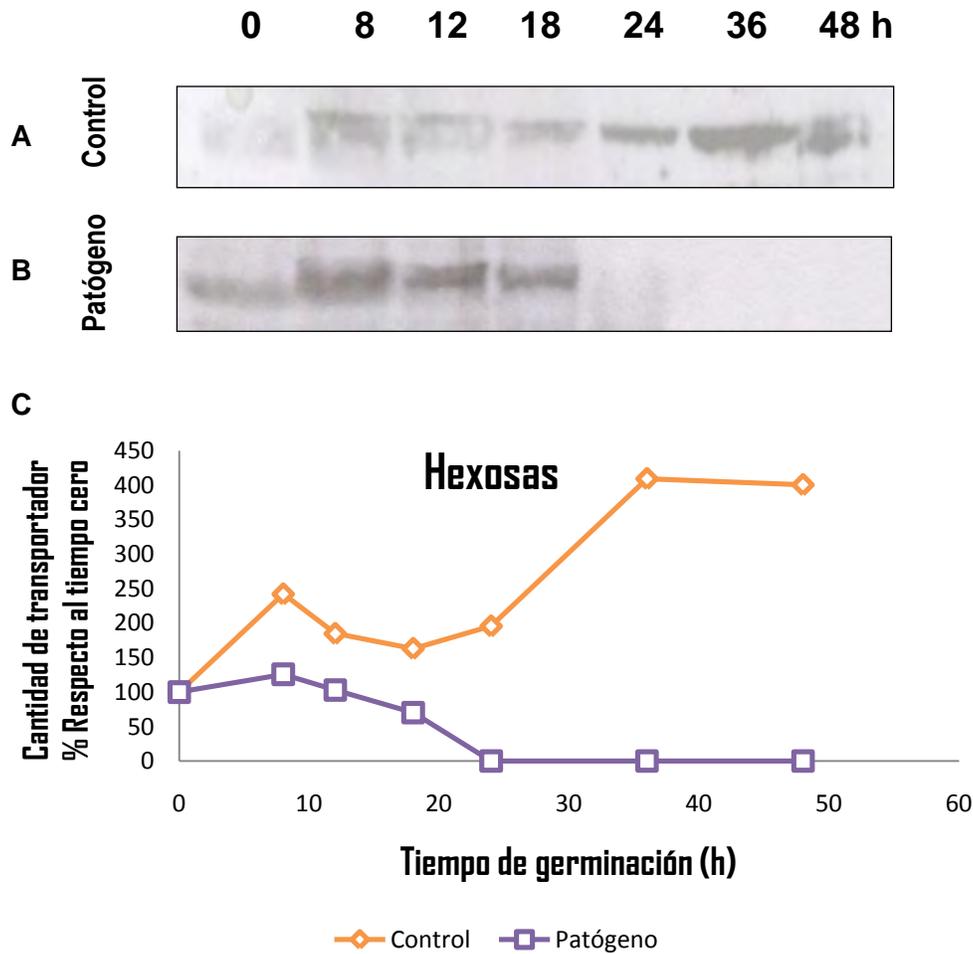


Figura 18. Efecto de *Fusarium verticillioides* en la cantidad de transportador de hexosas de los embriones de maíz. A. Banda de 55 kDa detectada con el anticuerpo anti- transportador de hexosas de la membrana plasmática en los embriones control, **B.** y en los embriones infectados con *Fusarium verticillioides*. **C.** Densitometría de las bandas presentadas en los paneles A y B.

B.2 TRANSPORTADOR DE SACAROSA

Se realizó un experimento similar al anterior, la inmunoréplica tipo Western de las fracciones microsomales de embriones control germinados en presencia y ausencia del patógeno, pero ahora se utilizó el anticuerpo anti-transportador de

sacarosa de la membrana plasmática para detectar la presencia del transportador (Figura 19).

Lamentablemente este anticuerpo también detectó otras bandas de peso molecular diferente a la esperada para el transportador que debería encontrarse en el peso molecular entre 55 y 60 kDa (Figura 19B), pese a que en experimentos previos a este trabajo solo nos producía una banda de peso molecular (Ramírez-Verdejo, 2009), pero no realizamos la posterior purificación del anticuerpo debido a que no teníamos más péptido del que se utilizó para su producción.

Lo usamos a pesar de lo anterior y lo que encontramos en cuanto a la banda de peso aprox 55 kDa está se mantuvo prácticamente constante hasta las 24 h de la germinación y a tiempos posteriores aumenta en los embriones sin infectar con el hongo. Los datos de la densitometría así lo demuestran (Figura 20C).

En el caso de las fracciones microsomales de los embriones infectados con *Fusarium verticillioides* se aprecia que la cantidad de transportador va aumentando conforme avanza el tiempo de germinación, no obstante, a partir de las 24, 36 y 48 h de germinación ya no se detecta la banda del transportador en el peso molecular esperado, y si se intensifican las bandas de bajo peso molecular (Figura 19D).

