



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

UNAM
POSGRADO 

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS
FACULTAD DE QUÍMICA

LA FUMONISINA B1 ES UN FACTOR
DE VIRULENCIA QUE MODULA
LA RESPUESTA DE DEFENSA EN MAÍZ
DURANTE LA INFECCIÓN CON *Fusarium verticillioides*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)

P R E S E N T A:

DIANA SÁNCHEZ RANGEL

TUTOR: DR. F. JAVIER PLASENCIA DE LA PARRA

MÉXICO, D. F.

MARZO 2012





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: Dr. Mario Rocha Sosa

Vocal: Dra. Helena Porta Ducoing

Secretario: Dra. Sobeida Sánchez Nieto

Suplente: Dr. Eleazar Martínez Barajas

Suplente: Dr. Francisco Ruíz Terán

Este trabajo se realizó en el laboratorio 101 del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química de la UNAM bajo la dirección del Dr. F. Javier Plasencia de la Parra. Se contó con el apoyo del proyecto CONACYT (50503-Z) y de la Facultad de Química (PAIP 6290-08), así como la beca otorgada por CONACYT para los estudios de Doctorado (registro 49792).

Asesor del Tema: Dr. F. Javier Plasencia de la Parra

Sustentante: M. en C. Diana Sánchez Rangel

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Sobeida Sánchez Nieto por su asesoría en el montaje de las técnicas para la evaluación de la actividad de β -1,3-glucanasas y en la interpretación y discusión de los resultados de este trabajo.

A la M.C. Manuela Nájera Martínez (Facultad de Química, UNAM) por la asistencia en las técnicas de Biología Molecular.

A las Dras. Helena Porta Ducoing y Tzvetanka Dimitrova Dinkova por sus valiosa participación en el comité tutorial y sus observaciones al proyecto que facilitaron que éste avanzara.

A la Dra. Rocío Cruz Ortega por su apoyo en la realización de este proyecto.

A los Dres. Mario Rocha Sosa, Helena Porta Ducoing, Sobeida Sánchez Nieto, Eleazar Martínez Barajas y Francisco Ruíz Terán por sus críticas y aportaciones al manuscrito final.

ABREVIATURAS

ABA	Ácido abscísico	3-KSR	3-cetoesfinganina reductasa
ACD	Muerte celular acelerada	NDA	naftalen 2,3-dicarboxialdehído
ACN	Acetonitrilo	NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido
ATP	Adenosín trifosfato	NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
BCL	Base de cadena larga	NBT	Azul de nitro tetrazolio
BSA	Albúmina sérica bovina	MAPK	Cinasa activada por mitógeno
ChiA	Quitinasa A	MeJa	Metil jasmonato
cDNA	Ácido desoxiribonucleíco complementario	OPA	<i>o</i> -ftaldialdehído
d18:0	Esfinganina	PAL	Fenil alanina amonio liasa
D18:1⁴	Esfingosina	PAMP	Patrones moleculares asociados a patógenos
DEPC	Dietilpirocarbonato	PDA	Papa dextrosa agar
ED₅₀	Dosis efectiva 50	PKS	Policétido sintasa
ESN	Esfinganina	PR	Proteína relacionada a patogénesis
ESO	Esfingosina	PSN	Fitoesfingosina
ERE	Elementos de respuesta a etileno	RNA	Ácido ribonucleíco
ET	Etileno	RNAr	Ácido ribonucleíco ribosomal
FB1	Fumonisina B1	SA	Ácido salicílico
GlcNA	N-acetilglucosamina	SAM	Micotoxina análoga a esfinganina
GCS	Glucosilceramida	SAR	Respuesta sistémica adquirida
GIP	Proteína inhibitoria de glucanasa	SDS	Dodecil sulfato de sodio
HR	Respuesta de Hipersensibilidad	SPT	Serina palmitoil transferasa
hpi	Horas postinoculación	S1P	Esfingosina-1-fosfato
IC₅₀	Concentración inhibitoria 50	t18:0	Fitoesfingosina
INA	Ácido 2,6-dicloro isonicotínico	TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletileno Diamina
IPCS	Inositol fosforil ceramida	UDP	Uridina difosfato
JA	Ácido jasmónico		
Ki	Constante de inhibición		

ÍNDICE

	Página
I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCIÓN	
A. <i>Fusarium verticillioides</i>: patógeno de la planta de maíz (<i>Zea mays</i>)	3
A.1 Importancia del cultivo de maíz y principales patógenos.....	3
A.2 Características de <i>Fusarium verticillioides</i> : proceso de penetración e infección en la planta de maíz.....	5
A.3 Producción de toxinas por <i>F. verticillioides</i> : la fumonisina B1 (FB1) como principal toxina.....	6
B. La FB1: biosíntesis, blancos celulares y su papel en la patogénesis.	7
B.1 Ruta biosintética de la FB1: locus <i>FUM</i>	7
B.1.1 Regulación de la producción de fumonisinas del grupo B.....	9
B.1.1.1. Influencia de factores abióticos en la producción de fumonisinas.....	10
B.1.1.2. Efecto del pH y factores nutrimentales: genes <i>PAC1</i> , <i>AREA</i> , <i>FST1</i> y <i>ZFR1</i>	11
B.1.1.3. Efecto de las oxilipinas en la producción de fumonisinas.....	12
B.2 Blancos celulares de la FB1 en las plantas: la esfinganina N-acil transferasa y la ATPasa de protones.....	13
B.2.1 La ATPasa de H ⁺ como blanco celular de la FB1	13
B.2.2 La esfinganina N-acil transferasa como blanco celular de FB1	14
B.2.2.1 Estructura y función de los esfingolípidos.....	14
B.2.2.2 Síntesis <i>de novo</i> de los esfingolípidos.....	14
B.2.2.3 Funciones celulares de los esfingolípidos en plantas.....	16
B.3 Asociación entre la producción de FB1 y la patogénesis (factor de virulencia).....	18
C. Respuesta de defensa en la interacción maíz - <i>F. verticillioides</i>	21
C.1 Respuestas de defensa en plantas: generalidades.....	21
C.2 Respuesta de defensa en la interacción maíz- <i>F. verticillioides</i>	22
D. Función de las β-1,3-glucanasas y quitinasas en la respuesta de defensa	24
D.1 Quitinasas.....	25
D.1.1. Clasificación.....	25
D.1.2. Función de las quitinasas en la respuesta de defensa en plantas.....	26
D.1.3 Regulación de las quitinasas en la patogénesis.....	28
D.2 β -1,3-glucanasas.....	28
D.2.1. Clasificación.....	29
D.2.2. Función de las β -1,3-glucanasas en la respuesta de defensa en plantas.....	30
D.2.2.1 Oligosacáridos derivados de β -glucano y su relación con la patogénesis.....	31
D.2.3 Funciones de las β -1,3-glucanasas en plantas durante la germinación.....	31

D.3 Las hidrolasas de plantas como blanco de patógenos	32
III. Hipótesis	34
IV. Objetivos	34
V. Materiales y métodos	36
A. Material biológico y químicos empleados.....	36
B. Infección de los embriones de maíz.....	36
B.1 Obtención de la suspensión de conidias.....	36
B.2 Inoculación de los embriones de maíz con la suspensión de conidias de <i>Fusarium</i>	37
B.3 Conteo de conidias.....	37
C. Extracción de proteína soluble total para determinar la actividad de quitinasa y β -1,3-glucanasa.....	37
D. Ensayo espectrofotométrico para la determinación de actividad total de quitinasa.....	38
E. Ensayo espectrofotométrico para la determinación de actividad total de β -1,3-glucanasa.....	39
F. Ensayo para la determinación de la actividad de las distintas isoformas de β -1,3-glucanasas en geles nativos.....	39
F.1 Efecto de la FB1 en la actividad de β -1,3-glucanasas de maíz en geles nativos.....	40
F.2 Purificación parcial de las isoformas de β -1,3-glucanasas	41
G. Isoelectroenfoque en condiciones nativas.....	41
H. Extracción de fumonisina y su cuantificación por HPLC.....	41
I. Extracción de bases esfingoideas libres y su cuantificación por HPLC....	42
I.1 Cuantificación de bases esfingoideas libres por HPLC.....	43
J. Extracción de RNA y obtención de cDNA por transcripción reversa.....	43
J.1 Transcripción reversa (RT) y amplificación del cDNA por PCR.....	44
VI. RESULTADOS	47
A. La FB1 modula selectivamente la actividad de β -1,3-glucanasas de maíz.....	47
B. Las isoformas II y III de β -1,3-glucanasa de maíz son blancos de inhibición de la toxina FB1.....	49
C. La inducción en la actividad de la isoforma I por la FB1 está mediada por la vía del SA que se activa por la acumulación de bases esfingoideas.....	52
C.1. Actividad biológica de la FB1 como SAM (sphinganine analog mycotoxin) en los embriones de maíz durante la germinación.....	52
C.2. Activación de la isoforma I de β -1,3-glucanasas por bases esfingoideas.....	55
C.3. El tratamiento con INA, un análogo del SA, induce la actividad de la isoforma I.....	56
D. La infección por <i>Fusarium verticillioides</i> reproduce el mismo patrón de actividad de las distintas isoformas de β -1,3-glucanasa observado durante el tratamiento con FB1.....	58
D.1 <i>Fusarium verticillioides</i> produce FB1 a tiempos muy tempranos de la infección	59
D.2 La infección por <i>F. verticillioides</i> induce el transcrito de <i>PRm</i> . <i>PRm</i> pertenece al grupo de proteínas PR-1.....	60
D.3 La infección por <i>F. oxysporum</i> no provoca cambios en la actividad	

de las isoformas de β -1,3-glucanasa.....	62
E. La isoforma I es ácida mientras que las isoformas II y III son básicas...	64
VII. DISCUSIÓN	66
VIII. CONCLUSIONES	77
IX. BIBLIOGRAFÍA	79
X. ANEXOS	
A. Artículo.....	88
<p>Sánchez-Rangel D, Sánchez-Nieto S, Plasencia J (2012) Fumonisin B1, a toxin produced by <i>Fusarium verticillioides</i>, modulates maize β-1,3glucanase activities involved in defense response. <i>Planta</i> no. DOI 10.1007/s00425-011-1555-0.</p>	
B. Revisión.....	103
<p>Sánchez-Rangel D, Plasencia J (2010) The role of sphinganine analog mycotoxins on the virulence of plant pathogenic fungi. <i>Toxin Rev</i> 29: 73-86.</p>	

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Título de la Figura	Página
Figura 1	Estrucura química de las principales fumonisinas del grupo B producidas por <i>F. verticillioides</i>	7
Figura 2	Biosíntesis de las fumonisinas del grupo B en <i>F. verticillioides</i>	9
Figura 3	Biosíntesis <i>de novo</i> de los esfingolípidos complejos en plantas.....	16
Figura 4	Estructura parcial de la quitina y del β -1,3-glucano.....	26
Figura 5	Efecto de la FB1 sobre la elongación radicular y la actividad total de hidrolasas en embriones de maíz durante la germinación.....	48
Figura 6	Efecto de la FB1 sobre tres isoformas de β -1,3-glucanasas en embriones de maíz.....	49
Figura 7	Efecto de la FB1 <i>in vitro</i> sobre la actividad de las isoformas II y III de β -1,3-glucanasa.....	50
Figura 8	La isoforma I de β -1,3-glucanasa de maíz no es sensible a la inhibición por la FB1.....	51
Figura 9	Las bases esfingoideas esfinganina (ESN) y fitoesfingosina (PSN) no inhibieron la actividad de las diferentes isoformas de β -1,3-glucanasa	52
Figura 10	Cromatogramas obtenidos de la separación y detección de los derivados de NDA de los estándares de fitoesfingosina (t18:0), esfingosina (d18:1 ⁴), esfinganina (d18:0) y C-20 esfingosina (d20:1)....	53
Figura 11	Cromatogramas de la detección por HPLC de las bases: t18:0, d18:1 ⁴ , d18:0 y el estándar interno (d20:1) en muestras control y muestras tratadas con FB1 20 μ M.....	54
Figura 12	Acumulación de bases esfingoideas en embriones de maíz germinados en presencia de FB1 20 μ M.....	55
Figura 13	Inducción de la isoforma I de β -1,3-glucanasa por una mezcla de esfinganina y fitoesfingosina.....	56
Figura 14	Niveles de transcrito del gen <i>ZmPAL</i> en embriones de maíz germinados en presencia de FB1 20 μ M.....	57
Figura 15	Efecto de las fitohormonas ácido salicílico y ácido jasmónico sobre la actividad de la isoforma I de β -1,3-glucanasa de maíz.....	57
Figura 16	Colonización de embriones de maíz por <i>Fusarium verticillioides</i>	59
Figura 17	Niveles de transcrito del gen <i>FvFUM1</i> durante la infección de los embriones de maíz con <i>F. verticillioides</i>	60
Figura 18	Niveles de transcrito del gen <i>PRm</i> durante la infección de los embriones de maíz por <i>F. verticillioides</i> y por el tratamiento con FB1 20 μ M.....	61
Figura 19	Niveles de transcrito del gen <i>ZmPAL</i> durante la infección de los embriones de maíz por <i>F. verticillioides</i>	61
Figura 20	Efecto de la infección de <i>F. verticillioides</i> sobre la actividad de hidrolasas en embriones de maíz durante la germinación.....	62
Figura 21	Efecto de la infección de <i>F. oxysporum</i> sobre la actividad de hidrolasas en embriones de maíz durante la germinación.....	64
Figura 22	Isoelectroenfoco en condiciones nativas para determinar el pI de las distintas isoformas de β -1,3-glucanasas.....	65
Figura 23	La fumonisina B1 selectivamente modula la actividad de las distintas isoformas de β -1,3-glucanasa durante la infección por <i>Fusarium verticillioides</i> por dos mecanismos independientes.....	76

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla		Página
Tabla 1	Patógenos de la planta de maíz que transmiten enfermedades a través de la semilla.....	4
Tabla 2	Genes asociados con la regulación de la producción de FB1 en <i>F. verticillioides</i>	10
Tabla 3	Familias de las proteínas relacionadas a patogénesis (PR).....	27
Tabla 4	Componentes del buffer de extracción de proteína soluble a partir de embriones de maíz.....	38
Tabla 5	Componentes de los geles separador y concentrador para los geles nativos de actividad.....	39
Tabla 6	Componentes de la mezcla de reacción para la transcriptasa reversa (RT).....	45
Tabla 7	Oligonucleótidos utilizados para la amplificación por PCR de <i>FUM1</i> , <i>Tubulina</i> , <i>PRm</i> y <i>PAL</i>	45
Tabla 8	Niveles de FB1 determinados por HPLC en embriones de maíz durante la infección con <i>F. verticillioides</i>	60

I. RESUMEN

Fusarium verticillioides es un ascomiceto capaz de infectar varios tejidos de la planta de maíz por lo que es el patógeno más importante para este cultivo en términos de ubicuidad y por las pérdidas que ocasiona a nivel cosecha y por tanto económicas. La germinación y el establecimiento de la plántula son etapas del desarrollo particularmente susceptibles a la infección por este patógeno debido a que el hongo puede sobrevivir como endófito en la semilla o en el suelo para acceder a la semilla hidratada. La mayoría de las cepas de *F. verticillioides* producen fumonisinas que son metabolitos tóxicos de importancia ya que su presencia en granos destinados al consumo humano o animal constituye un riesgo de seguridad alimentaria. Asimismo, la producción de fumonisinas se ha asociado con la patogenicidad y el desarrollo de síntomas más severos en la planta. En este trabajo describimos un nuevo blanco celular de la fumonisina B1 (FB1) en un modelo de infección de *F. verticillioides* en maíz durante la germinación. Estudiamos el efecto de la FB1 en la actividad de quitinasas y β -1,3-glucanasas que son enzimas hidrolíticas producidas por las células vegetales en la respuesta de defensa contra hongos patógenos pues actúan hidrolizando la pared celular fúngica. Se detectó que durante la germinación consistentemente se presentan tres isoformas activas de β -1,3-glucanasas: una isoforma ácida denominada isoforma I y las isoformas II y III que se sugiere son básicas. El tratamiento con la FB1 exógena no influyó en la actividad de exoquitinasa total en los embriones de maíz pero sí alteró la actividad de β -1,3-glucanasas pues indujo la actividad de la isoforma ácida mientras que suprimió la actividad de las dos isoformas básicas. Esta isoforma ácida también fue inducida con ácido 2,6-dicloroisonicotínico (INA), un análogo del ácido salicílico (SA), sugiriendo que la isoforma I es un blanco de una vía de señalización mediada por el SA que es activada por la acumulación de bases esfingoideas. Por otro lado, la represión de las isoformas básicas sugirió una interacción directa de las enzimas con la micotoxina y los experimentos *in vitro* demostraron que la FB1 exógena inhibió la actividad de las β -1,3-glucanasas básicas con una IC_{50} de 53 μ M. Cuando los embriones de maíz se inocularon con *F. verticillioides* se presentó el mismo efecto dual en la actividad de las distintas isoformas de β -1,3-glucanasas además que se detectaron niveles fisiológicamente relevantes de FB1 durante la infección. Estos resultados aportan

evidencias de que las β -1,3-glucanasas son un blanco fisiológico importante y que su modulación por la FB1 podría contribuir a una colonización exitosa por parte del patógeno.