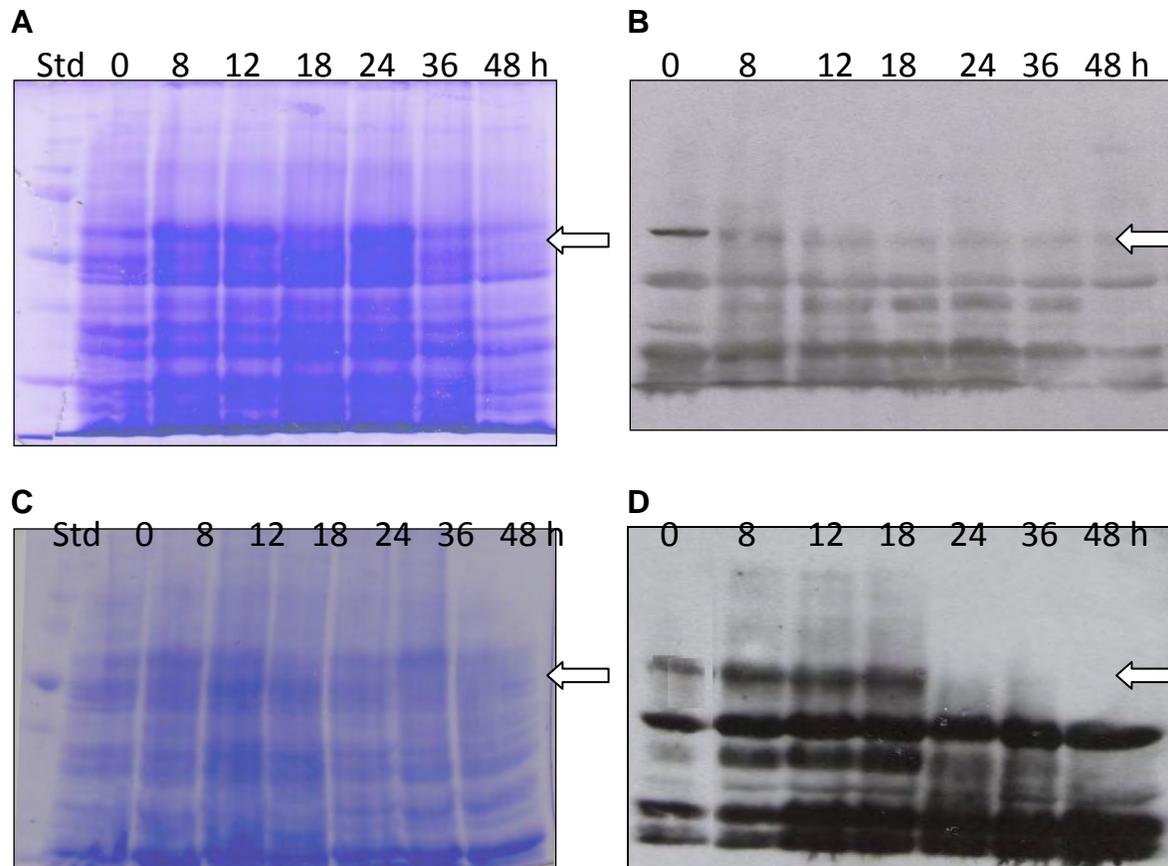


Figura 19. Detección del transportador de hexosas en fracciones microsomales de embriones de maíz germinados en presencia o ausencia del hongo *Fusarium verticillioides*. **A.** Gel de poliacrilamida-SDS teñido con azul de Coomassie en donde se muestra la separación de las proteínas de las fracciones microsomales de embriones de maíz sin infectar germinados durante diferentes tiempos. **B** Inmunoréplica tipo Western de un gel similar al que se muestra en el panel A, la banda de interés se detectó al usar el anticuerpo contra el transportador de sacarosa de membrana plasmática. **C.** Gel de poliacrilamida-SDS teñido con azul de Coomassie que muestra la separación de las proteínas de las fracciones microsomales de embriones de maíz infectados con *Fusarium verticillioides* y **D** Inmunoréplica tipo Western de un gel similar al que se muestra en el panel C, la banda de interés se detecto al usar el anticuerpo contra el transportador de sacarosa de membrana plasmática.

La comparación de las curvas de intensidad de las bandas de 55 kDa de las fracciones microsomales de embriones embebidos en presencia o ausencia del hongo demuestran claramente que el hongo aumenta la cantidad de proteína al inicio de la germinación y después de las 24 h la banda ya no es detectada por



densitometría de bandas (Figura 20C). Una explicación es que se haya detenido la *síntesis del novo* por la presencia del patógeno durante la germinación y que se incrementará la proteólisis de la proteína.

Si comparamos los resultados obtenidos con la detección del transportador de hexosas y el de sacarosa encontramos que coinciden en el tiempo en el que hay una disminución probablemente debida a la proteólisis de ambas proteínas transportadoras después de las 24 de la infección con el hongo. Es altamente probable que el hongo no solo este degradando estas proteínas sino en general a todas las que se encuentran en el embrión, ya que se conoce que el hongo tiene un tipo de vida necrotrófico (Wahl *et al.*, 2010), por lo que al final necrosa al tejido vegetal que ha invadido. Si bien es cierto que la intensidad de las bandas de bajo peso molecular no se incrementa, es posible que estos péptidos se estén utilizando para la nutrición del hongo patógeno, ya que se ha observado que durante la interacción de hongos fitopatógenos como *Uromyces fabae* (Hahn *et al.*, 1997) y *Colletotrichum graminicola* (Lingner *et al.*, 2011), hay una inducción de transportadores de aminoácidos.