II. INTRODUCCIÓN

A. *Fusarium verticillioides*: patógeno de la planta de maíz (*Zea mays*)

A.1 Importancia del cultivo de maíz y principales patógenos.

El maíz (*Zea mays* L.), junto con el arroz y trigo, componen el grupo de cereales de mayor importancia económica a nivel mundial. El reporte del año 2010 indicó que la producción de maíz fue de 703 millones de toneladas por los 586 millones de toneladas de trigo y 645 millones de toneladas de arroz (Food and Agricultural Organization). El principal país productor de maíz es Estados Unidos con cerca del 47% de la producción mundial seguido por China, Brasil y México con un porcentaje de 24, 7 y 3% respectivamente (FAO). En el caso particular de México, el maíz es el cultivo más importante desde el punto de vista alimentario ya que constituye cerca del 65% de la producción nacional de cereales dentro de los cuales se encuentran también el trigo, sorgo, cebada, arroz y avena. En México se cultiva una gran diversidad de genotipos que incluyen variedades híbridas y razas criollas de polinización abierta.

Dada la importancia de este cultivo, los programas de mejoramiento se enfocan en incrementar su productividad generando variedades de alto rendimiento que sean tolerantes a suelos ácidos, con bajos niveles de nitrógeno, a sequía, a plagas y a enfermedades. Con respecto a las enfermedades, el maíz es susceptible a una gran cantidad de microorganismos patógenos principalmente de origen viral, bacteriano y fúngico que limitan la producción. Varios de estos patógenos se transmiten a través de la semilla por lo que pueden reducir la viabilidad de ésta, comprometer la germinación y el posterior establecimiento de la plántula. Además, las plantas resultantes de estas semillas constituyen una fuente de inóculo para la diseminación posterior del patógeno. En la tabla 1 se enlistan algunos de los patógenos de maíz más comunes que se transmiten a través de la semilla.

Tabla 1. Patógenos de la planta de maíz que transmiten enfermedades a través de la semilla¹.

Patógenos virales	Patógenos bacterianos	Patógenos fúngicos
Virus del moteado clorótico	<i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>Avenae</i>	<i>Fusarium verticillioides</i> , <i>F. graminearum</i>
Virus del mosaico del enanismo	<i>Burkholderia andropogonis</i>	<i>Acremonium maydis</i> , <i>A. strictum</i>
	<i>Clavibacter michiganensis</i>	<i>Bipolaris maydis</i>
	<i>Erwinia chrysanthemi</i> pv. <i>Zea</i>	<i>Botryodiplodia theobromae</i>
	<i>Pantoea stewartii</i>	<i>Cochliobolus carbonum</i>
	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>Lapsa</i>	<i>Gibberella zeae</i>
		<i>Glomerella graminicola</i>
		<i>Nigrospora oryzae</i>
		<i>Peronosclerospora maydis</i> , <i>P. sacchari</i> , <i>P. sorghi</i>
		<i>Phaeocytospora zeae</i>
		<i>Sclerophthora macrospora</i>
		<i>Setosphaeria turcica</i> , <i>S. Rostrata</i>
		<i>Sphacelotheca reiliana</i>
		<i>Stenocarpella maydis</i>

¹ Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT) <http://www.cimmyt.org/>

De todos los patógenos que se citan en la tabla 1, *Fusarium verticillioides* se le reconoce como el más importante en términos de ubicuidad, limitante en la productividad, por su capacidad de producir toxinas y que afecta la calidad del grano. La incidencia de este hongo en semillas de maíz en climas templados, representa hasta el 80% del total de las cepas de hongos aislados (Cortez-Rocha et al. 2003; Sánchez-Rangel et al. 2005), además que es capaz de infectar a todos los tejidos de la planta afectando así todas las etapas de desarrollo. Este hongo filamentoso está asociado principalmente al maíz, aunque también se ha reportado en otras especies de plantas como el sorgo, trigo, frijol y soya.

A.2. Características de *Fusarium verticillioides*: proceso de penetración e infección en la planta de maíz.

Fusarium verticillioides es un ascomiceto que pertenece a la subdivisión *Deuteromycota*. *F. verticillioides* puede presentar tanto una fase asexual (anamorfo o forma imperfecta) como una fase sexual (teleomorfo o forma perfecta). El estado teleomórfico de *F. verticillioides* pertenece al género *Gibberella*. El estado anamorfo se caracteriza por la producción de estructuras de reproducción asexual denominadas macroconidas que en *F. verticillioides* son producidas en forma de racimos denominados esporodoquios y su abundancia varía entre las diferentes cepas, generalmente en condiciones de laboratorio, son difíciles de encontrar. Además, *F. verticillioides* produce otras esporas asexuales en el micelio aéreo llamadas microconidias, que son unicelulares, abundantes y generalmente se agrupan en cadenas (Leslie y Summerell, 2006).

Este patógeno sobrevive como endófito en la semilla y en el tallo de la plantas, sin causar daños visibles, o bien como patógeno necrótrofo provocando pudrición en todos los tejidos de la planta de maíz como la raíz, el tallo y la mazorca. La condición sintomática es el resultado de una compleja interacción entre varios factores como son la virulencia de la cepa, la variedad y etapa del desarrollo del maíz (hospedero), así como las condiciones ambientales (Desjardins et al. 1995; Kedera et al. 1994; Duncan y Howard, 2010).

La infección puede ser local o sistémica; la primera ocurre cuando las conidias son depositadas por el viento, la lluvia o por insectos en el tejido de maíz y penetran por aperturas naturales o en regiones donde hay daño mecánico (Nelson, 1992). La infección sistémica inicia durante la germinación de la semilla, ya sea porque está infectada o porque los propágulos del hongo que sobreviven en el suelo acceden a la semilla. En ambos casos, el hongo se encuentra estratégicamente posicionado para colonizar la planta durante la germinación y el establecimiento de ésta. *F. verticillioides* es capaz de moverse desde las semillas infectadas hasta la mazorca a través del tallo para finalmente diseminarse a diferentes granos dentro de la mazorca (Kedera et al. 1994; Munkvold et al. 1997). Además de una infección sistémica, la vía más común para que este hongo infecte a la mazorca es por medio del estigma, esto se facilita por lesiones en el tejido. Aún en ausencia de heridas, una vez

que las conidias de *F. verticillioides* se depositan en el estigma, también pueden acceder a las células del pericarpio penetrando a través de la parte inferior del canal estilar (Duncan y Howard, 2010).

A.3 Producción de toxinas por *F. verticillioides*: la fumonisina B1 (FB1) como principal toxina.

F. verticillioides es capaz de producir enzimas con actividad lítica, así como toxinas que contribuyen al proceso de infección. Dentro de las toxinas producidas por esta especie se encuentran el ácido fusárico, la fusarina C, las naftoquinonas, la moniliformina y las fumonisinas. La producción de las fumonisinas es importante por dos razones: 1) la presencia de estos metabolitos en los productos agrícolas y en los alimentos derivados constituye un problema de inocuidad alimentaria, ya que se ha demostrado que es la causa de leucoencefalomalacia en caballos y edema pulmonar en porcinos, y en humanos se ha asociado con mayor incidencia de cáncer esofágico y defectos en el desarrollo del tubo neural (Marasas, 2001 y 2004). 2) la producción de fumonisinas se ha asociado con la patogenicidad y virulencia del hongo en varios genotipos de maíz (Bacon et al. 1989; Bacon et al. 1996; Desjardins, 2006; Rabie et al. 1982). Hasta ahora se han reportado alrededor de 60 diferentes fumonisinas y análogos siendo las fumonisinas del grupo B las que se producen mayoritariamente (Bartók et al. 2006; Rheeder et al. 2002).

La estructura química base de las fumonisinas del grupo B consiste en un esqueleto de 20 carbonos de origen poliquétido con un grupo amino en el carbono 2 (C-2) y 2 grupos de ácido tricarbálico esterificado en las posiciones C-14 y C-15 (Fig. 1). Las diferentes fumonisinas se caracterizan por los patrones de hidroxilación en las posiciones C-5 y C-10. La FB1, FB2 y FB3 son las principales fumonisinas que se encuentran naturalmente en el tejido de maíz infectado y la FB1 es la más abundante pues constituye alrededor del 75% del total de fumonisinas (Marín et al. 1995; Proctor et al. 2006).

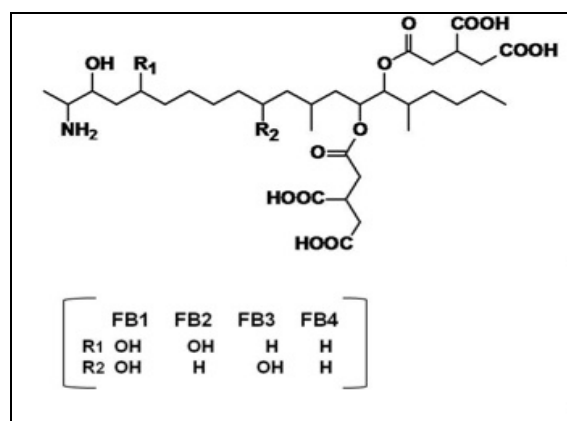


Figura 1. Estructura química de las principales fumonisinas del grupo B producidas por *F. verticillioides*.

B. La FB1: biosíntesis, blancos celulares y su papel en la patogénesis.

B.1 Ruta biosintética de la FB1: locus *FUM*.

La capacidad de producir fumonisina B1 es una característica variable entre las cepas de *F. verticillioides*, algunas no producen o lo hacen en niveles muy bajos (0.1 mg/g sustrato) mientras que otras cepas producen niveles muy altos (4 mg/g sustrato) (Desjardins et al. 1994; Nascimento et al. 2006; Sánchez-Rangel et al. 2005). Una razón de esta variabilidad es que existen mutantes naturales en alguno de los genes responsables de la biosíntesis. En *F. verticillioides* los genes responsables de la biosíntesis y secreción de las fumonisinas conforman el locus *FUM* que se encuentra en el cromosoma 1 y abarca aproximadamente 46 kb. Dentro de este locus se han identificado 16 genes, algunos estructurales y otros con función regulatoria (Picot et al. 2010). Con base en el análisis de las secuencias de las enzimas codificadas por estos genes y en pruebas funcionales se ha resuelto la ruta biosintética de las fumonisinas. Se sintetizan a partir de unidades de acetato para formar un policétido lineal dimetilado que se condensa con alanina seguido por reacciones de oxigenación y esterificación. La primera reacción es catalizada por una policétido sintasa (PKS), codificada por el gen *FUM1*. Esta PKS contiene los dominios catalíticos canónicos responsables de la formación de la cadena como son los dominios de β -cetoacil sintasa (KS), aciltransferasa (AT) y un dominio de transportadores de grupos acilos (ACP) (Huffman et al. 2010). Río abajo del gen *FUM1* se encuentran otros 10 genes que participan en la síntesis de fumonisinas según se muestra en la Figura 2. El producto de *FUM8* es una aminotransferasa dependiente de piridoxal fosfato (PLP), que transfiere el grupo amino al policétido de 18 carbonos mediante una

condensación descarboxilativa a partir de *L*-alanina para formar un intermediario 3-ceto que inmediatamente se reduce a un grupo hidroxilo por una reductasa codificada por *FUM13* (Seo et al. 2001; Butchko et al. 2003). Posteriormente ocurren oxidaciones en las posiciones C-14 y C-15 por la acción concertada de varias monooxigenasas dependientes de citocromo P450. Para la esterificación de los ácidos tricarbónicos, se requiere la participación de los productos de los 4 genes *FUM7*, *FUM10*, *FUM11* y *FUM14*. Se ha sugerido que los grupos tricarbónicos provienen de derivados del ácido cítrico como el ácido aconítico, pero no se ha demostrado concluyentemente (Blackwell et al. 1996; Hufmann et al. 2010). *FUM11* codifica para un transportador de tricarbónicos que podría estar involucrado en el transporte de sustratos a través de los diferentes compartimentos celulares y los productos de los otros tres genes forman un complejo de un tipo de péptido sintetasa no ribosomal (NRPS) en donde *FUM10* tiene el dominio de adenilación, *FUM14* tiene el dominio de condensación y finalmente *FUM7* posee la función de reductasa (Bojja et al. 2004).

Además de los genes estructurales, en el locus *FUM* se encuentran los genes *FUM19* y *FUM21* a los cuales se les ha atribuido una función regulatoria. *FUM19* codifica para un transportador del tipo ABC que podría actuar en la exportación de la toxina (Stergiopoulos et al. 2002). *FUM21* codifica para un factor de transcripción del tipo Zn(II)-2Cys₆, que podría estar regulando la expresión de los genes estructurales pues mutantes de este gen no producen fumonisinas (Brown et al. 2007)

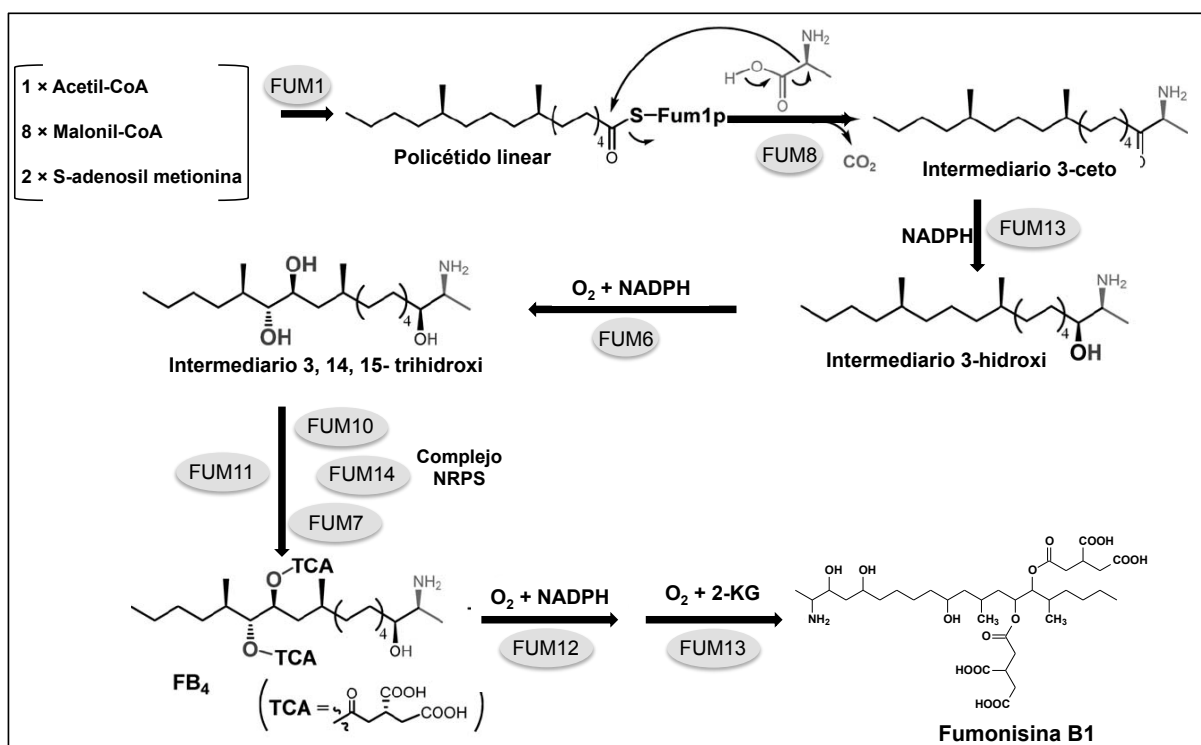


Figura 2. Biosíntesis de las fumonisinas del grupo B en *F. verticillioides* (modificada de Huffman et al. 2010).

B.1.1. Regulación de la producción de fumonisinas del grupo B.

Hasta la fecha se han identificado 10 genes en el genoma de *F. verticillioides* que participan en la regulación de la producción de fumonisinas. Estos genes no forman parte del locus *FUM* y sus funciones se resumen en la Tabla 2. Además de estos genes, se sabe que factores ambientales como el pH, temperatura, disponibilidad de agua y de nutrientes son factores clave para la regulación de la producción de fumonisinas.

Tabla 2. Genes asociados con la regulación de la producción de FB1 en *F. verticillioides*.

Gen / Producto	Producción de FB1 en la mutante	Características fenotípicas de la mutante	Tipo de regulación
¹ FCC1: ciclina tipo C	× FB1 en granos maduros de maíz. ↓ FB1 a pH ácido	↓ en la conidiación	Positiva
² FCK1: cinasa dependiente de ciclina	↓ FB1 ↓ <i>FUM1</i>	↓ severa en crecimiento y conidicación	Positiva, interactúa físicamente con FCC1
³ PAC1: regulador de genes que responden a cambios en el pH	↑ FB1 en condiciones ácidas en granos maduros ↑ <i>FUM1</i>	Crecimiento limitado a pH alcalino	Negativo
⁴ ZFR1: factor transcripcional del tipo binuclear Zn(II)2Cys6	↓ FB1	No afecta crecimiento ni desarrollo	Positiva
⁵ GBP1: proteína G monomérica	↑ FB1 ↑ <i>FUM1</i> y <i>FUM8</i>	No afecta crecimiento ni desarrollo	Negativa
⁶ GBB1: subunidad β de un proteína G heterotrimérica	↓ FB1 ↓ <i>FUM1</i> y <i>FUM8</i>	↓ en el desarrollo de las hifas pero no afecta la virulencia	Positiva
⁷ CPPI: posible fosfatasa	↑ FB1 ↑ <i>FUM1</i>	↓ crecimiento radial, ↓ germinación de conidias y ↑ en la formación de macroconidias	Negativo
⁸ AREA: regulador del metabolismo de nitrógeno	× FB1 en granos maduros de maíz. ↓ <i>FUM1</i> , <i>FUM8</i> y <i>FUM12</i>	↓ crecimiento de los granos durante la maduración de la mazorca	Positiva
⁹ FST1: transportador de azúcares	↓ FB1	No afecta crecimiento ni colonización	Positiva
¹⁰ FvVE1: regulador del desarrollo sexual y metabolismo secundario	× FB1 en granos maduros de maíz × <i>FUM1</i> , <i>FUM8</i> y <i>FUM21</i>	Efectos en integridad de pared celular, hidrofobicidad y polaridad de las hifas	Positiva

× no producción, ↓ disminución/reducción ↑ aumento (tomada y modificada de Picot et al. 2010.)

¹Shim y Woloshuk et al. 2001; ²Bluhm et al. 2006; ³Flaherty et al. 2003; ⁴Flaherty y Woloshuk, 2004; ⁵Sagaram et al. 2006; ⁶Sagaram et al. 2007; ⁷Choi et al. 2008; ⁸Kim et al. 2008; ⁹Bluhm et al; 2008; ¹⁰Myung et al; 2009.

B.1.1.1. Influencia de factores abióticos en la producción de fumonisinas.

La influencia de los factores abióticos como actividad de agua (a_w) y temperatura en la producción de fumonisinas se han estudiado principalmente *in vitro* en granos de maíz, reportando condiciones óptimas para su producción, temperaturas entre 20 y 30° C y a_w entre 0.97 y 0.98 (Marín et al. 1999; Samapundo et al. 2005). Sin embargo, la producción de FB1, puede incrementar a niveles bajos de a_w ,

indicando que el estrés que representa una limitación en la disponibilidad de agua incrementa la producción de fumonisinas. Lo anterior también se demostró al observar un incremento en la expresión de *FUM1* cuando la a_w oscila entre valores de 0.937 y 0.955 (Jurado et al. 2008).

B.1.1.2 Efecto del pH y factores nutrimentales: genes *PAC1*, *AREA*, *FST1* y *ZFR1*.

Los factores fisicoquímicos y nutrimentales también son importantes en la regulación de la producción de fumonisinas. En relación al pH, la producción de fumonisinas es óptima a valores ácidos entre 3 y 3.5 (Keller et al. 1997). Flaherty et al. (2003) reportaron que existe una represión a pH alcalinos e identificaron al gen *PAC1* como responsable de esta represión, pues sólo las mutantes de *PAC1* y no las cepas silvestres son capaces de inducir la expresión de *FUM1* en condiciones alcalinas. *PAC1* pertenece a una familia de reguladores transcripcionales que reprimen o activan genes que responden a cambios externos del pH.

También el metabolismo de nitrógeno contribuye a regular la producción de FB1, una de las primeras evidencias fue la observación de que la producción de fumonisinas se reprime cuando el hongo crece en presencia de fosfato de amonio (Shim y Woloshuk, 1999). El gen *AREA* codifica para un activador transcripcional que se une a secuencias GATA de genes que participan en el metabolismo del nitrógeno. Mutantes en este gen no producen FB1 y muestran una expresión disminuida en los genes *FUM1*, *FUM8* y *FUM12* (Kim et al. 2008).

Con respecto a la influencia de la fuente de carbono en la producción de fumonisina, se sabe que existe una relación positiva entre la concentración disponible de azúcares y los niveles de fumonisinas sintetizados (Jiménez et al. 2003). En los granos de mutantes que tienen 40% menos almidón por tener interrumpida una α -amilasa, al ser inoculados con *F. verticillioides* se producen niveles menores de FB1 en comparación con los granos de la planta silvestre (Bluhm y Woloshuk, 2005). A nivel molecular se han encontrado dos genes que integran la percepción y toma de azúcares con la producción de fumonisinas, *ZFR1* y *FST1*. *ZFR1* codifica un factor transcripcional con dominio de unión al DNA tipo dedo de Zn y se ha sugerido que participa en la percepción o utilización de azúcares, pues el crecimiento de la mutante se compromete en un medio mínimo que contiene solo glucosa, maltosa, amilopectina o dextrina. Además, en la mutante $\Delta zfr1$ se encuentran disminuidos los

niveles de tres genes que codifican posibles transportadores de azúcares: *FST1*, *FST2* y *FST4*. Sin embargo, en un estudio reciente se determinó que *FST1* sí es necesario para la patogénesis; pero al expresar *FST1* en levaduras mutantes que carecen de transportadores de hexosas no se restaura el fenotipo silvestre; por lo que todavía no se conoce con certeza el mecanismo molecular en el cual participan estos dos genes (Kim y Woloshuk, 2011).

B.1.1.3 Efecto de las oxilipinas en la producción de fumonisinas.

La mayor parte de los estudios sobre la producción de fumonisinas se han realizado en medios de cultivo o sustratos esterilizados. Sin embargo, para comprender la función de la micotoxinas en la patogénesis es importante conocer los efectos de la interacción maíz-*F. verticillioides* en el crecimiento del hongo y la producción de FB1. Una de las vías que se inducen en las plantas como parte de la respuesta de defensa a la infección por hongos necrótrofos es la de las oxilipinas. Éstos compuestos se generan durante el catabolismo oxidativo de los ácidos grasos poliinsaturados por la acción coordinada de fosfolipasas, lipooxigenasas y un grupo de citocromos P450, incluyendo la aleno óxido sintasa (AOS) y la hidroperóxido liasa (HPL) (Shah et al. 2005). Los compuestos que se generan a lo largo de esta vía, además de incrementar el estrés oxidativo celular, también funcionan como señalizadores para activar otras respuestas de defensa. Las lipooxigenasas 9-LOX y 13-LOX que catalizan la oxidación en las posiciones 9 o 13 de la cadena de carbonos son las principales protagonistas. En varias interacciones planta-hongo los productos derivados de la actividad de 9-LOX los percibe el hongo para regular positivamente la biosíntesis de las micotoxinas y la esporulación (Brodhagen y Keller, 2006). Estos autores han postulado que los derivados de la vía de 9-LOX imitan a las oxilipinas que sintetizan los hongos que se denominan factores psi (precocious sexual inducers) y que al ser sensados por el hongo promueven la esporulación y producción de toxinas. Finalmente, Gao y colaboradores (2007) demostraron que cuando *F. verticillioides* coloniza granos maduros de mutantes en maíz del gen 9-LOX (*ZmLOX3*), la producción de FB1 disminuye así como la esporulación.

B.2 Blancos celulares de la FB1 en las plantas: la esfinganina *N*-acil transferasa y la ATPasa de protones.

Hasta ahora se ha demostrado que la FB1 puede afectar directamente la actividad de dos enzimas en células vegetales: la esfinganina *N*-acil transferasa (Abbas et al. 1994) y la ATPasa de protones (Gutiérrez-Nájera et al. 2005). La primera enzima, se localiza en el retículo endoplásmico y cataliza la condensación de la esfinganina con un ácido graso para formar la ceramida en la ruta de biosíntesis *de novo* de los esfingolípidos complejos. Por su similitud estructural con la esfinganina, la FB1 se clasifica como “micotoxina análoga a esfinganina” (SAMs por su acrónimo en inglés) al igual que la toxina AAL de *Alternaria alternata*, un hongo necrótrofo de tomate. Por su acción sobre la esfinganina *N*-acil transferasa, las SAMs provocan una acumulación de bases esfingoideas y un decremento en los niveles de ceramida y de esfingolípidos complejos (Fig. 3) y este desbalance explica gran parte de la toxicidad de la FB1.

El segundo blanco reportado para la FB1 es la ATPasa de protones (ATPasa de H⁺) la cual es una enzima localizada en la membrana plasmática, lo que se describe a continuación.

B.2.1 La ATPasa de H⁺ como blanco celular de la FB1.

La ATPasa transporta H⁺ del citoplasma al apoplasto utilizando la energía que obtiene de la hidrólisis de ATP, creando y manteniendo un potencial membranal negativo y un gradiente transmembranal de pH, proceso que es fundamental para las plantas (Elmore y Coaker, 2011).

Gutiérrez-Nájera y colaboradores (2005) demostraron que la FB1, *in vitro*, inhibe la actividad de la ATPasa de H⁺ utilizando vesículas de membrana plasmática aisladas de embriones de maíz de 24 h de germinación y probando concentraciones entre 10 y 40 μM de la toxina. De acuerdo a los datos cinéticos, esta inhibición es de naturaleza no competitiva y reversible presentando una *K_i* de 17.5 μM. Esta inhibición correlaciona con una disminución en la elongación radicular del 44 y 47% a 10 y 40 μM de FB1 respectivamente, con una disminución de hasta el 78% en la acidificación del medio y un aumento en la rigidez membranal, estos efectos podrían promover una infección más eficiente por *F. verticillioides*.

Además, se ha documentado que la ATPasa de H⁺ participa de forma activa en la respuesta de defensa de las plantas hacia patógenos. Se sabe que al tratar a células en suspensión de tomate (*Lycopersicon esculentum*) con elicitores derivados de *Cladosporium fulvum* la ATPasa de H⁺ se activa en los primeros minutos posteriores al tratamiento y que coincide con una acidificación del medio extracelular (Vera-Estrella et al. 1994). También, recientemente se ha descrito que el regulador negativo de la respuesta de defensa RIN4, que es una proteína membranal, interactúa *in vivo* e *in vitro* con la ATPasa de H⁺ promoviendo la apertura estomatal durante el ataque de *P. syringae* en *Arabidopsis*, facilitando la entrada del patógeno (Liu et al. 2009). Debido a la importancia de la ATPasa de H⁺ en diversas funciones fisiológicas y además en la defensa, resulta un blanco atractivo para los patógenos de plantas que podrían provocar una alteración en su actividad (Elmore y Coaker, 2011).

B.2.2. La esfinganina N-acil transferasa como blanco celular de la FB1.

B.2.2.1 Estructura y función de los esfingolípidos.

Los esfingolípidos son moléculas anfifílicas y la estructura básica está constituida por una base de cadena larga (BCL), la cual es un aminoalcohol de cadena hidrocarbonada (2-amino-1,3-hidroxiálcano). Hay una gran diversidad estructural de BCLs pues pueden ocurrir insaturaciones en las posiciones C4-C5 o C8-C9 y/o hidroxilación en la posición C4. Cuando la BCL se N-acila con un ácido graso de 14 a 26 átomos de carbono para formar la ceramida. Cuando un grupo polar se esterifica en la posición C1 de la ceramida se forma un esfingolípido complejo.

Los esfingolipidos son componentes esenciales del sistema de endomembranas en plantas y otros eucariotes y se ha estimado que componen más del 40% de los lípidos de la membrana plasmática (Sperling et al. 2005). Además de proporcionar integridad estructural, la evidencia reciente muestra que los esfingolípidos tienen funciones multifacéticas. Por ejemplo, están enriquecidos en las balsas lipídicas ("lipid rafts") o microdominios membranales que son regiones de membrana altamente ordenadas, importantes para la organización y función de proteínas de señalización en la superficie de las células vegetales, para el tráfico transmembranal y tráfico intracelular (Mongrand et al. 2004; Borner et al. 2005). Asimismo, los esfingolípidos, sus intermediarios biosintéticos y metabolitos son mediadores de procesos celulares en plantas, como muerte celular programada y la

transducción de señales dependientes de ácido abscísico (ABA) (Ng et al. 2001; Coursol et al. 2003; Townley et al. 2005)

B.2.2.2 Síntesis *de novo* de los esfingolípidos.