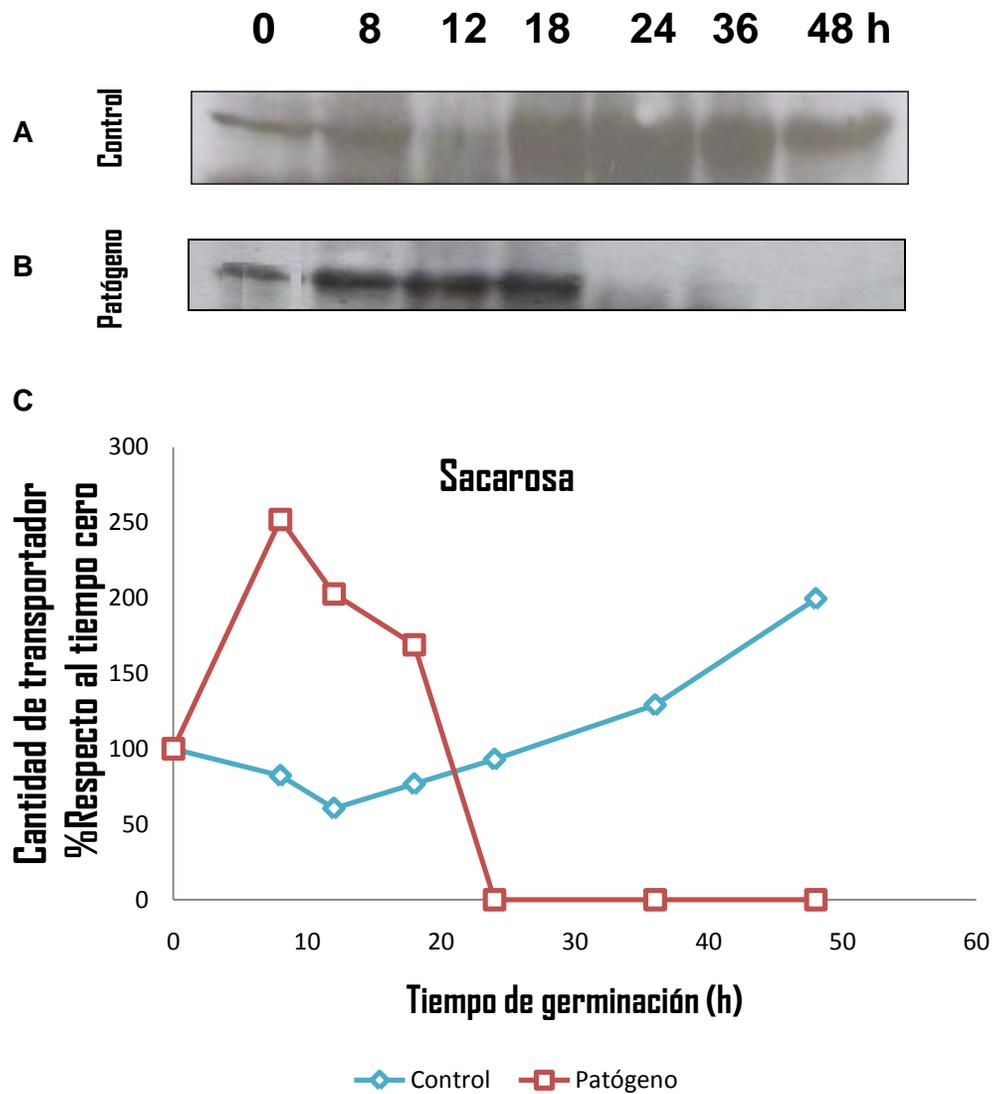


Figura 20. Efecto de *Fusarium verticillioides* en la cantidad de transportador de sacarosa de los embriones de maíz. A. Banda de 55 kDa detectada con el anticuerpo anti- transportador de sacarosa de la membrana plasmática en los embriones control, **B.** y en los embriones infectados con *Fusarium verticillioides*. **C.** Densitometría de las bandas presentadas en los paneles A y B.



X. DISCUSIÓN

A. ANÁLISIS DEL EFECTO DEL PATÓGENO EN EL CRECIMIENTO Y EN LA INTEGRIDAD MEMBRANAL DE LOS EMBRIONES DE MAÍZ

Se conoce que el hongo *Fusarium verticillioides* es un patógeno agresivo del maíz, puede infectar tanto raíces, tallos, hojas y al grano, por lo que el encontrar semillas de maíz infectadas no es raro (Munkol y Desjardins *et al.*, 1997). Mediante microscopía confocal laser se encontró que *Fusarium verticillioides* no tiene la capacidad de formar estructuras de penetración, como los apresorios, sin embargo, el patógeno tiende a buscar una herida o una fisura natural para comenzar la invasión, en el grano la fisura estilar (Ducan y Howard, 2010). Cuando no encuentra una entrada de fácil acceso, el hongo aún es capaz de invadir ya que secreta enzimas como las pectinasas, celulasas, proteasas y glucanasas que degradan los diversos componentes de la pared celular (Cantu *et al.*, 2008). Al cabo de un tiempo las enzimas generan el reblandecimiento o desestabilización de las paredes celulares del tejido y el hongo penetra.

Al realizar la evaluación del efecto de la infección por el hongo *Fusarium verticillioides* en el crecimiento radicular, observamos primero que la radícula emergía y segundo que su crecimiento en algunos tiempos era aún más rápido que el del embrión sin infectar. Lo anterior se explica si consideramos las enzimas hidrolíticas de la pared celular del hongo no solo favorece su penetración sino que como efecto colateral deja pasar más rápidamente el agua a las células embrionarias y favorece la emergencia de la radícula.

Es probable que el embrión no sea capaz por sí solo de producir la salida de la radícula en presencia del hongo, ya que se conoce que ante un estrés (biótico o abiótico) las células vegetales responden incrementando sus niveles de ABA



(Obroucheva, *et al.*, 1998), hormona vegetal que reprime la expresión de las enzimas encargadas de la degradación de la pared celular como las expansinas, pectina metil esterase, xiloglucana endotransglucosidasa, celulosa sintasa y extensinas. Durante la germinación disminuyen los contenidos de ABA y por tanto se incrementa la actividad de las enzimas anteriormente señaladas principalmente en la zona de la raíz, y propicia la salida de la radícula promoviendo la germinación (Gimeno-Gilles, *et al.*, 2009; Srivastava, 2002). Por lo que la presencia de un estrés biótico como el del hongo *Fusarium verticillioides* tendería a hacer poco favorable la germinación de la semilla. Sin embargo, al ser el hongo un productor de estas enzimas de manera indirecta promueve la germinación del embrión, pero también induce la relajación de la pared en todo el tejido vegetal, lo que explica el cambio de textura que observamos en el embrión.

Lo anterior también explica el por qué la toma de agua por el embrión infectado fue del 50% más que el control al inicio de la germinación. La entrada de agua por la semilla también supone una entrada de oxígeno que puede favorecer la oxidación de sustratos en la mitocondria (Bewley, 1997; Bove *et al.*, 2001), efecto que fue observado por Guzmán-Chávez (2010) y que nos llevó a investigar si el metabolismo (Luna-Loaiza, 2010) y el transporte de carbohidratos (Guzmán-Chávez, 2010; Zurita Villegas, 2011) se encontraba afectado cuando el hongo invade al embrión de maíz.

B. EFECTO DE LA INFECCIÓN CON EL HONGO *Fusarium verticillioides* EN LOS TRANSPORTADORES DE SACAROSA Y HEXOSAS DE LOS EMBRIONES DE MAÍZ

A pesar del incremento en el contenido de agua (este trabajo) y el consumo de oxígeno (Guzmán-Chávez, 2010), el embrión infectado no incrementa su peso seco (este trabajo) por lo que, el embrión a pesar de verse favorecido inicialmente



por la presencia del hongo, parece no estar creciendo más rápidamente para evitar la muerte de sus células.

El daño que genera el patógeno al embrión al liberar enzimas y otros metabolitos para poder penetrar y evadir la respuesta de defensa del embrión, induce cambios en la membrana celular. Se conoce que el género *Fusarium* secreta toxinas que son capaces de dañar a la célula vegetal a varios niveles una de las toxinas que produce en concentraciones altas es la fumonisina B1 (FB1). La toxina es un potente inhibidor de la actividad de la ceramida sintasa, enzima importante en el metabolismo de esfingolípidos y que se encuentra en la membrana del retículo endoplásmico. Al inhibirse la enzima se acumulan esfingosina y esfinganina y se reducen los lípidos derivados de ceramida, este desequilibrio se ha planteado como uno de los efectos tóxicos de las fumonisinas, llevando a la respuesta de muerte de las células (Soriano *et al.*, 2005). Adicionalmente, la FB1 inhibe de manera no competitiva a la ATPasa de protones de la membrana plasmática (Gutiérrez-Nájera, 2005). Por lo que también existe un desbalance a nivel membranal, y nutrimental ya que la ATPasa de protones es la bomba primaria que funciona estableciendo el gradiente electroquímico de protones necesarios para la nutrición y elongación celular, así como para el mantenimiento del pH intracelular, actividades importantes para el desarrollo de las plantas (Bove *et al.*, 2001; Bradford, 2004).

Encontramos un cambio en la permeabilidad de la membrana debida a la infección de los embriones por *Fusarium* y que evaluamos mediante la medición de la salida de los electrolitos. El incremento en la permeabilidad membranal fue evidente a las 36 h de germinación, aunque a tiempos menores también se observa que hay una ligera reducción en la permeabilidad. Es probable que a tiempos cortos de la infección el embrión aún este defendiéndose y realizando su metabolismo de manera muy activa.