La biosíntesis *de novo* de los esfingolípidos complejos comienza con la formación de la BCL en el retículo endoplásmico a partir de la condensación de la serina con palmitoil-CoA para formar la 3-cetoesfinganina (Fig. 3). Esta reacción es catalizada por la serina palmitoiltransferasa (SPT) que pertenece a la familia de las α -oxoamino sintasas dependientes de piridoxal fosfato. La SPT es una enzima formada por dos subunidades, LCB2 donde se encuentra el sitio catalítico y la subunidad LCB1 que es esencial para estabilizar al heterodímero SPT (Tamura et al. 2001; Gable et al. 2002). La 3-cetoesfinganina se reduce a esfinganina por la 3-cetoesfinganina reductasa (3-KSR) en una reacción dependiente de NADPH (Chen et al. 2009). La esfinganina generada se *N*-acila con un ácido graso activado por CoA para producir ceramida. Esta reacción la cataliza la esfinganina *N*-aciltransferasa, blanco de la FB1. La mayoría de las ceramidas producidas en células vegetales incorporan en C1 a un grupo polar, como glucosa o un grupo fosforil-inositol, generando así a los esfingolípidos complejos. La glucosil ceramida sintetasa (GCS) emplea UDP-glucosa como donador de glucosa en la formación de glucosilceramidas. La ceramida también puede ser modificada en la posición C1 por la transferencia de un grupo fosforil-inositol a partir de fosfatidilinositol mediante la acción de la inositol fosforil ceramida sintasa (IPCS). La actividad de glucosilceramida sintasa se localiza en retículo endoplásmico (Hillig et al. 2003), mientras que la actividad de IPC sintasa está en el aparato de Golgi (Bromley et al. 2003).

La diversidad estructural de los esfingolípidos tiene origen en las variaciones tanto de la base esfingoidea como del ácido graso. Se ha documentado que la mayoría de la esfinganina (d18:0) sintetizada se hidroxila en la posición 4 por una hidroxilasa para formar la fitoesfingosina que es una BCL trihidroxilada (t18:0) y esta reacción generalmente ocurre antes de que la BCL se *N*-acile con el ácido graso. Otra de las modificaciones que pueden presentar las BCLs son insaturaciones, las enzimas $\Delta 4$ desaturasa y $\Delta 8$ desaturasa son responsables de introducir un doble enlace en la posición C4 o C8 respectivamente, esta reacción generalmente ocurre una vez que se ha formado la ceramida (Dunn et al. 2004)

Los ácidos grasos que componen a las ceramidas pueden ser de 16C o bien de cadena larga (VLCFAs very long-chain fatty acids) de hasta 26C. Debido a la diversidad estructural de la ceramida y el hecho de que existen más de una isoforma de *N*-acil transferasa, se ha sugerido que estas enzimas podrían tener especificidad de sustrato de tal forma que una enzima podría unir preferentemente BCLs dihidroxiladas con ácidos grasos de 16 carbonos mientras que otras isoformas favorecerían la reacción entre BCLs trihidroxiladas y ácidos grasos de cadena larga (Chen et al. 2009).

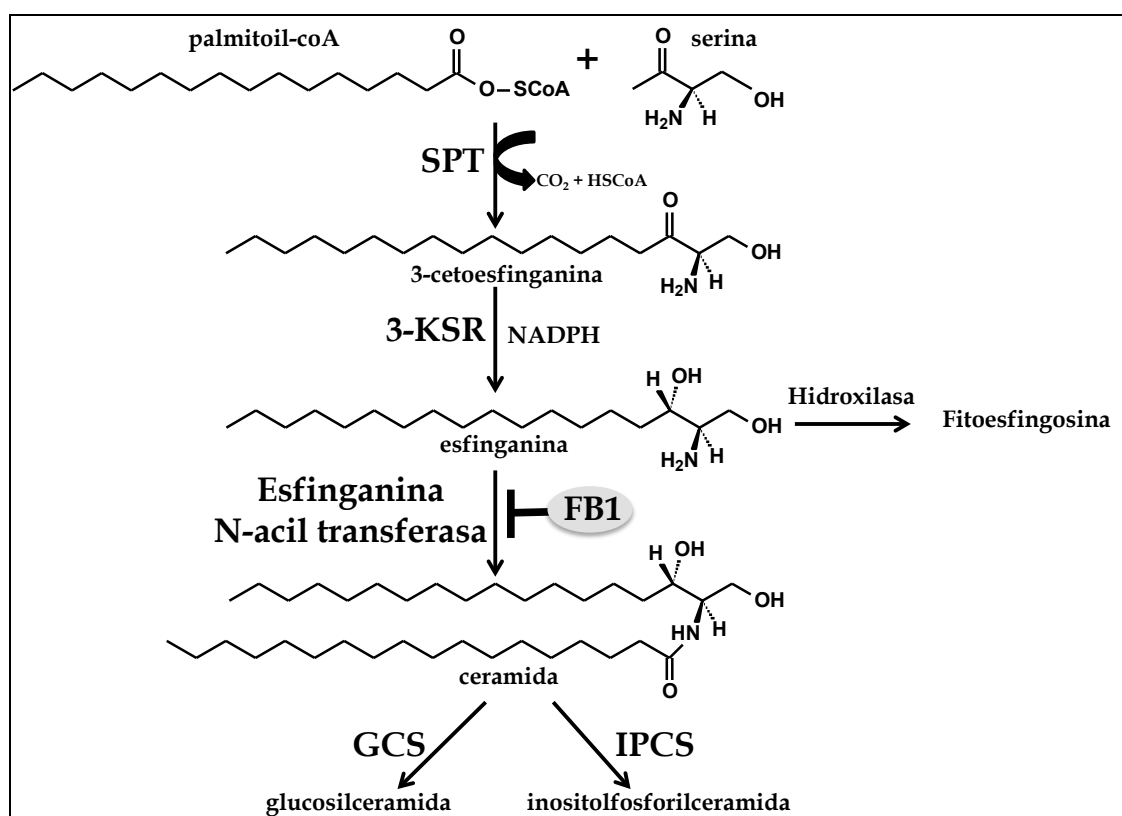


Figura 3. Biosíntesis *de novo* de los esfingolípidos complejos en plantas.

B.2.2.3 Funciones celulares de los esfingolípidos en plantas.

Aún cuando la mayoría de la información acerca de la función de los esfingolípidos está reportada en sistemas animales o en levaduras; existen trabajos recientes que indican que los esfingolípidos participan en procesos tales como muerte celular programada, estrés por sequía y en la patogénesis en plantas y que se describen a continuación.

Los esfingolípidos en la regulación en la apertura estomatal.

La base esfingoidea esfingosina-1-fosfato (S1P) participa en la señalización en células guardia que conduce al cierre de los estomas en el estrés por sequía. En plantas de *Commelina communis* sometidas a estrés hídrico ocurre un incremento en los niveles de S1P, y la aplicación exógena de esta BCL (4 - 6 μ M) induce el cierre de estomas. Se ha postulado que la fitohormona ABA estimula la producción de S1P que induce un incremento en la $[Ca^{2+}]$ citosólica y un incremento en la salida de K^+ causando una pérdida en la turgencia que conduce al cierre de los estomas. Esta señalización está mediada por proteínas G heterotriméricas pues mutantes de *Arabidopsis thaliana* que carecen de la subunidad α del heterotrímero son incapaces de responder al estímulo de S1P (Ng et al. 2001, Coursol et al. 2003).

Muerte celular programada.

La adición exógena de compuestos esfingoideos en plantas ha revelado su importancia de éstos como mediadores de la muerte celular programada. Por ejemplo, la adición exógena de ceramida (50 μ M) en cultivos celulares induce un incremento de dos veces en los niveles de Ca^{2+} citosólico que precede la producción de peróxido de hidrógeno y muerte celular (Townley et al. 2005). Un efecto similar se observa en hojas de *A. thaliana* tras la aplicación exógena de las bases esfingoideas esfinganina, fitoefingosina y/o efingosina (2 μ M) pues éstas provocan la producción de especies reactivas de oxígeno así como muerte celular (Shi et al. 2007). Además recientemente se demostró la participación de la esfinganina y la proteína cinasa activada por mitógeno 6 (MPK6) como transductores de la misma cadena de señalización durante reacciones de defensa en plántulas de *A. thaliana* incluyendo la muerte celular programada (Saucedo-García et al. 2011).

Papel de los esfingolípidos en la patogénesis.

El fenotipo de mutantes en *A. thaliana* que comprometen algún paso del metabolismo de esfingolípidos han situado a estas moléculas como importantes señalizadores durante la respuesta de defensa de las plantas ante patógenos. La mutante *acd11*, muestra un fenotipo de muerte celular acelerada caracterizada por la expresión constitutiva de genes PR así como producción de fitoalexinas y

acumulación de callosa. El gen *ACD11* codifica para una proteína que, *in vitro*, transporta esfingosina, sugiriendo que una alteración en la distribución de BCLs en algún compartimento o entre membranas altera algún mecanismo(s) de señalización asociado(s) con defensa (Brodersen et al. 2002). Asimismo, la mutante *acd5*, muestra un desarrollo normal pero presenta una respuesta de muerte celular exacerbada mediada por ácido salicílico (SA) ante la infección del patógeno *Pseudomonas syringae* (Greenberg et al. 2000). El gen *ACD5* codifica una ceramida cinasa, lo que sugiere que el balance entre los niveles de ceramida y su derivado fosforilado es importante para suprimir o activar la señal de muerte celular (Liang et al. 2003). También se ha demostrado que la aplicación exógena de esfingolípidos complejos (cerebrósidos) purificados del hongo *Magnaporthe grisea* induce la producción de peróxido de hidrógeno, expresión de genes PR y producción de fitoalexinas en plantas de arroz (Umemura et al. 2000; Suharsono et al. 2002). Trabajos posteriores han sugerido que existe un receptor que reconoce al elicitor de naturaleza esfingoidea y que se transduce la señal a través de la proteína G heterotrimérica, OsRac1, que a su vez activa a OsMAPK6 (Suharsono et al. 2002; Lieberherr et al. 2005).

B.3 Asociación entre la producción de FB1 y la patogénesis (factor de virulencia)

Debido a que las fumonisinas son metabolitos secundarios, lo primero que se podría argumentar es que durante la interacción planta-hongo la FB1 se sintetiza a tiempos tardíos en la etapa saprofítica sobre el sustrato inerte. Sin embargo, estudios recientes han mostrado que la FB1 se produce *in planta* en estados tempranos de la infección (Williams et al. 2006; Williams et al. 2007) e incluso durante el estado endofítico (Bacon et al. 2001). El papel de la FB1 como factor de virulencia durante la infección de *F. verticillioides* ha sido debatido por varios años; considerando a un factor de virulencia como una molécula que produce el patógeno y que le ayuda a incrementar su potencial para causar un daño, interfiriendo con alguna función específica del hospedero facilitando así la colonización del patógeno. Una serie de evidencias que ubican a la FB1 como factor de virulencia es el hecho de que causa efectos fitotóxicos en tejidos de maíz y la mayoría de éstos se han asociado con la habilidad que tiene la FB1 de generar un desbalance en los niveles intracelulares tanto de esfingolípidos complejos como de sus intermediarios. Se ha observado que en cultivos de callos de maíz, la FB1 a una concentración de 13 μM provoca una

reducción del 50% en el crecimiento (van Asch et al. 1992) y una inhibición del 75% en la elongación radicular durante la germinación de semillas de maíz (Doehlert et al. 1994). También, Lamprecht y colaboradores (1994) probaron los efectos de 4 concentraciones (0.1, 1, 10 y 100 μM) de FB1 en la longitud del tallo y las raíces. Observaron una reducción en la longitud de ambos tejidos y la severidad del efecto correlaciona positivamente con la dosis aplicada, presentándose a la mayor concentración una reducción del 80% en la longitud del tallo y un 95% en la longitud de las raíces. Asimismo, la aplicación de FB1 (29 μM) en el agua de riego a plántulas produce lesiones en hojas, una reducción del 23% en la longitud del tallo así como una reducción del 59% en el peso total de las raíces (Williams et al. 2007). En contraste, si la toxina se aplica por aspersion a plántulas de maíz, éstas no desarrollan ningún síntoma de enfermedad (Abbas y Boyette, 1992). Además del método de aplicación, estos resultados contradictorios podrían deberse al genotipo del maíz utilizado, pues se ha demostrado que diferentes poblaciones de maíz muestran un rango amplio en la sensibilidad a esta toxina, pues la dosis efectiva 50 (ED_{50}) en ensayos de elongación radicular puede variar entre 5 y 200 μM (Desjardins et al. 2005; Desjardins, 2006); sin embargo la base molecular de esta resistencia se desconoce.

Una evidencia más que favorece la postulación de la FB1 como un factor de virulencia es la alta frecuencia con la que se aíslan, de tejido dañado, cepas de *F. verticillioides* con la habilidad de producir niveles altos de FB1 así como la presencia de niveles altos de la toxina en tejido de maíz (Nascimento et al. 2006). Por otro lado, Desjardins y colaboradores (1995) han concluido que la FB1 contribuye a la virulencia de *F. verticillioides* pues se observan síntomas más severos, como inhibición en la emergencia de plántulas así como disminución en la longitud del tallo, con cepas productoras que con cepas que no producen FB1.

Una importante evidencia genética que ha contribuido a reconocer el papel de la fumonisina en la patogenicidad se obtuvo al transformar cepas aisladas de plátano identificadas como *F. musae*, que no producen FB1 y son incapaces de colonizar plantas de maíz, con una clona genómica que contiene el cluster *FUM*. La transformación generó cepas toxigénicas capaces de infectar plántulas de maíz y causar todos los síntomas de la infección, como lesiones necróticas y atrofia en el crecimiento (Glenn et al. 2008).

Dado que uno de los blancos de la FB1 es la esfinganina *N*-acil transferasa y una de las consecuencias es la elevación de los niveles de bases esfingoideas, se ha asociado la acumulación de éstas con los síntomas y efectos de la infección. Semillas de maíz inoculadas con *F. verticillioides* productores de FB1 dan origen a plantas de menor tamaño con lesiones necróticas en las hojas e inhibición en el desarrollo de las raíces. Estos síntomas evaluados a los 7 y 21 días correlacionan positivamente con los niveles de FB1 producida *in planta* así como las bases esfingoideas acumuladas en las raíces (Williams et al. 2007). Asimismo, cuando las plántulas son regadas con una solución de FB1 23 μ M, desarrollan los mismos síntomas que los generados durante la infección con el hongo además que también se presenta una acumulación significativa en los niveles de bases esfingoideas así como de sus derivados fosforilados. Los resultados de este estudio apoyan la hipótesis de que las bases esfingoideas acumuladas median las respuestas celulares que conducen a muerte celular que se observa como los síntomas de lesiones. Estas bases esfingoideas, que se acumulan, pueden ser translocadas desde las raíces hasta las hojas cuando las plántulas de maíz se riegan con una solución de FB1 (22 μ M). Los niveles de esfinganina aumentan entre 50 y 150 veces mientras que la fitoesfingosina aumenta sólo entre 2 y 6 veces a partir de la primera hasta la segunda y tercera hoja. Estos resultados demostraron que la acumulación de las BCLs son las responsables de los síntomas pues, a diferencia de las BCL, la FB1 no es translocada y solamente se detecta en las raíces (Zitomer et al. 2010).