Guzmán-Chávez (2010) encontró que existía un incremento en los niveles de los transportadores de hexosas y de sacarosa en maíz cuando se germinaban a los embriones en presencia del hongo *Fusarium verticillioides*. Ambos transcritos aumentaron en los embriones a las 12 horas de infección con el hongo, y a partir de las 24 h ya se encontraron debajo de su nivel normal. El transcrito para el transportador de sacarosa disminuyó aún más al aumentar el tiempo de exposición del hongo con el embrión (Figura 21).

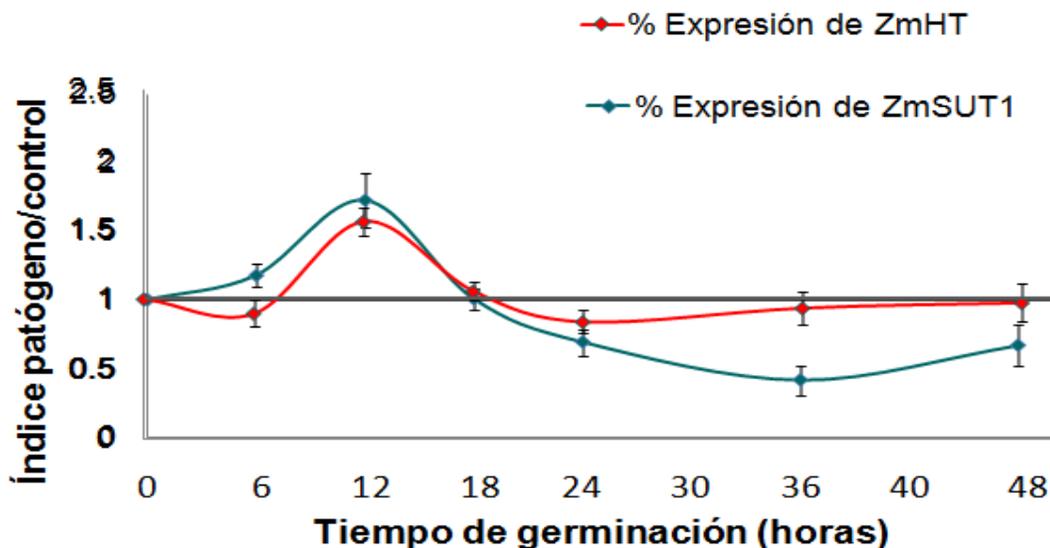


Figura 21. Comparación del índice de los niveles de transcrito de ZmSUT1 y ZmHT de embriones infectados /control. Tomado y adaptado de Guzmán Chávez, 2010

Resulta interesante que ambos transcritos para los dos transportadores de carbohidratos hayan aumentado al mismo tiempo, antes de las 24 h de infección. Por lo que en este trabajo se buscó corroborar si la proteína se estaba sintetizando e incorporando a la membrana.

Encontramos que a pesar de que el transcrito del transportador de hexosas (ZmHT) se incrementó por efecto de la infección, no se observó un aumento en el nivel de proteína sino por lo contrario disminuyó (Figura 22). Una explicación a esto, es que el anticuerpo detecta a los diferentes transportadores de hexosas presentes en las membranas de los embriones y que es altamente probable que

haya varios, mientras que el transcrito que se evaluó solo correspondería al efecto sobre una probable proteína transportadora y no de todas las posibles que puede contener la célula vegetal. La literatura reporta que los transportadores que puede tener una célula vegetal son varios, en el caso particular de *Arabidopsis thaliana* se predicen al menos 20 distintos (Büttner, 2007). Aunque en maíz hasta la fecha no se ha reportado ninguno y el que evaluamos es aquel que Gómez-Calderas logró encontrar en los embriones de maíz usando oligonucleótidos que amplifican a una secuencia con una alta homología a una proteína transportadora de hexosas de plantas (2008). En el laboratorio se están realizando esfuerzos para obtener todas las posible clonas que codifican para los transportadores de hexosas en maíz.

Experimentos en el laboratorio han corroborado que existe actividad de transporte de hexosas y sacarosa tanto en protoplastos de embriones inmaduros de maíz (Raya-Sandino, 2011), como en el tejido embrionario de maíz (Zurita-Villegas, 2011). La actividad de transporte de hexosas encontrada fue de dos tipos, difusional y activa por lo que cabría esperar al menos dos distintos tipos de transportadores de hexosas en los embriones de maíz.

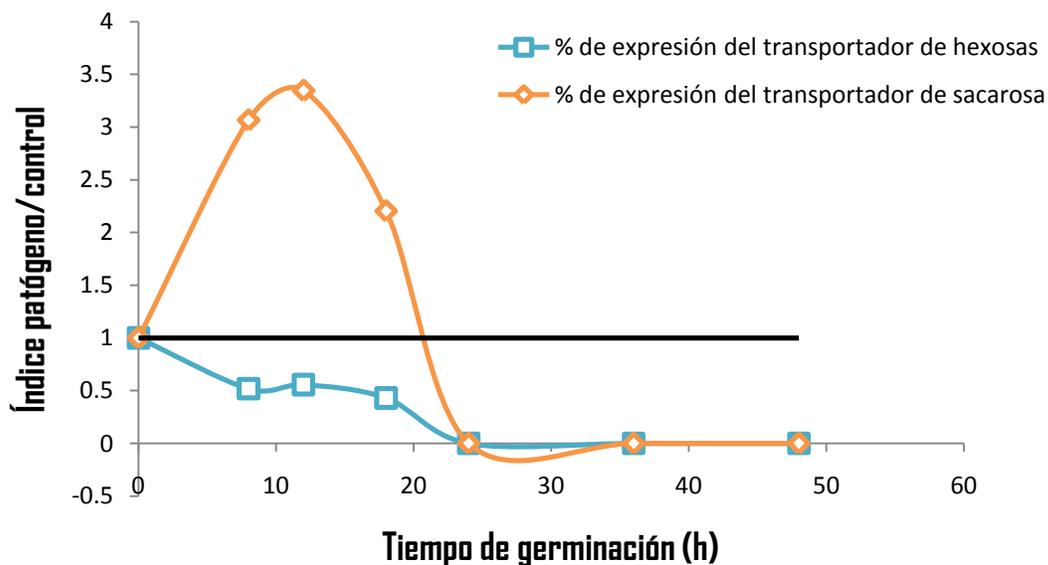


Figura 22. Comparación del índice de los niveles de los transportadores de sacarosa y hexosas patógeno/control. Se tomaron los datos de la densitometría de la banda del patógeno y se dividió entre el dato de densitometría de la banda del control, para cada tiempo de germinación.