Asimismo, en semillas de maíz germinadas en presencia de FB1 10 μ M, se induce la acumulación de SA y la actividad de la nucleasa ZmNUC30 en las primeras 48 h de imbibición. El SA es una fitohormona relacionada con patogénesis que activa muerte celular. De igual manera, la FB1 induce la acumulación de BCL, en particular de esfinganina que aumenta 6 veces y coincide temporalmente con las máxima inducción de SA así como de la activación de ZmNUC30. Además la aplicación exógena de estas bases generan un incremento en los niveles de SA y la activación de la misma nucleasa. La aportación de este trabajo sugiere que *F. verticillioides* durante la infección de la planta de maíz al producir FB1 activa la acumulación de bases esfingoideas que a su vez activan la vía de SA que induce muerte celular y que ayuda a la proliferación del patógeno necrótrofo (de la Torre et al. 2010)

C. Respuesta de defensa en la interacción maíz - *F. verticillioides*.

C.1 Respuestas de defensa en plantas: generalidades.

Para contender contra los ataques de microorganismos patógenos, las plantas han desarrollado un mecanismo de defensa que se compone de respuestas constitutivas e inducibles (Ferreira et al. 2007). Las defensas constitutivas típicas son barreras estructurales como ceras, cutina, suberina, lignina, celulosa, calosa y proteínas de la pared celular, así como compuestos químicos preformados, como las saponinas (Ferreira et al. 2007). Cuando las defensas constitutivas no son suficientes para impedir la penetración de los patógenos, se inducen respuestas de defensa para limitar la propagación de la infección. La inducción de esta respuesta de defensa requiere del reconocimiento del patógeno y de energía para conducir a una reprogramación genética, bioquímica y metabólica. En algunas plantas, los mecanismos involucran la inducción de una muerte celular programada localizada en el sitio de infección (Lam et al. 2001). Este tipo muerte celular se llama respuesta de hipersensibilidad (HR) e incluye varios eventos como un incremento del transporte de iones, acidificación del apoplasto, generación de un estallido oxidativo, acumulación de fitoalexinas, síntesis de proteínas relacionadas a la patogénesis (PR) como β -1,3-glucanasas y quitinasas, síntesis de proteínas que refuerzan la pared celular, transcripción de genes que codifican para enzimas que intervienen en el flujo de carbono del metabolismo primario y secundario de las plantas tales como peroxidasas, lipooxigenasas, superóxido dismutasa, biosíntesis de compuestos fenólicos con actividad antimicrobiana y síntesis de hormonas como el SA, el ácido jasmónico (JA) y el etileno (ET) (Montesinos, 2000; Ferreira et al. 2007; Pieterse et al. 2009). En conjunto estos eventos transducen la señal para que de una resistencia local se genere la respuesta sistémica adquirida (SAR) a través de la planta, que confiere a largo plazo una mayor resistencia contra infecciones posteriores.

La HR generalmente es activa y efectiva contra patógenos biótropos y hemibiótropos pues limita el número de células viables donde el patógeno puede proliferar. En cambio, la HR favorece el crecimiento de patógenos con un estilo de vida necrotrófico, ya que su estrategia de virulencia se basa en su capacidad de matar a las células del hospedero (Pieterse et al. 2009).

C.2 Respuesta de defensa en la interacción maíz - *F. verticillioides*.

La incidencia de *F. verticillioides* en las semillas de maíz y la supervivencia del hongo en el suelo conducen a una alta frecuencia de infección durante la germinación y esto compromete el óptimo establecimiento de la plántula. Dada la importancia de que ocurra la infección durante la germinación, varios trabajos se han enfocado en la respuesta de defensa de la plántula de maíz en esta etapa o bien durante el desarrollo de los granos.

Semillas de maíz inoculadas con una suspensión de esporas de *F. verticillioides* presentan un aumento a las 48 h de germinación en los niveles del transcrito de una PRm (proteína relacionada a la patogénesis de maíz) que se localiza principalmente en el escutelo de las semillas (Casacuberta et al. 1991; Casacuberta et al. 1992). Asimismo, semillas de maíz de 20 h de germinación inoculadas con 50,000 esporas de *F. verticillioides* acumulan la proteína PRm en la capa de aleurona y el escutelo; además de una abundante deposición de calosa en la pared celular (Murillo et al. 1999).

En embriones de maíz infectados con *F. verticillioides* se activa en los primeros minutos la transcripción de *ZmCPK10*, una cinasa membranal dependiente de Ca^{2+} , esta activación alcanza un máximo a los 30 min después del tratamiento (Murillo et al. 2001). Además, también se comprobó, mediante hibridación *in situ*, que el aumento en los niveles de *ZmCPK10* coincide con un aumento en los transcritos de PRms lo que sugiere que esta proteína participa en la transducción de la señal una vez que ha sido reconocido el patógeno a nivel de membrana celular (Murillo et al. 1997, 2001).

Mediante estudios de proteómica se identificaron las principales proteínas cuyos niveles varían diferencialmente en embriones de maíz infectados con *F. verticillioides* durante la germinación. Los resultados mostraron una activación diferencial con respecto al control, de enzimas antioxidantes, como la superóxido dismutasa Cu/Zn, glutatión S-transferasa y catalasa. Estas enzimas normalmente protegen a las células de daño oxidativo. También se observó una activación de proteínas involucradas en el inicio de la síntesis de proteínas o aquellas que participan en el plegamiento o estabilización como las proteínas de choque térmico (HSPs). Además, se encontró un aumento en los niveles del Eif5A del inicio de la

traducción que podría estar implicado en la traducción de RNAm involucrados en la respuesta de defensa de la planta. Además se incrementan los niveles de la aldolasa y una disminución en las dos isoformas citosólicas de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, sugiriendo una alteración en el metabolismo de azúcares durante la infección. Finalmente, mediante ensayos inmunológicos utilizando anticuerpos contra proteínas PR, demostraron una inducción coordinada de la expresión de hidrolasas: las β -1,3-glucanasas y las quitinasas en el tejido infectado; sin embargo encontraron que ambas hidrolasas también se expresan de forma constitutiva, sugiriendo que forman parte de la defensa constitutiva o bien que juegan un papel fisiológico durante la germinación (Campo et al. 2004).

En otro estudio analizaron la expresión diferencial de genes, mediante microarreglos, en granos de maíz en desarrollo e infectados por *F. verticillioides* (Lanubile et al. 2010). Los genes clasificados como “de rescate celular, defensa y virulencia” comprendieron el 9% del total de genes que se sobreexpresan e incluyeron principalmente a PRs, como la quitinasa (PR3). También se encontró la sobreexpresión de genes relacionados con procesos de detoxificación como monooxigenasas de citocromo P450, peroxidasas y glutatión-S-transferasa.

En cuanto a la categoría de “metabolismo y energía”, en ambos estudios (Campo et al. 2004 y Lanubile et al. 2010) observaron una disminución en los niveles de transcrito y proteína de los genes que codifican para enzimas que participan en el metabolismo de azúcares, como la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, fosforibosil fosfato sintasa, sugiriendo que la gluconeogénesis y la glicólisis se encuentran reprimidas en esta condición (Lanubile et al. 2010). El hecho de que en estos dos reportes encontraron inducción de hidrolasas como las quitinasas y las β -1,3-glucanasas, concuerda con lo que se conoce sobre su función en la respuesta de defensa contra hongos necrótrofos (Ferreira et al. 2007).

Además, en embriones de maíz de 20 h de germinación inoculados con *F. verticillioides* se induce una forma básica (Mr 33 Kda) de β -1,-3 glucanasa mientras que otra isoforma de 35 kDa no se modifica por la infección. También, desde el primer día post-infección se inducen tres quitinasas ácidas, dos de aproximadamente 25 kDa y una tercera de 34 kDa. Este mismo patrón de expresión se observó en las raíces de plántulas infectadas por 7 días con *F. verticillioides* (Cordero et al. 1994).

En cuanto a la vías hormonales que se activan durante la interacción maíz - *F.*

verticillioides los estudios son escasos. En raíces de plántulas de maíz resistentes (GK26ZM, P343ZM y GK66) que son inoculadas con *F. verticillioides* los niveles de SA libre y conjugado aumentan 3.3 y 4.92 veces respectivamente. En contraste, en la línea susceptible (SM7ZM, Od.140 y VIR27ZM) ocurre una disminución de 4.8 y 2.14 veces en los niveles de SA y SA conjugado. Este aumento en los niveles de SA durante la infección, coincide con un aumento en la actividad de inhibidores de proteasas y lectinas (Molodchenkova et al. 2002).

D. Función de las β -1,3-glucanasas y quitinasas en la respuesta de defensa.

Las β -1,3-glucanasas y quitinasas son dos actividades hidrolíticas que se inducen durante la respuesta de defensa de las plantas principalmente ante el ataque de hongos filamentosos pues el blanco de estas enzimas son los componentes estructurales de la pared celular de los hongos (Ferreira et al. 2009). La pared celular fúngica está compuesta básicamente por polisacáridos y proteínas. Entre los polisacáridos destacan la quitina, el glucano y el manano por lo que la alteración de esta estructura puede afectar profundamente la morfología, fisiología fúngica y, por lo tanto, la capacidad de penetración y colonización. La quitina es un polisacárido insoluble formado por unidades de N-acetilglucosamina (GlcNAc) (Fig. 4) y el contenido de ésta varía en la pared celular, pero puede ser hasta el 10-20% del peso seco. El glucano es el polisacárido estructural más importante de la pared celular porque representa el 50-60% del peso seco y está formado por monómeros de glucosa unidos por enlaces glucosídicos β -1,6 si es β -1,6-glucano o bien enlaces β -1,3 si es β -1,3- glucano (Fig. 4). El β -1,3-glucano se sintetiza por un complejo de enzimas situado en la membrana plasmática, denominadas glucan-sintetasas. Estas enzimas catalizan la formación de cadenas lineales de glucano compuestas por aproximadamente 1500 residuos de glucosa unidos por enlaces β -1,3. En estas cadenas, cada 40-50 residuos de glucosa se unen nuevas unidades de glucosa por enlaces β -1,3 para dar lugar a una estructura ramificada. Estas ramificaciones pueden unirse a otros glucanos, a la quitina o a las glicoproteínas proporcionando a la pared celular una gran resistencia mecánica para mantener la integridad celular. Las proteínas representan el 20-30% del peso seco de la pared de los hongos filamentosos y la mayoría están asociadas a glúcidos formando glicoproteínas (Pontón, 2008).

D.1 Quitinasas.

Las quitinasas catalizan la hidrólisis de los enlaces β -1,4-glucosídicos presentes en la quitina (Fig. 4). La quitina, después de la celulosa, es el biopolímero más abundante en la naturaleza y se encuentra distribuido entre los hongos, nemátodos, crustáceos e insectos con funciones principalmente estructurales. Las quitinasas son producidas por la mayoría de los organismos, incluyendo aquellos que no poseen quitina, tal es el caso de las plantas y los animales en donde su producción se ha asociado principalmente con una respuesta de defensa ante el ataque de organismos patógenos (Collinge et al. 1993; Kasprzewska 2003). En las plantas también se inducen bajo diversos tipos de estrés como el osmótico, la sequía, la salinidad, herida y frío (Hamel y Bellemare, 1995; Cohen-Kupiec y Chet 1998; Yeh, S et al. 2000) al igual que durante el crecimiento y procesos de desarrollo (van der Holst et al. 2001; Kasprzewska, 2003)

D.1.1 Clasificación

Las quitinasas pertenecen a las familias 18 y 19 de las 57 familias del tipo O-glicósido hidrolasas (Henrissat y Bairoch, 1996). Se clasifican en dos grandes categorías de acuerdo al sitio donde ocurre la reacción de hidrólisis en el sustrato: en endoquitinas y exoquitinas. Las endoquitinas (EC 3.2.1.14) hidrolizan al azar enlaces β -1,4-glucosídicos internos, generando multímeros solubles de bajo peso molecular de GlcNAc como quitotetrosa, quitotriosa y el dímero di-acetilquitobiosa (Sahai y Manoch, 1993). Las exoquitinas se pueden dividir en dos subcategorías: las quitobiosidasas (EC 3.2.1.29) que catalizan la liberación de residuos de di-acetilquitobiosa comenzando por el extremo no reductor de la quitina y las β -1,4 N-glucosaminosidasas (EC 3.2.1.30) que se unen a los productos oligoméricos de endoquitinas y quitobiosidasas generando monómeros de GlcNAc (Sahai y Manoch, 1993). Las quitinasas tienen un peso molecular aproximado entre 25 y 36 kDa y pueden ser ácidas o básicas. Otra clasificación de estas enzimas se basa en las características de la secuencia primaria que puede diferenciarse en el dominio catalítico, en la presencia o ausencia de péptido señal que las dirige a vacuola o al espacio extracelular, así como en su naturaleza ácida o básica. Esta clasificación las

agrupa en por lo menos 4 clases diferentes (Punja y Zhang 1993; Araki y Torikata 1995; Kasprzewska, 2003).

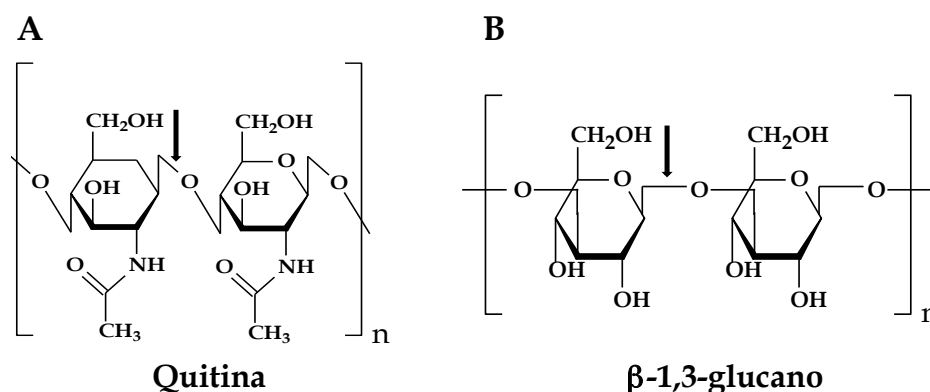


Figura 4. Estructura parcial de la quitina (A) y del β -1,3-glucano (B) que muestra la unión de dos monosacáridos, el tipo de enlace y el sitio de corte indicado por las flechas de las quitinasas y β -1,3-glucanasas.

D.1.2 Función de las quitinasas en la respuesta de defensa en plantas.

El concepto de proteínas relacionadas con la patogénesis (PR) se introdujo en 1980 (Antoniw et al.) para designar a cualquier proteína sintetizada por las plantas en respuesta a la infección (van Loon et al. 2006). Las proteínas PR se han clasificado hasta ahora en 17 clases (Tabla 3) y se agrupan de acuerdo a sus características de secuencia primaria, relaciones serológicas, enzimáticas ó biológicas (Somssich y Hahlbrock, 1998; van Loon et al; 2006) el número de familia sólo indica el orden en el cual han sido identificadas. Las quitinasas se encuentran agrupadas dentro de las familias PR-3, PR-8 y PR-11.

Tabla 3. Familias de las proteínas relacionadas a patogénesis (PR). Se presenta el miembro representativo, la función, cuando se conoce y el rango de peso molecular de las proteínas caracterizadas.