Por otra parte, los niveles del transportador de sacarosa son altos al inicio de la germinación en presencia del hongo y la cantidad más alta de transportador se detectó a las 12 h de la infección, tiempo en el que el nivel de transcrito del transportador ZmSUT también aumentan, es posible que este sea un tiempo crítico en el desarrollo del embrión, ya que hemos observado que a las 12 h en embriones sin infectar existe una disminución de la concentración de sacarosa interna de un 80%, lo que indica que el tejido debe comenzar el importe de sustancias nutritivas de otros tejidos o bien la síntesis de sacarosa a partir de los lípidos de reserva que se encuentran en el escutelo (Martínez-Marcelo, 2008).

En maíz solo se encuentra un gene que se expresa y codifica para el transportador de sacarosa en todos los tejidos de la planta (Aoki, 1999; Lalonde et al., 2009; Sauer, 2007), lo que explica el porqué al detectar más transcrito y hay una correspondencia en un momento en la cantidad de proteína transportadora detectada con el anticuerpo.

Después de las 24 h de germinación en presencia del hongo, el panorama es distinto a nivel del transcrito para el transportador de sacarosa es menor que el control (Figura 22), mientras que la cantidad de proteína a partir de las 24 h ya no se detecta. Esta reducción en el contenido de proteína podría deberse a un aumento en la proteólisis debido a enzimas secretadas por el hongo así como enzimas que podrían ser liberadas de la vacuola, en vista de que la permeabilidad de la membrana a esos tiempos se ve comprometida.

Se conoce que durante la interacción planta microorganismo es posible que se liberen proteasas. Por ejemplo, la interacción de *Trichoderma* con raíces de pepino expresa de manera específica una proteasa de aspartilo, un homólogo de papa de *Trichoderma harzianum* y de AP1 una proteasa de *Botryotinia fuckeliana*. De hecho la producción de papa y PapB es también inducida en ensayos in vitro con pedazos de la planta colocados en placa y enfrentados con *Rhizoctonia*



solani. Lo que sugiere que las proteasas son una de las armas químicas que los microorganismos secretan para invadir a la planta (Viterbo *et al.*, 2004). Sumado a lo anterior se tiene el aumento en la expresión de transportadores de aminoácidos en los hongos cuando la infección de la planta se encuentra en progreso (Hahn *et al.*, 1997; Lingner *et al.*, 2011).

Mediante el análisis proteómico durante la interacción de *Fusarium* y avena se encontró que la principal diferencia entre el proteoma de avena sin infectar e infectado eran 9 proteínas especialmente abundantes correspondientes al hongo y 65 fragmentos proteolíticos provenientes de proteínas de plantas (Yang *et al.*, 2010). Lo anterior demuestra que el hongo produce una proteólisis abundante en el tejido vegetal.

Los nutrientes producidos por la hidrólisis de los componentes de la célula vegetal debidos a la infección son tomados por el hongo. Se conoce por ejemplo, que en *Ustilago maydis* se induce la síntesis de una proteína transportadora de sacarosa (Srt1) específica de la interacción del hongo con maíz, ya que en ausencia del tejido vegetal *Ustilago* es incapaz de sintetizar a la proteína transportadora (Wahl *et al.*, 2010). Mientras que en *Fusarium* se ha observado que para que la infección progrese en el tejido vegetal, el hongo debe inducir la expresión del gen *ftsut1*, el cual codifica para un transportador específico para sacarosa. Se desconoce que es lo que produce la inducción pero cuando se suprime el gen para el transportador la cepa es menos virulenta (Kim y Woloshuk, 2011).

En los embriones de maíz encontramos que *Fusarium* induce los transcritos para los transportadores y solo el transportador de sacarosa aumenta durante la infección, probablemente el embrión de maíz utiliza a los transportadores como una herramienta para aumentar su metabolismo como un camino para sobrevivir a la infección.



La regulación de la expresión del transportador de sacarosa se desconoce en plantas, si bien se ha planteado que el cambio en el contenido de carbohidratos podría mediar su regulación (Shiratake *et al.*, 2007). La regulación del transportador *VvHT1*, un transportador de hexosas de uva se observó que ocurrió a través del incremento en la transcripción de una cinasa inducida por carbohidratos, *VvSK1*; mientras que de manera paralela el tejido también aumentó los niveles de las invertasas de la pared celular, lo que aumentó la disponibilidad de las hexosas para el transportador de hexosas (Lecourieux *et al.*, 2010).

En levadura se ha demostrado que altas concentraciones de glucosa inhiben la transcripción del transportador de glucosa de alta afinidad e induce la transcripción del transportador de glucosa de baja afinidad y que ocurre de manera opuesta cuando hay bajas concentraciones de glucosa extracelulares (Ozcan, 1997); sin embargo, en plantas no se ha encontrado dicha regulación.

Algunos autores han sugerido que en realidad es el transportador el que impone las diferencias en concentración debido a una regulación anterior al cambio en la concentración de carbohidratos (Sauer, 2007).

Recientemente se demostró que el transportador de sacarosa de *Arabidopsis* *SUC1* presenta una caja ABRE (por sus siglas en inglés “**Ab**scisic **r**esponsive **e**lement”) que une a factores de transcripción debido al estímulo de ABA, lo que al final se traduce en la inducción de los transportadores de sacarosa (Holth *et al.*, 2002; Holth *et al.*, 2010). En algunos trabajos se ha encontrado que durante la infección por microorganismos las plantas aumentan sus contenidos de ABA, se desconoce a qué se debe el aumento y porque en algunos otros sistemas no ocurre (Hey *et al.*, 2010), pero se ha encontrado una relación positiva entre el aumento de ABA y la inducción de los transportadores de hexosas.

Por lo que la regulación de estos transportadores mediado por ABA podría ser una posibilidad interesante de estudiar en los embriones de maíz germinados con



Fusarium. Si el ABA se incrementa en lugar de reducirse durante la germinación, cuando se encuentra el patógeno podría explicar la inducción de los transcritos para los transportadores, lo que nos permitirá continuar con la búsqueda de la regulación de los transportadores de carbohidratos por hormonas.



XI. CONCLUSIONES

1. A pesar de que los niveles de los transcritos para los transportadores de sacarosa y hexosas aumentaron a las 12 h de infección con el hongo, no se encontró un aumento en el transportador de hexosas detectado por anticuerpos, aunque si se incremento el nivel del transportador de sacarosa tanto a 12 h como a 8 y 18 h de la infección del embrión.
2. El incremento en el nivel de la proteína transportadora de sacarosa podría explicar la sobrevivencia del embrión hasta las 24 h, tiempo hasta que permanece el nivel alto de proteína.
3. Los niveles de ambas proteínas transportadoras de carbohidratos (la banda de 55 kDa), no se detectan después de las 24 h, aunque si un incremento en el número de bandas de bajo peso molecular, sugerente de una proteólisis incrementada por la presencia de la infección en el embrión.
4. La disminución de la proteína de 55 kDa, así como el del nivel del transcrito y el aumento en la permeabilidad de la membrana después de las 24 h de germinación del embrión en presencia de *Fusarium*, indica un aumento en la degradación o muerte del embrión para nutrir al hongo.