Familia	Miembro representativo	Función	Rango de peso molecular (kDa)
PR-1	PR-1 ^a de tabaco	Desconocida	15-17
PR-2	PR-2 de tabaco	β -1,3-glucanasa	30-41
PR-3	P y Q de tabaco	Quitinasas clase I, II, IV, VI y VIII	35-46
PR-4	R de tabaco	Proteínas de unión a quitina	13-14
PR-5	S de tabaco	Tipo taumatina	16-26
PR-6	Inhibidor I de tomate	Inhibidor de proteínasa	8-22
PR-7	P ₆₉ de tomate	Endoproteínasa	69
PR-8	Quitinasa de calabaza	Quitinasa clase III	30-35
PR-9	Peroxidasa de tabaco	Peroxidasa	50-70
PR-10	PR-1 de perejil	Ribonucleasa	18-19
PR-11	Quitinasa clase V de tabaco	Quitinasa clase V	40
PR-12	Rs-AFP3 de perejil	Defensinas	5
PR-13	THI-2.1 de <i>Arabidopsis</i>	Tioninas	5-7
PR-14	LTP4 de cebada	Proteínas de transferencia de lípidos	9
PR-15	OxOa de cebada	Oxalato oxidasa	22-25
PR-16	OxOLP de cebada	Tipo de oxalato oxidasa	100 (hexámero)
PR-17	Prp27 de tabaco	Desconocida	?

Tomada de Ferreira et al. 2009

Las quitinasas de plantas se expresan constitutivamente o bien de manera inducible en tejidos expuestos a la infección (Bishop et al. 2000). Las líneas de evidencia que indican que las quitinasas tienen un papel directo en la defensa son: 1) los niveles de estas PRs aumentan durante el ataque por patógenos y esta inducción ocurre a nivel de transcrito y de actividad (Punja y Zhang 1993; Derckel et al. 1999). 2) Estudios *in vitro* han demostrado que las quitinasas poseen un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de hongos (Mauch et al. 1988; Collingel et al. 1993; Sela-Burlage et al. 1993). 3) Plantas transgénicas que sobreexpresan estas PRs generan mayor resistencia a patógenos *in vivo* (Jach et al. 1995; Mauch et al. 1998). Finalmente, una última evidencia de la participación de las quitinasas en la respuesta de defensa es que los oligosacáridos derivados de la hidrólisis de la quitina actúan como elicitores induciendo varios eventos característicos de una respuesta de defensa como cambios en el potencial electroquímico de la membrana, flujo de iones, expresión de genes de defensa y cambios metabólicos incluyendo producción de especies reactivas de oxígeno y fitoalexinas en arroz, trigo, tomate, soya y *Arabidopsis* (Yamada et al. 1993; Kuchitsu et al. 1997; Vander et al. 1998; Félix et al. 1993; Zhang et al. 2002).

Collinge (1993) y Kasprzewska (2003) han sugerido que las quitinasas durante la respuesta de defensa cumplen una doble función: en la primera etapa de la

patogénesis las quitinasas apoplásticas generan oligosacáridos con función elicitora que activan mecanismos de señalización que conducen a respuestas de defensa, como la inducción de las quitinasas vacuolares, que principalmente participan en inhibir el crecimiento del patógeno en etapas avanzadas de la infección; esta hipótesis se ha formulado tomando en cuenta principalmente la especificidad de sustrato y los efectos inhibitorios sobre el crecimiento de patógenos que tienen las distintas quitinasas.

D.1.3 Regulación de las quitinasas en la patogénesis.

Las evidencias experimentales muestran que las quitinasas ácidas se inducen por SA, mientras que las quitinasas básicas se inducen por ET ó JA (Boller et al. 1983; Samac et al. 1990; Thomma et al. 1998). Hasta ahora se conoce mejor el mecanismo por el cual el ET induce la actividad de estas proteínas pues en los promotores de los genes de algunas quitinasas, sobre todo las de naturaleza básica, se han encontrado cajas GCC muy conservadas; que son elementos de respuesta a etileno (ERE) en donde se unen factores transcripcionales del tipo EREBPs (Ethylene-Responsive-Element-Binding-Proteins) que activan su expresión (Hao et al. 1998). Aún cuando hay evidencia de una asociación entre la producción del SA y la inducción de algunas quitinasas, el mecanismo molecular se desconoce.

D.2 β -1,3-glucanasas.

Las β -glucano hidrolasas de plantas se dividen en tres grupos principales: las β -1,3-glucanasas (EC 3.2.1.39), las β -(1,3-1,4)-glucanasas (EC 3.2.1.73) y las β -1,4-glucanasas o endocelulasas (EC 3.2.1.4). La especificidad de sustrato de estas hidrolasas es muy alta, por ejemplo, las β -1,3-glucanasas catalizan la hidrólisis de los enlaces β -1,3-glucosil pero solo cuando están presentes varios enlaces de este tipo de manera contigua. Las β -1,3-glucanasas no hidrolizan los enlaces β -1,3-glucosil que se encuentran en los β -(1,3-1,4)-glucanos. De manera similar las β -(1,3-1,4)-glucanasas para llevar a cabo su actividad hidrolítica requieren que los enlaces 1,3 y 1,4 se encuentren adyacentes (Hoj y Fincher, 1995).

El principal sustrato de las β -1,3-glucanasas son los enlaces β -1,3-*D*-

glucosídicos de los β -1,3-glucanos, que son componentes importantes de la pared celular de hongos filamentosos; así que a estas enzimas se les ha adjudicado un papel fundamental durante la respuesta de defensa y forman parte de la familia 2 de las PRs (Tabla 3). Debido a que en dicotiledóneas los β -1,3-glucanos también forman parte de la pared celular, la arquitectura de ésta es modificada por las β -1,3-glucanasas en procesos fisiológicos como división celular, germinación del polen y crecimiento del tubo polínico, microsporogénesis, embriogénesis, germinación y movilización de reservas (Hoj y Fincher, 1995; Leubner-Metzger, 2003). En monocotiledóneas como los cereales (familia *Poaceae*) ha sido difícil relacionar a las β -1,3-glucanasas con otras funciones además de la defensa, pues la mayoría de los glucanos endógenos se encuentran en forma de β -(1,3-1,4)-glucanos que no es sustrato de las β -1,3-glucanasas (Hoj y Fincher, 1995; Carpita, 1996). Las β -1,3-glucanasas existen como diferentes isoformas que difieren en tamaño, punto isoelectrico, estructura primaria, localización celular y patrones de regulación (Leubner-Metzger y Meins, 1999).

D.2.1 Clasificación.

Las β -1,3-glucanasas se clasifican en tres clases, tomando como miembros representativos a las β -1,3-glucanasas de *Nicotiana tabacum* y considerando principalmente las características de la secuencia primaria y localización celular (Ferreira et al. 2007). La clase I agrupa a las PR-2e que son proteínas básicas y que se localizan en la vacuola. Son producidas como precursores con un péptido señal de naturaleza hidrofóbica hacia la región amino terminal y están N-glicosiladas hacia la región carboxilo terminal. La proteína inmadura se transporta desde el retículo endoplásmico hacia la vacuola vía el aparato de Golgi donde la proteína madura de 33 kDa ya no está glicosilada (Sticher et al; 1992). Los miembros de la clase II y III se secretan al espacio extracelular; son proteínas ácidas sin una extensión hacia el carboxilo terminal y tienen un peso molecular entre 34 y 36 kDa; los miembros representativos son PR-1, PR-N y PR-O.

D.2.2 Función de las β -1,3-glucanasas en la respuesta de defensa en plantas.

Las evidencias de la participación de las β -1,3-glucanasas en la defensa prácticamente son las mismas que para las quitinasas que se documentaron en el apartado D1.2. Las β -1,3-glucanasas también tienen una función dual en la defensa pues actúan directamente degradando la pared celular para inhibir el crecimiento del hongo, e indirectamente promoviendo la liberación de materiales derivados de la pared celular que funcionan como elicitores que activan respuestas de defensa (Ferreira et al. 2007; Leubner-Metzger y Meins, 1999).

Los estudios *in vitro* del efecto antifúngico de diferentes isoformas de β -1,3-glucanasas han revelado que estas PRs actúan sinérgicamente con las quitinasas; por ejemplo, las isoformas vacuolares de ambas PRs son más efectivas cuando se aplican conjuntamente en un cultivo de *F. solani*, promoviendo la lisis de las hifas e inhibiendo el crecimiento (Sela-Buurlage, 1993); además las β -1,3-glucanasas apoplásticas de la clase II poseen actividad antifúngica solamente cuando se aplican en combinación con quitinasas vacuolares (Theis y Stahl, 2004). Este mismo comportamiento antifúngico de las diferentes isoformas de PRs se ha observado en cultivos de *Alternaria solani*, *Trichoderma viride* y *Phytophthora infestans* (Lawrence et al. 1996). La actividad sinérgica de estas dos hidrolasas se ha demostrado también en plantas transgénicas que expresan constitutivamente β -1,3-glucanasas y quitinasas. Por ejemplo, plantas de tomate que expresan constitutivamente ambas enzimas muestran una marcada reducción en los síntomas a la infección de *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* como marchitamiento del tejido vascular y clorosis en hojas; mientras que la expresión de manera individual no es tan efectiva para disminuir estos síntomas (Jongedik et al. 1995). Asimismo, plantas de tabaco que expresan el transgen de una quitinasa de frijol de la clase I, muestran una menor susceptibilidad al patógeno *Rhizoctonia solani*, y este efecto aumenta cuando, además del gen de quitinasa, se transforma con un transgen de una β -1,3-glucanasa clase II de cebada (Broglie et al. 1991; Jach et al. 1995).

D.2.2.1 Oligosacáridos derivados de β -glucano y su relación con la patogénesis.

Las β -1,3-glucanasas, además de inhibir el crecimiento del patógeno y evitar una rápida colonización generan oligosacáridos con función elicitora derivados del β -1,3-glucano. Una evidencia es el trabajo de Klarzynski et al. (2000) pues al infiltrar hojas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) con laminarina, un polímero de β -1,3-glucano a una concentración de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ la planta induce la alcalinización del medio extracelular, la producción de especies reactivas de oxígeno, inducción de la fenilalanina amonio liasa (PAL), aumento en los niveles de ácido salicílico (SA) e inducción de los genes *PR1*, *PR-2*, *PR-3* y *PR-5*. La unidad mínima para generar todas estas respuestas es la laminaripentosa, un oligómero formado por 5 unidades de glucosa unidos por enlaces tipo β -1,3. Además, las hojas infiltradas con laminarina responden eficientemente al reto con *Erwinia carotovora* subs *carotovora*, y dan el fenotipo de resistencia al patógeno. De igual forma en cultivos de células de uva (*Vitis vinifera* L.) la laminarina activa el flujo de iones, genera un estallido oxidativo, la activación de dos MAPKs, la expresión de 10 genes relacionados con defensa y la producción de dos fitoalexinas. Asimismo, las plantas pretratadas con laminarina presentan una reducción del 55% en la infección de *Botrytis cinerea* y un 75% de reducción para la infección del patógeno *Plasmopara viticola* (Aziz et al. 2003).

En monocotiledóneas, la información sobre el efecto de los oligosacáridos es escasa: en un cultivo de células de arroz la laminarihexosa estimula la actividad de quitinasas y un aumento en la actividad de PAL (Inui et al. 1997). También un pentasacárido derivado de *Magnaporthe grisea* induce la producción de fitoalexinas a una concentración 10 nM en células de arroz en suspensión (Yamaguchi et al. 2000).

D.2.3 Funciones de las β -1,3-glucanasas en plantas durante la germinación.

Se ha demostrado que las β -1,3-glucanasas contribuyen a la regulación de la latencia, maduración y germinación en semillas de dicotiledóneas (Leubner-Metzger, 2003; Wu et al. 2000). El primer indicio de la participación de una β -1,3-glucanasa en la germinación de la semilla fue el hecho que aumentan los niveles de RNAm, de

proteína y de actividad de una β -1,3-glucanasa de la clase I (β Glu I) durante la germinación de semillas de *Nicotiana tabacum* L. cv Havana (Leubner-Metzger, et al. 1995). Este incremento se da después de la ruptura de la testa y justo antes de la ruptura del endospermo y la proteína se localiza exclusivamente en el endospermo micropilar que es el sitio donde emerge la radícula; de igual forma se observó este fenómeno en tomate (Wu et al. 2000). Durante la germinación de semillas de tabaco se requiere la actividad de las β -1,3- glucanasas para degradar el material de las diferentes capas que cubren al embrión, dando como resultado el debilitamiento del endospermo y promoviendo la protrusión radicular. También es posible que la actividad de β -1,3-glucanasa se requiera para hidrolizar la calosa que está formada por β -1,3-glucano que se deposita entre la membrana plasmática y la pared celular.

D.3 Las hidrolasas de plantas como blanco de patógenos.

Las plantas y los patógenos evolucionan continuamente para desarrollar nuevas estrategias que les permitan ser más efectivos durante sus interacciones; por un lado, la planta genera nuevas respuestas de defensa mientras que los patógenos desarrollan estrategias para evadirlas o contrarestarlas. Un blanco importante son las hidrolasas secretadas por las plantas. Tal es el caso del inhibidor GIP1 secretado por *Phytophthora sojae* durante la infección de plantas de soya. Este inhibidor de naturaleza proteica tiene actividad específica contra una isoforma de β -1,3-glucanasa de soya pues es incapaz de inhibir otras β -1,3-glucanasas del mismo hospedero o bien de tabaco. Las actividades mayoritarias de glucanasas básicas en soya son la EnGL_{soy}-A y la EnGL_{soy}-B. Mientras que la primera se expresa constitutivamente, la EnGL_{soy}-B sólo se induce por la infección del oomiceto (Ham et al. 1997). GIP1 forma una complejo multimérico estable con EnGL_{soy}-A que inhibe a la enzima con una IC₅₀ aproximada de 0.85 nM, además, esta inhibición reduce los niveles de oligosacáridos que se generan (Rose et al. 2002).

GIP1 muestra similitud con proteasas de serina aunque carece de la triada catalítica característica de estas enzimas, por lo tanto no posee actividad proteolítica y por ensayos *in silico* se han identificado en el genoma de *Phytophthora sojae* al menos otros dos genes con similitud a GIP1, identificados como GIP2 y GIP3 (Rose et al.

2002). Otro ejemplo de la inhibición de estas hidrolasas lo representa la interacción maíz - *Bipolaris zeicola*. El hongo patógeno secreta la proteína Bz-cmp (54 kDa) que modifica la quitinasa ChiA de maíz generando una enzima con menor afinidad a su sustrato. Durante la infección disminuye la actividad de dos quitinasas de maíz con respecto al control. Estas dos quitinasas son isoformas básicas de ChiA, con un peso molecular aproximado de 28 kDa. Al incubar las ChiA purificadas con la proteína Bz-cmp *B. zeicola* se genera una modificación en ChiA que resultó en un mayor corrimiento electroforético. Aún cuando se desconoce la naturaleza de esta modificación lo que se produce es una quitinasa con baja afinidad por su sustrato disminuyendo por tanto su actividad (Naumann et al. 2010).

III. HIPÓTESIS

La producción de la toxina fumonisina B1 en *Fusarium verticillioides* contribuye a la infección de éste al modular mecanismos moleculares de defensa en la planta hospedera.

IV. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Aportar evidencia del papel de la toxina FB1 como factor de virulencia en la interacción maíz-*Fusarium verticillioides*.

OBJETIVOS PARTICULARES

- ⊗ Establecer el método de inoculación de *F. verticillioides* en los embriones de maíz durante la germinación.
- ⊗ Evaluar la cantidad de FB1 producida por *F. verticillioides* durante etapas tempranas de la infección en los embriones de maíz.
- ⊗ Analizar el perfil temporal de actividad de dos hidrolasas relacionadas con la patogénesis: las quitinasas y las β -1,3-glucanasas en los embriones de maíz infectados con *F. verticillioides*.
- ⊗ Analizar el perfil temporal de actividad de quitinasas y β -1,3-glucanasas en los embriones de maíz germinados en presencia de FB1.
- ⊗ Determinar si la FB1 es responsable de modular la actividad de quitinasas y/o β -1,3-glucanasas.

- ② Explorar si la modulación en la actividad de alguna de las hidrolasas evaluadas depende de una vía relacionada con la acumulación de bases esfingoideas y ácido salicílico.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Material biológico y reactivos empleados.

Los embriones de maíz se obtuvieron manualmente con una navaja de un solo filo de semillas secas de maíz (raza "Chalqueño" originario de Chalco, México).

La cepa MY3 de *Fusarium verticillioides* se caracterizó previamente como una cepa que produce altos niveles de FB1 (1.7 mg / g sustrato) (Sánchez-Rangel et al. 2005).

La fumonisina B1, el ácido 2,6-dicloroisonicotínico (INA) y el Metil Jasmonato (MeJA) se adquirieron en Sigma (F1147, 20629HC y 00131JE respectivamente). Se prepararon soluciones stock de cada una de los reactivos de la siguiente manera: una solución stock de FB1 1 mM en H₂O, una solución 500 mM de INA en etanol absoluto y 100 mM de metil jasmonato también en etanol absoluto.

En matraces erlenmeyer de 50 mL se prepararon 25 mL o 10 mL de agar al 1% (p/v) y se esterilizaron por 20 min. Una vez que el agar al 1% alcanzó una temperatura entre 45 y 50° C se mezclaron con los volúmenes necesarios de FB1, INA o MeJA para obtener una concentración final de 20 µM, 300 µM y 100 µM respectivamente. El agar al 1% adicionado con el reactivo se vertió en una caja petri de 7 cm de diámetro y una vez polimerizado el agar, se distribuyeron aproximadamente 25 embriones de maíz previamente desinfectados como se describe en el apartado B.2 .

B. Infección de los embriones de maiz.

B.1 Obtención de la suspensión de conidias.

A partir de las cepas preservadas en tierra estéril, se tomaron aproximadamente 200 mg de este sustrato y se sembraron en medio papa dextrosa agar (PDA Sigma). Los cultivos se incubaron por 5 a 7 días a temperatura ambiente bajo luz blanca fluorescente con la finalidad de promover la esporulación. Para coleccionar las esporas, se agregaron 5 mL de agua estéril en cada caja y se agitaron en un agitador orbital durante 30 min a temperatura ambiente. La suspensión se colectó en tubos eppendorf estériles de 2 mL y se centrifugaron en una microfuga (Minispin

eppendorf) a 13, 400 rpm por 15 min, el sobrenadante se decantó y el botón (conidias) se lavó dos veces con agua estéril. El botón se resuspendió en 1 mL de agua estéril y el número de esporas se determinó con un hematocitómetro (Sigma) mediante la cuenta directa utilizando un microscopio óptico en un aumento de 40X (Olympus, modelo CH30). Al final se ajustó la suspensión de conidias a una concentración de 5×10^6 conidias / mL.

B.2 Inoculación de los embriones de maíz con la suspensión de conidias de *Fusarium*.

Los embriones de maíz se desinfectaron por inmersión en una solución de hipoclorito de sodio (0.5%, v/v) en un frasco con tapa y se agitaron vigorosamente por 2 min, seguido de 3 lavados con agua estéril de 2 min cada uno. Los embriones de maíz se dejaron secar sobre papel filtro y se distribuyeron aproximadamente 25 embriones por caja Petri (de 7 cm de diámetro) que contenían agar al 1% (p/v). Para la inoculación, a cada uno de los embriones se les aplicó en la superficie 10 μ L de la suspensión de conidias (5×10^6 conidias / mL), para los embriones control, se les aplicó 10 μ L de agua estéril. Los embriones inoculados se incubaron bajo luz blanca fluorescente por el tiempo post infección deseado siendo el tiempo máximo de 30 hpi.

B. 3 Conteo de conidias.

Una vez transcurrido el tiempo post infección, cada embrión se depositó en un tubo eppendorf estéril de 2 mL y se agregó 1 mL de agua estéril. Se colocaron en un agitador (Eppendorf Mixer 5432) por 1 h y se contaron las conidias totales por embrión mediante el hematocitómetro como se describió en el apartado 2.1.

C. Extracción de proteína soluble total para determinar la actividad de quitinasa y β -1,3-glucanasa.

Se extrajo la proteína soluble a partir de los embriones de maíz infectados y no infectados o bien imbibidos en presencia de FB1 20 μ M, INA 300 μ M o MeJA 100 μ M. Para procesar cada muestra se congelaron con nitrógeno líquido en un mortero

entre 10 y 12 embriones (aproximadamente 1.5 g), se pulverizó el tejido hasta obtener un polvo fino, se mezcló con 2 mL de buffer de extracción y se distribuyó en tubos eppendorf de 2 mL con ayuda de una espátula. La composición del buffer de extracción se muestra en la Tabla 4. El homogenado se centrifugó a 13, 400 en una microfuga (Minispin eppendorf) por 30 min a 4° C y se tomó el sobrenadante que se conservó a -70° C. Se cuantificó la proteína total mediante el método colorimétrico de Bradford et al. (1976) que se fundamenta en la unión del azul de Coomassie a las proteínas mediante interacciones no covalentes. Se mezclaron de 2 a 5 µL de extracto proteico, 200 µL de reactivo de Bradford (Bio-Rad Protein Assay) y cbp 1 mL de H₂O desionizada. La absorbancia se determinó a una $\lambda=595$ nm utilizando albúmina sérica bovina (BSA 3 mg/mL) como estándar y contruyendo una curva patrón en un intervalo de 3 a 24 µg.

Tabla 4. Componentes del buffer de extracción de proteína soluble a partir de embriones de maíz.

Reactivo	Concentración final
Acetato de sodio pH=5.0	0.05 M
Sacarosa	250 mM
β -mercaptoetanol	5 mM
EDTA	10 mM
Polivinilpirrolidona	1%

También se agregó cocktail de proteasas (ROCHE) en una proporción 1:50 de buffer de extracción. Cada tableta de cocktail de proteasas se disuelve en 1 mL de H₂O.

D. Ensayo espectrofotométrico para la determinación de actividad total de quitinasa.

Para la actividad de exoquitinasa también identificada como actividad de β -N-acetilglucosaminidasa (EC 3.2.1.52) se siguió el protocolo reportado por Murata et al. (2005) con algunas modificaciones. Se incubaron 20 µg de proteína total a 40 °C por 15 min en un tubo eppendorf de 0.5 mL con el sustrato *p*-nitrofenil N-acetil- β -D-glucosaminida (Sigma, N9376) a una concentración 2.5 mM en 0.3 mL de buffer de fosfato de sodio 50 mM pH=5.8. La reacción se detuvo adicionando 0.1 mL de Na₂CO₃ 1 M. La cantidad de *p*-nitrofenol liberado por acción de las quitinasas que se encuentren en el extracto proteico se determinó por la medición de la absorbancia a una $\lambda=405$ nm en un lector de microplacas Labsystems Multiskan modelo MCC/340. Los resultados se reportan como ng nitrofenol / mg min.

E. Ensayo espectrofotométrico para la determinación de actividad total de β -1,3-glucanasa.

Se siguió el protocolo establecido por Hassaim y Lepoivre (1998) con pocas modificaciones. Se incubaron 20 μ g de proteína total a 40° C por 30 min en 0.25 mL de buffer de acetato de sodio 50 mM pH=5.0 conteniendo el sustrato laminarina (Sigma L9634) a una concentración de 2.5 mg/mL. Transcurrido el periodo de incubación, se tomaron 25 μ L de la mezcla de reacción y se mezclaron con 200 μ L de reactivo de glucosa (Sigma G3293). El reactivo de glucosa contiene ATP 1 mM, NAD⁺ 1.5 mM y las enzimas hexocinasa 1 U/ mL y glucosa 6-fosfato deshidrogenasa 1 U/ mL. La cantidad de NADH liberado se determinó mediante la medición espectrofotométrica a una λ =340 nm utilizando un lector de microplacas Labsystems Multiskan modelo MCC/340. El fundamento de este ensayo es que la glucosa liberada por acción de las β -1,3-glucanasas que se encuentren en el extracto proteico se fosforilan por acción de la hexocinasa. La glucosa fosforilada es sustrato entonces de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y se produce NADH el cual se detecta espectrofotométricamente. Los resultados se reportan como mg glucosa / mg h.

F. Ensayo para la determinación de la actividad de las distintas isoformas de β -1,3-glucanasas en geles nativos.

La mezcla de proteínas se resolvió por electroforesis en geles de poliacrilamida al 12% en condiciones nativas (sin SDS y agentes reductores). El gel separador y el concentrador se prepararon de acuerdo a los componentes descritos en la tabla 5 y utilizando separadores de 0.75 mm.

Tabla 5. Componentes de los geles separador y concentrador para los geles nativos de actividad.

Reactivo Stock	Gel separador [] final	Gel concentrador [] final
Trizma base 2 M pH= 8.8	0.5 M	0.5 M
Glicerol	20 %	10 %
TEMED	0.1 %	0.1%
Persulfato de amonio 10%	0.1%	0.1%

De cada muestra se cargó en el gel nativo un volumen equivalente a 120-150 μg de proteína total mezclado con el amortiguador de carga en una proporción 1:4. El gel se corrió en una cámara de electroforesis Hoefer Amersham Biosciences (SE 245 Dual Gel Caster) a 60-70 V por 12 h o bien a 120-150 V por 5 h a 4° C en presencia del buffer de corrida (Tris 25 mM, glicina 192 mM), es necesario que el azul de bromofenol salga del gel y continúe la electroforesis. El gel se desprendió cuidadosamente de los vidrios y se colocó en un recipiente con 5 mL de solución de laminarina (Sigma L9634) (2.5 mg/mL) en buffer de acetato de potasio 0.05M pH=5 y se incubó por 2 h a 40° C con agitación suave y constante. Para revelar la actividad se siguió el protocolo de Pan et al (1989) con algunas modificaciones. Transcurrido el tiempo de incubación, se decantó la solución anterior y se realizó un lavado de 5 min con buffer de K_2HPO_4 50 mM pH=7.0 seguido de otro lavado de 5 min con agua desionizada. Se decantó el agua y se agregaron 5 mL de reactivo de glucosa (Sigma G3293) y se incubó por 20 min a temperatura ambiente con agitación suave y constante. Para el desarrollo del color se añadió a la solución anterior 0.25 mg de azul de tetrazolio por cada mL de medio de reacción y se incubó a 37° C, las bandas de color púrpura aparecen aproximadamente entre 1 y 2 h. El fundamento del ensayo es el mismo que se describió en el apartado 5, sólo que el NADH formado en este ensayo reduce el NBT y éste se precipita en formazan y por tanto se visualizan las bandas color púrpura.

Para el control de cargado, se realizó una réplica de los geles de actividad pero cargando 10-15 μg de proteína total que se resolvieron en condiciones desnaturalizantes de acuerdo al método de Laemmli (1970), utilizando 4% (p/v) de acrilamida para el gel concentrador y 12% (p/v) de acrilamida para el gel separador. Para la tinción se utilizó la solución teñidora Simply Blue SafeStain (Invitrogen LC6060) en agua destilada y se siguió el protocolo que describe el fabricante.

F.1 Efecto de la FB1 en la actividad de β -1,3-glucanasas de maíz en geles nativos.

Para determinar el efecto de la FB1 sobre la actividad de las distintas isoformas de β -1,3-glucanasa en geles nativos, se siguieron los pasos descritos en el apartado 6 con la única modificación que antes de la incubación con el sustrato, se incubó a temperatura ambiente con agitación suave por 20 min en presencia de FB1

(10 a 100 μM) o una cantidad equivalente en mL de agua para el control, mezclados en 3 a 5 mL de buffer de acetato de sodio 0.05 mM pH=5. Transcurrida esta incubación, se decantó la solución anterior y se incubó con el sustrato también adicionando FB1 a la concentración deseada.

F.2 Purificación parcial de las isoformas de β -1,3-glucanasas.

Para la purificación parcial de las isoformas de β -1,3-glucanasas a partir de geles nativos, las regiones correspondientes a las isoformas I y II/III se cortaron y se electroeluyeron en condiciones nativas utilizando el buffer compuesto por Tris 25 mM y glicina 192 mM en un electroeluctor Bio-Rad 422 de acuerdo a las condiciones de tiempo y voltaje especificadas por el proveedor y a 4° C. La solución colectada (aproximadamente de 6 geles nativos), se concentró en un volumen final de 300-400 μL por medio de tubos Amicon Ultra 10K (Millipore).

G. Isoelectroenfoque en condiciones nativas.

Las proteínas se resolvieron en geles de poliacrilamida al 5% que contenían anfolinas al 2.4% en un rango de pH= 3 a 10 (Bio Rad 163-112). Se tomó un volumen de la muestra equivalente a 350 μg de proteína total y se mezcló con un volumen igual de buffer de muestra (glicerol:anfolinas pH=3-10: H₂O 60: 4: 36 v/v/v). El isoelectroenfoque se realizó en una cámara de electroforesis Hoefer Amersham Biosciences (SE 245 Dual Gel Caster) y se corrió por 1.5 h a 200 V y por 1.5 h a 400 V en presencia de las soluciones para el cátodo y ánodo que estuvieron compuestas por NaOH 20 mM y H₃PO₄ 10 mM respectivamente. Para revelar la actividad, el gel se desprendió cuidadosamente de los vidrios y se lavó por 5 min con H₂O con agitación suave seguido de otro lavado de 30 min en presencia de acetato de potasio 0.05 M pH=5.0 y después se siguieron los pasos descritos en el apartado 6.

H. Extracción de fumonisina B1 y su cuantificación por HPLC.

Se recolectaron 50 embriones de maíz por muestra (\approx 6.5 g) que se pulverizaron en un mortero en presencia de nitrógeno líquido, el tejido se transfirió a un tubo Falcon de 50 mL y se rehidrató con 15 mL de acetonitrilo: agua (1:1; v/v).

Los tubos se incubaron a temperatura ambiente por 12 h y posteriormente se agitaron en un agitador orbital (200 rpm) por 4 h a temperatura ambiente. Se centrifugó por 20 min a 3, 600 rpm en una centrífuga Beckman (GS-6R). El sobrenadante se evaporó hasta sequedad bajo corriente de nitrógeno y se resuspendió en 200 μ L de acetonitrilo:agua (1:1; v/v). El análisis por HPLC se realizó de acuerdo a lo reportado por Sydenham et al. (1992) realizando algunas modificaciones. Se utilizó un cromatógrafo Shimadzu compuesto por una bomba modelo LC-10ADVP, detector de fluorescencia RF-10AXL y procesador de datos modelo C-R5A. La separación de la muestra se realizó por fase reversa en una columna SuperCosil LC-18-Si de 15 cm \times 4.6 mm y un tamaño de partícula de 5 μ m. La fase móvil utilizada fue una mezcla de metanol grado HPLC y buffer de fosfatos (NaH_2PO_4 0.1 M pH=3.0) en una proporción 70:30 (v/v). Las fumonisinas se derivatizaron con el reactivo *o*-ftaldialdehído (OPA, Sigma) que se debe preparar justo el día del análisis [2 mg de OPA se disuelve en 400 μ L de metanol y 3 μ L de 2- β -mercaptoetanol en 2 mL de buffer de boratos 50 mM, pH=9.7]. Los derivados se prepararon de la siguiente forma: se mezclaron 10 μ L de muestra con 50 μ L de OPA en un vial de vidrio de 2 mL y se incubó a temperatura ambiente por 3 min; posteriormente se agregaron 400 μ L de ACN:H₂O (1:1 v/v) y se almacenaron los tubos en hielo, antes de inyectar se deben realizar las diluciones pertinentes con ACN:H₂O (1:1). Se utilizó un estándar de fumonisina B1 (Sigma) para preparar una solución 50 mM en agua y se tomaron diferentes alícuotas para construir curvas patrón en un intervalo de 31 a 250 fmoles.