XII. PERSPECTIVAS

- A. Determinar que ocasiona el incremento en el nivel de los transcritos para los transportadores de hexosas.
- i. Uno de los posibles blancos sería la modificación en los contenidos de hormonas en el embrión durante la infección. Para lo cual hay que determinar los niveles de las hormonas en los embriones en presencia del hongo y si la adición exógena modifica los niveles de los transcritos para los transportadores de carbohidratos.
 - ii. Otra posibilidad para explorar sería la expresión de cinasas que llevaran a la inducción de los transcritos para los transportadores de carbohidratos, como las SnRK.
 - iii. Determinar si la presencia de un hongo que mejora el crecimiento vegetal, es decir un microorganismo con un efecto antagónico a *Fusarium* como *Trichoderma* puede también alterar el contenido de los transportadores de carbohidratos.
 - iv. Determinar porque se elevan los contenidos del transcrito del transportador de hexosas y no los niveles de la proteína transportadora.
- B. Examinar en otro estadio del desarrollo de la planta si *Fusarium* tiene un efecto similar en la modificación de los niveles de los transportadores de carbohidratos, para determinar si la expresión no independiente del desarrollo y de la presencia de *Fusarium* o alguno de sus elicitores.
- C. Determinar si coinciden los niveles de los transcritos, de proteína y de la actividad de transporte de carbohidratos.



XIII. ANEXOS

ANEXO I. Reactivos de quimioluminiscencia

Solución A: Pesar 0.35 g de ácido p-cumárico (No. Catálogo SIGMA C9008) y disolver con 25 mL DMSO.

Solución B: Pesar 1.1 g de luminol (No. Catálogo BioChemika 09253) y disolver en DMSO hasta 25 mL

Mezcla quimioluminiscente (Preparar justo antes de utilizarse):

25 µL de solución A

50 µL de solución B

17 µL de H₂O₂

10 µL de Tris-HCl, pH 8.5

ANEXO II. Electroforesis: condiciones y reactivos

Condiciones de corrida: 10-15 mA constantes hasta que llegue a gel separador.

25 mA constante después de que el azul de bromofenol pase al gel concentrador y hasta que llegue al final del gel.

Gel separador al 12%

Stock	10 mL
30% Acrilamida: 0.8 % Bisacrilamida	4 mL
2M Tris/ HCl pH 8.8 (48.45g/200mL)	2 mL
20% SDS	50 µL
H ₂ O	3888 µL
TEMED	10 µL
10% APS (0.1g/1 mL)	120 µL



Gel concentrador

Stock	10 mL
30% Acrilamida: 0.8 % Bisacrilamida	1.32 mL
0.5M Tris/ HCl pH 6.8 (12.114g/200 mL)	1.2 mL
20% SDS	50 μ L
H ₂ O	7345 μ L
TEMED	10 μ L
10% APS	120 μ L

Amortiguador de corrida 5X. (0.25 N Tris Base; 1.9M Glicina; 0.5% SDS)

Para preparar 1L del amortiguador de corrida 5X se deben pesar las cantidades de los reactivos antes mencionados, las cuales son:

30.3285 g Tris Base

142.62 g Glicina

5g SDS

Para correr los geles de poliacrilamida al 12% se debe tener el amortiguador a una concentración de 1X, para ello medimos 200 mL del amortiguador 5X y 800 mL de H₂O, lo mezclamos bien para poder utilizarlo.

Buffer de muestra

1M Tris Base	350 μ L
20% SDS	250 μ L
1M Ditioneitol (DTT)	160 μ L
50% Glicerol	150 μ L
Azul de bromofenol (20%)	20 μ L
H ₂ O	70 μ L



ANEXO III. Electrotransferencia: condiciones y reactivos.

Condiciones de transferencia. 2 h a 250 mA a 4°C con un amortiguador de transferencia (15 mL 1M NaPO₄ pH 6.8; 2.5 mL SDS 20%; 200 mL Metanol; 787.5 mL H₂O)



XIV. REFERENCIAS

- Aoki, N., Hirose, T., Takahashi, S., Ono, K., Ishimaru, K., Ohsugi, R. 1999. Molecular cloning and expression analysis of a gene for a sucrose transporter in maize (*Zea mays* L.). *Plant Cell Physiology* 40: 1072-1078.
- Bacon, C.W., Yates, I.E., Hinton, D.M., Filmore, M. 2001. Biological control of *Fusarium moniliforme* in maize. *Environment and Health Perspectives* 109: 325-343. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1240683>
- Bakan, B., Melcion, D., Richard-Molard, D., Cahagnier, B., 2002. Fungal growth and *Fusarium* mycotoxin content in isogenic and traditional maize and modified maize grown in France and Spain *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 13:728-731.
- Basurto-Sotelo M., Barrios-Núñez A., Pérez-Leal R. y Hernández-Rodríguez O.A., 2008. Fisiología del estrés ambiental en plantas. Facultad de Ciencias Agrotecnológicas, Universidad Autónoma de Chihuahua. Synthesis 48.
- Benavides, M.A., 2002. Ecofisiología y química del estrés en plantas, Departamento de agricultura, Facultad de Ciencias Agrotecnológicas, Universidad Autónoma de Chihuahua.
- Bewley, D., 2001. Plant storage products (carbohydrates, oils and proteins). *Encyclopedia of Life Sciences* 1, 1-8.
- Bewley, D., 1997. Seed germination and dormancy. *Plant Cell*, 9: 1055-1066.
- Bewley, D., Black, M., Halmer, P. 2006. The encyclopedia of the seeds: Science, technology and uses. Cromwell Press. 21 pp.



- Bluhm B.H., Kim H., Butchko A.E., Woloshuk C.P. 2008. Involvement of ZFR1 of *Fusarium verticillioides* in kernel colonization and the regulation of FST1, a putative sugar transporter gene required for fumonisin biosynthesis on maize kernels. *Molecular Plant Pathology* 203–211.
- Boorer K.J., Loo Donald D.F., Frommer W.B., Wright E.M. 1996. Transporter mechanism of the cloned potato H⁺/Sucrose cotransporter StSUT1. *Journal of Biological Chemistry* 271, 25139–25144.
- Bove, J., Jullien, M., Grappin, P. 2001. Functional genomics in the study of seed germination. *Genome Biology*, 3, 1002.1-1002.5.
- Bradford, K.J. 2004. Germination: imbibitions, activation and reserve mobilization. In *seed Production and Quality*: 85-94 pp.
- Braun, D.M, Slewinski, T.L. 2009. Genetic control of carbon partitioning in grasses: Roles of sucrose transporters and tie-dyed loci in phloem loading. *Plant Physiology*, 149: 71–81,
- Bush, B.J. 2001. *Fusarium verticillioides* infection, fumonisin contamination and resistance evaluation in North Carolina maize. Thesis for the degree of Master of Science. Faculty of North Carolina State University. USA. 7-19 pp.
- Büttner, M. 2007. The monosaccharide transporter (-like) gene family in *Arabidopsis*. *FEBS Letters* 581, 2318–2324
- Büttner M., Sauer N., 2000. Monosaccharide transporters in plants: structure, function and physiology. *Biochimica et Biophysica Acta* 1465:263-274.



- Carpaneto, A., Geiger, D., Bamberg, E., Sauer, N., Fromm, J., Hedrich, R. 2005. Phloem-localized, proton-coupled sucrose carrier ZmSUT1 mediates sucrose efflux under the control of the sucrose gradient and the proton motive force *Journal of Biological Chemistry* 280: 21437-21443.
- Catalogue of life, Febrero 2011. Taxonomía del género *Fusarium*. <http://www.catalogueoflife.org/details/species/id/5893982>
- Cheng W.H., Chourey P.S. 1999. Genetic evidence that invertase-mediated release of hexoses is critical for appropriate carbon partitioning and normal seed development in maize. *Theoretical and Applied Genetics* 98: 485-495.
- Delrot, S., Atanassova, R., Gomés, E., Coutos-Thévenot, P. 2001. Plasma membrane transporters: A machinery for uptake of organic solutes and stress resistance. *Plant Science* 161: 391-404.
- Desai, K., Sullards, M.C., Allegood, J., Wang, E., Schmelz, E.M., Hartl, M., et al. 2002. Fumonisin and fumonisin analogs as inhibitors of ceramide synthase and inducers of apoptosis. *Biochimica et Biophysica Acta* 1585: 188-92.
- Doctor Fungus. Marzo 2011. *Fusarium* spp. <http://www.doctorfungus.org/>,
- Duncan, K.E., Howard, R.J. 2010. Biology of maize kernel Infection by *Fusarium verticillioides*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 23: 6-16.
- Eastmond, P.J., Graham, I.A., 2001. Re-examing the role of the glyoxylate cycle in oilseeds. *Trends Plant Sci.* 6: 72-78.



- Eastmond, P.J., Germain, V., Large, P.R., Bryce, J.H., South, S.M., Graham, I.A. 2000. Postgerminative growth and lipid catabolism in oilseeds lacking the glyoxylate cycle. *Proceedings of the National Academy Science of the United States of America* 97: 5669-5674.
- Finkelstein, R.R., Lynch, T.J. 2000. The Arabidopsis abscisic acid response gene *ABI5* encodes a basic leucine zipper transcription factor. *Plant Cell*, 12: 599-610.
- Food and Agriculture Organization (FAO), 1993. El maíz en la nutrición humana. <http://www.fao.org/docrep/t0395s/T0395S00.htm>
- GeoChembio, Zea mays kernel anatomy, Estructura de la semilla del maíz, Marzo 2011. <http://www.geochembio.com/biology/organisms/maize/>
- Gómez-Calderas, A. 2008. Regulación de la expresión de los transportadores de carbohidratos en la germinación de maíz. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM.
- Guo-Qing, T., Lüscher, M., Sturm, A. 1999. Antisense repression of vacuolar and cell wall invertase in transgenic carrot alters early plant development and sucrose partitioning. *Plant Cell* 11:177-189.
- Grass phylogeny working group, Taxonomía del maíz, Marzo 2011. <http://www.virtualherbarium.org/grass/,2003>.
- Gutiérrez-Nájera, N., Muñoz-Clares, R.A., Palacios-Bahena, S., Ramírez, J, Sánchez-Nieto, S., Plasencia, J., Gavilanes-Ruíz, M. 2005. Fumonisin B1, a sphingoid toxin, is a potent inhibitor of the plasma membrane H⁺-ATPase. *Planta* 221: 584-596.



- 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.
- Hahn, M., Neef, U., Struck, C., Göttfert, M., Mendgen K. 1997. A putative amino acid transporter Is specifically expressed in haustoria of the rust fungus *Uromyces fabae*. *Molecular Plant Microbe Interactions* 10, 438-445.
- Hayes, M.A., Byrne, E., Halford, N.G. 2010. Involvement of abscisic acid in the coordinated regulation of a stress-inducible hexose transporter (VvHT5) and a cell wall invertase in grapevine in response to biotrophic fungal infection. *Plant Physiology* 153: 211-221.
- Hey, S.J., Byrne, E., Halford, N.G. 2010. The interface between metabolic and stress signaling. *Annals of Botany* 105: 197-203
- Hoth, S., Morgante, M., Sanchez, J.P., Hanafey, M.K., Tingey, S.V., Chua, N.H. 2002. Genome-wide gene expression profiling in *Arabidopsis thaliana* reveals new targets of abscisic acid and largely impaired gene regulation in the *abi1-1* mutant. *Journal of Cell Science* 115: 4891-4900.
- Hoth, S., Niedermeir, M., Feuerstein, A., Horning, J., Sauer, N. 2010. An ABA-responsive element in the *AtSUC1* promoter is involved in the regulation of *AtSUC1* expression. *Planta* 232: 911-923.
- Kim, H., Woloshuk, C.P. 2011. Functional characterization of *fst1* in *Fusarium verticillioides* during colonization of maize kernel. *Molecular Plant Microbe interaction* 24: 18-24.
- Kühn, C., Franceschi, V.R., Bürkle, L., Frommer, W.B. 1999. Update on sucrose transport in higher plants. *Journal of Experimental Botany* 50: 935-953



- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
- Lalonde, S., Boles, E., Hellmann, H., Barker, L., Patrick, J.W., Frommer, W.B., Ward, J.M. 1999. The dual function of sugar carriers: transport and sugar sensing. *Plant Cell* 11: 707-726.
- Lalonde, S., Wipf, D. Frommer, W.B. 2004. Transport mechanisms for organic forms of carbon and nitrogen between source and sink. *Annual Review of Plant Biology* 55: 341-372.
- Lecourieux, F., Lecourieux, D., Vignault, C., Delrot, S. 2010. A sugar-inducible protein kinase, VvSK1, regulates hexose transport and sugar accumulation in grapevine cells. *Plant Physiology* 152:1096-1106.
- Lingner, U., Münch, S., Deising, H.B., Sauer, N. 2011. Hexose transporters of a hemibiotrophic plant pathogen: functional variations and regulatory differences at different stages of infection. *Journal of Biological Chemistry* 286: 20913-20922.
- López-de Uralde J. 2009. Los transgénicos amenazan la diversidad del maíz- Caricatura de una planta madura y fruto del maíz. Marzo 2011.<http://www.elmundo.es/elmundo/2009/02/18/verde/1234986215.html>.
- Loreti, E., DeBellis, L., Alpi, A., Perata, P. 2001. Why and how do plant cells Sense sugars? *Annals of Botany* 88: 803-812.
- Lu, J.M., Bush, D.R., 1998. His-65 in the proton-sucrose symporter is an essential amino acid whose modification with site-directed mutagenesis increase transport activity. *Proceedings of the National Academy Science of the United States of America* 95: 9025-9030.