I. Extracción de bases esfingoides libres y su cuantificación por HPLC.

Se extrajeron las bases esfingoideas libres a partir de embriones germinados en presencia o ausencia de FB1 20 μ M de acuerdo al método de Markham et al. (2006) con algunas modificaciones. Aproximadamente se tomaron 10 a 15 embriones de maíz por tiempo y se pulverizaron con nitrógeno líquido, el tejido pulverizado se transfirió a un tubo Pyrex y se resuspendió en 5 mL de una mezcla de solventes compuesta por propanol:hexano:agua (55:20:25 v/v/v) adicionando 1 nmol del estándar interno (C20-dihidroesfingosina) y se incubó por 15 min a 60°C. Una vez transcurrido el tiempo se centrifugó a 3, 600 rpm en una centrífuga GS-6R Beckman y la extracción se repitió con 3 mL de la mezcla de solventes. La fase orgánica se

evaporó bajo un flujo de nitrógeno y una vez que se alcanzó la sequedad se adicionaron 1 mL de dioxano y 1 mL de hidróxido de bario al 10% (p/v) y la muestra se incubó por 1 h a temperatura ambiente. Después de la incubación, se adicionaron 2 mL de sulfato de amonio al 2% (p/v) seguido de 2 mL de dietileter. La muestra se mezcló vigorosamente y se centrifugó a 3,600 rpm para separar las fases. Se tomó la fase orgánica (la fase superior) y se transfirió a otro tubo y se volvió a repetir la extracción con dietileter. Se juntaron ambas fracciones en un tubo y se evaporó el solvente hasta sequedad bajo corriente continua de nitrógeno y finalmente el extracto lipídico se resuspendió en 200 μ L de alcohol absoluto.

I.1 Cuantificación de bases esfingoideas libres por HPLC.

Se utilizó un cromatógrafo Shimadzu compuesto por una bomba modelo LC-10ADVP, detector de fluorescencia RF-10AXL ajustado a una longitud de excitación de 419 nm y una de emisión de 493 nm y procesador de datos modelo C-R5A. La separación de la muestra se realizó por fase reversa en una columna SuperCosil LC-18-Si de 15 cm \times 4.6 mm y un tamaño de partícula de 5 μ m. La fase móvil utilizada fue acetonitrilo al 94% (v/v). Las bases esfingoideas se derivatizaron con el reactivo nafatlen-2,-3-dicarboxialdehído (NDA) en tetraborato de sodio 25 mM pH=9.5 en presencia de KCN 2.5 mM, la reacción se incubó por 20 min a 65°C.

J. Extracción de RNA y obtención de cDNA por transcripción reversa.

Todo el material utilizado durante la extracción y manejo del RNA se esterilizó por lo menos 1 h y los reactivos se prepararon con H₂O-DEPC. Para procesar cada muestra se congelaron con nitrógeno líquido en un mortero entre 10 y 12 embriones y se pulverizó el tejido hasta obtener un polvo fino. Se mezcló cuidadosamente con 1 mL de TRIzol (Invitrogen 15596-018) y se transfirió con una espátula a un tubo eppendorf de 2 mL y se incubó a temperatura ambiente durante 2.5 min. El tubo se centrifugó a 13, 400 rpm en una microfuga (Minispín eppendorf) durante 10 min a 4° C. El sobrendante se transfirió a un tubo eppendorf de 1.5 mL y se le agregaron 200 μ L de una mezcla de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25 : 24 : 1, Sigma P2069) y se agitó en vórtex por 15 s. Se centrifugó a 13, 400 rpm por 10

min a 4° C y posteriormente la fase acuosa se transfirió a un tubo eppendorf de 1.5 mL. Para precipitar el RNA se agregaron 500 µL de isopropanol frío y se incubó durante 10 min a temperatura ambiente. El tubo se centrifugó a 13, 400 durante 10 min a 4°C y el sobrenadante se eliminó por decantación. El botón de RNA se lavó con 1 mL de etanol al 70%, se centrifugó a 6, 400 rpm durante 5 min a 4° C y se eliminó el sobrenadante por decantación. El botón se resuspendió en 500 µL de H₂O-DEPC y se agregaron 167 µL de cloruro de litio 8 M y se incubó a 4° C por toda la noche. Transcurrido este tiempo, se centrifugó a 13, 400 rpm por 15 min a 4° C, se eliminó el sobrenadante por decantación y se disolvió el botón en H₂O-DEPC (100 - 200 µL), se agregó 1/10 de volumen de acetato de sodio 3 M y 2 volúmenes de etanol frío. Se incubó a -70° C durante toda la noche y posteriormente se centrifugó a 13, 400 rpm por 15 min a 4° C, finalmente el botón se resuspendió en 80-100 µL de H₂O-DEPC.

J.1 Transcripción reversa (RT) y amplificación del cDNA por PCR.

Se sintetizó el cDNA a partir de 1 µg de RNA utilizando la enzima transcriptasa reversa ImProm-II (Promega) y 1 µL de oligo dT (500 µg/µL oligo dT (5'-TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTVN-3') y con los demás componentes que se especifican en la Tabla 6 siguiendo el protocolo sugerido por el proveedor. El RNA (1 µg) se mezcló con el oligo dT en un tubo eppendorf de 0.5 mL y se incubó por 5 min a 70° C e inmediatamente se colocó en hielo mientras se preparaba la mezcla de reacción (Tabla 6). Los 15 µL de la mezcla de reacción se combinaron con los 5 µL del RNA molde y el oligo dT y se incubó a temperatura ambiente por 5 min. La síntesis del cDNA se realizó por 1 h a 45° C y finalmente para inactivar a la transcriptasa reversa se incubó a 70° C por 15 min.

Tabla 6. Componentes de la mezcla de reacción para la transcriptasa reversa (RT).

Reactivo Stock	[] final
RNA	1 µg
Buffer de reacción ImPromII™ 5X (Promega)	1X
MgCl ₂ 25 mM	3 mM
Mezcla dNTPs 10 mM	0.5 mM
Enzima transcriptasa reversa ImpromII	1 µL por reacción
H ₂ O-DEPC cbp	15 µL

El cDNA sintetizado fue utilizado para la amplificación de varios transcritos que se señalan en la tabla 7. *FUM1* (Número de acceso AF155773) codifica para una policétido sintasa que cataliza la primera reacción en la biosíntesis de fumonisinas y cuando se interrumpe este gen, la producción de FB1 se abate en un 99% (Proctor et al. 1999). *TUB* codifica para la tubulina que es una proteína constitutiva de *F. verticillioides* y que en este trabajo se utilizó como control de cargado. *PRm* (Número de acceso X54325) codifica para una proteína relacionada con la patogénesis en maíz (Casacuberta et al. 1991) y *PAL* para la fenilalanina amonio liasa, primera enzima en la biosíntesis del SA.

Tabla 7. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación por PCR de *FUM1*, *Tubulina*, *PRm* y *PAL*.

Gen blanco	Oligonucleótidos	Tamaño del producto	Referencia
<i>FUM1</i>	Fw 5'-CTTGAACGCGGAGCTAGATTAT-3' Rv 5'-ATCCGTGTATGCATATGTCGAG-3'	354 pb	Sanchez-Rangel et al. 2005
<i>Tubulina</i>	Fw 5'-TGCTCATTTC AAGATCCGCG-3' Rv 5'-GTAGTTGAGGTCACCGTAGGAGG-3'	233 pb	Hu et al. 2008
<i>PAL</i>	Fw 5'-GAGGAGTGCAACAAGGTGTTC-3' Rv 5'-CAGGGCACAGCTACACAAAA -3'	297 pb	Este trabajo
<i>PRm</i>	Fw 5'-AGAGAAGTACGCCGCACAGA -3' Rv 5'-GTAGTGGCCACACACCTTGC -3'	196 pb	Este trabajo

A partir de 1 µL de cDNA y los componentes especificados en la tabla 5, se realizó la amplificación por PCR de los cuatro transcritos en un termociclador Applied Biosystems GeneAmp System 9700 bajo las siguientes condiciones: 1 ciclo por 3 min a 94° C, 32 ciclos para *FUM1*, 25 ciclos para *Tubulina*, 26 ciclos para *PRm* y 30 ciclos para *PAL* programados de la siguiente manera [40 s a 94° C, 40 s a 56° C y 40 s a 72° C] y un último ciclo a 72° C por 7 min. Los productos de amplificación se separaron por electroforesis horizontal en un gel de agarosa (1.5% p/v) disuelta en

solución amortiguadora TAE (Acetato Tris 40 mM EDTA 2 mM) con bromuro de etidio (0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y usando TAE como buffer de corrida. Las bandas de ADN se observaron con un transiluminador BenchtopUV (UVP) y usando un cámara marca Fisher Scientific EPH-6 se adquirió la imagen para su análisis.

VI. RESULTADOS

A. La FB1 modula selectivamente la actividad de β -1,3-glucanasas de maíz.

El principal objetivo de este estudio fue aportar evidencia del papel de la FB1 como factor de virulencia explorando su acción sobre respuestas de defensa en la planta de maíz, en particular, aquellas relacionadas con la defensa hacia hongos patógenos. Para esto, se evaluó la actividad de exoquitinasas y de β -1,3-glucanasas en extractos proteicos solubles obtenidos de los embriones de maíz germinados en presencia o ausencia de FB1 20 μ M.

Como ya lo reportó Doehlert et al. (1994), el tratamiento con la FB1 no afectó la germinación pero sí inhibió significativamente la elongación radicular en los embriones de maíz (Fig. 5A). Durante la germinación, la actividad de exoquitinasa aumentó discretamente y la presencia de la FB1 no modificó esta actividad con respecto al control (Fig. 5B). En contraste, la FB1 sí afectó la actividad de β -1,3-glucanasa durante el curso temporal analizado con un patrón muy particular pues a tiempos tempranos se observó una disminución en la actividad enzimática de hasta el 50% a las 18 h, mientras que a tiempos tardíos (24 y 30 h) se presentó un aumento discreto (30 - 40%) pero significativo en la actividad total (Fig. 5C).

Para tratar de explicar este patrón y debido a que las β -1,3-glucanasas pertenecen a una familia multigénica se evaluó, mediante geles nativos, la actividad de las isoformas de β -1,3-glucanasas que se expresan durante la germinación. Los resultados consistentemente mostraron que durante la germinación al menos tres isoformas fueron activas. Sin embargo, es claro que la isoforma que mostró una mayor movilidad en los geles de actividad (isoforma I) fue la única que se indujo durante el tratamiento con FB1 a las 24h. Además de esta inducción se observó una reducción en la actividad de dos isoformas de menor movilidad (isoformas II y III) sugiriendo que estas isoformas son las responsables de la disminución en la actividad total que se observó a tiempos tempranos durante el tratamiento con FB1 (Fig. 6).

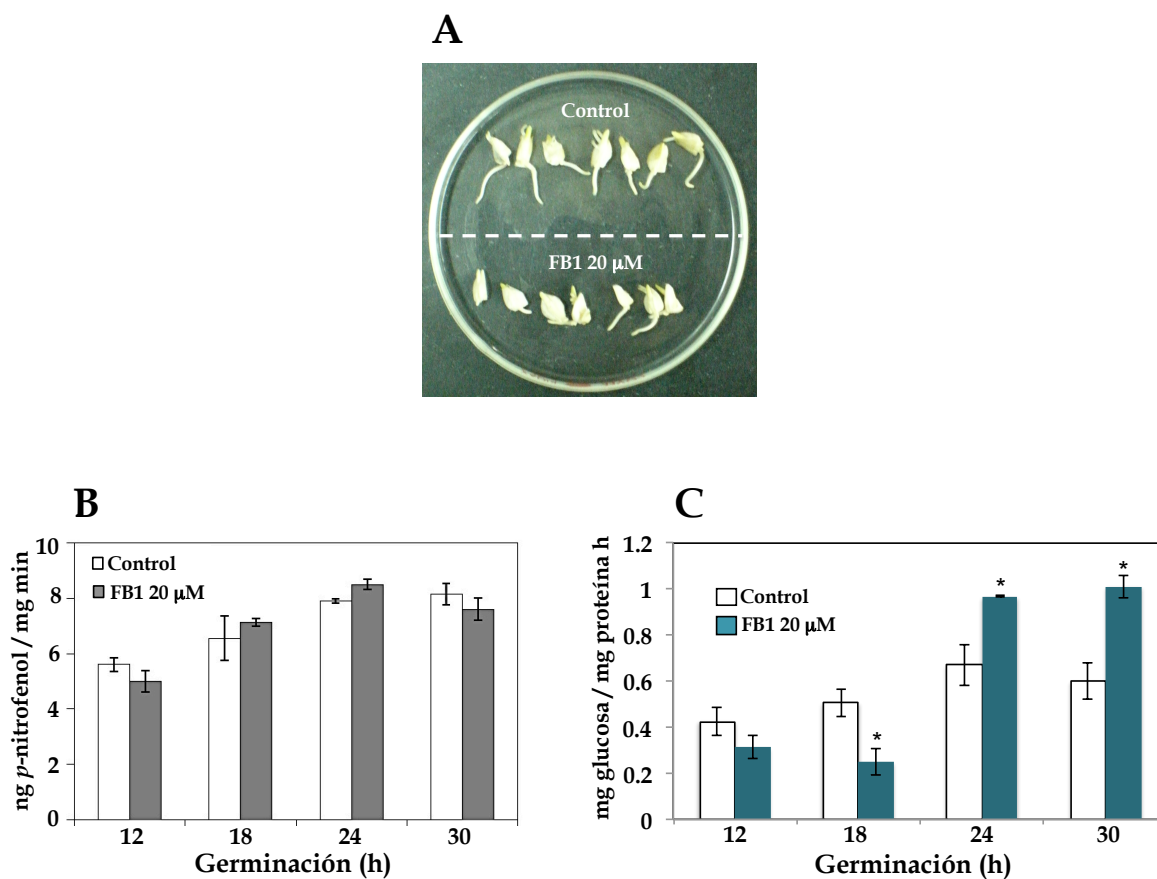


Figura 5. Efecto de la FB1 sobre la elongación radicular y la actividad total de hidrolasas en embriones de maíz durante la germinación. **A.** El tratamiento con FB1 20 μM inhibió significativamente la elongación radicular en los embriones de maíz (fotografía tomada a 30 h de germinación). **B.** Actividad total de exoquitinasa en embriones de maíz imbibidos en presencia de FB1 20 μM . Los valores presentados son los promedios \pm desviación estándar ($n=3$). No se observaron diferencias significativas entre el control