- Luna-Löaiza V. 2011. Efecto de *Fusarium verticillioides* sobre el metabolismo de carbono en embriones germinados de maíz. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM.
- Martínez-Marcelo V. 2008. Expresión de la actividad de las invertasas ácidas en la germinación de tejido embrionario de maíz en carbohidratos metabolizables y su relación con el contenido de carbohidratos. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM.
- Méndez-Albores, A., Moreno-Martínez, E., 2009. Las micotoxinas: contaminantes naturales de los alimentos. Ciencia pp. 1-7.
- Munkvol, G.P, Desjardins, A.E. 1997. Fumonisin in maize can we reduce their occurrence?. *Planta Disease*. 81 (6): 556-565.
- Nelson, P.E., Dignani, C., Anaissie, E.J. 1994. Taxonomy, biology, and clinical aspects of *Fusarium* species. *Plant Pathology* 7: 479-504.
- Nonogaki, H. 2008. Seed germination and reserve mobilization, *Encyclopedia of life sciences (ELS)*. Doi: 10.1002/9780470015902.a0002047.pub2.
- 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* 69: 1695-1701.
- Paredes, L., Guevara, L., Bello, P., 2006. Los alimentos mágicos de las culturas indígenas mesoamericanas, México. Fondo de cultura económica, 212: 68-92.



- Pitchard, S.L., Charlton, W.L., Baker, A., Graham, I.A., 2002. Germination and storage reserve mobilization are regulated independently in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 31: 639-647.
- Quettier, A.L., Eastmond, P.J., 2009. Storage oil hydrolysis during early seedling growth. *Plant Physiology and Biochemistry* 47: 485-490.
- Ramakrishna, V., Ramakrishna-Rao, P. 2005. Axial control of protein reserve mobilization during germination of indian bean (*Dolichos lablab L.*) seeds. *Acta Biologica Szegediensis* 49:23-27
- Ramírez-Sóstenes, J.L. 2008. Alteraciones en el metabolismo de carbono durante priming natural de semillas de *Opuntia tomentosa*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM.
- Ramírez-Verdejo, S.A. 2009. Detección in situ de la expresión diferencial de los transportadores de azúcares en los tejidos embrionarios de maíz y su posible regulación por carbohidratos. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM.
- Raya-Sandino, J.A. 2010. Caracterización bioquímica del transporte de glucosa en tejido embrionario de maíz. Tesis de licenciatura de la carrera de Químico Farmacéutico Biólogo.
- Roitsch, T. 1999. Source-sink regulation by sugar and stress. *Plant Biology* 2: 198-206.
- Sauer N. 2007. Molecular physiology of higher plant sucrose transporters. *FEBS Letters* 581: 2309–2317.



- Shim, W.B., Flaherty, J.E., Woloshuk, C.P. 2003. Comparison of fumonisin B-1 biosynthesis in maize germ and degermed kernels by *Fusarium verticillioides*. *Journal of Food Proteins* 66: 2116-2122.
- Shiratake K. 2007. Genetics of sucrose transporter in plants. *Genes, genomes and genomics*. 1 (1): 73-80.
- Slewinski, T.L., Meeley, R., Braun, D.M., 2009. Sucrose transporter1 functions in phloem loading in maize leaves. *J. Exp. Bot.* 60: 881-892.
- Smith, A.M., Zeeman, S.C., Smith SM. 2005. Starch degradation. *Annual Review of Plant Biology* 56:73–98.
- Soriano, J.M., González, L., Catalá, A.I. 2005. Mechanism of action of sphingolipids and their metabolites in the toxicity of fumonisin B1. *Progress in Lipid Research* 44, 345-356
- Srivastava L.M. 2002. Seed germination, mobilization of food reserves, and seed Dormancy. *Plant growth and development. Hormones and environment.* Academic Press. San Diego, EUA. 447-471.
- Stenesh, J., 1989. *Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology*. 2ª edición. Wiley Interscience, pp 368.
- Truernit, E., 2001. The importance of sucrose transporters. *Current Biology* 11: R169–R171
- Uno, Y., Furihata, T., Abe, H., Yoshida, R., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. 2000. Arabidopsis basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal transduction pathway under drought and high-



salinity conditions. Proceedings of the National Academy Science of the United States of America 97: 11632–11637

Vincent, LPD. 2002. *Zea mays* (Maize, Corn). Encyclopedia of Life Sciences, 1-7.

Vismer, H.F., Snijman, P.W., Marasas, W.F.O., van Schalkwyk, D.J. 2004. Production of fumonisins by *Fusarium verticillioides* strains on solid and in a defined liquid medium-effect of L-methionine and inoculum. Mycopathologia, 158, 99–106.

Viterbo, A., Harel, M., Chet, I. 2004. Isolation of two aspartyl proteases from *Trichoderma asperellum* expressed during colonization of cucumber roots. FEMS Microbiology Letters 238(1):151-8.

Wahl, R., Wippel, K., Goos, S., Kämper, J., Sauer, N. 2010. A novel high-affinity sucrose transporter is required for virulence of the plant pathogen *Ustilago maydis*. PLoS Biol 8(2): e1000303. doi:10.1371/journal.pbio.1000303.

Yang, F., Jensen, J.D., Spliid, N.H., Svensson, B., Jacobsen, S., Jørgensen, L.N., Jørgensen, H.J., Collinge, D.B., Finnie, C. 2010. Investigation of the effect of nitrogen on severity of *Fusarium* head blight in barley. Journal of Proteomics 73(4): 743-752.

Zavala-Zendejas S. 2001. Caracterización del simportador sacarosa/H⁺ en la germinación del maíz. Patrón de la proteína y de la actividad. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM.

Zurita-Villegas V. 2011. Efecto de *Fusarium verticillioides* en el transporte de carbohidratos en la germinación de tejido embrionario de maíz. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM.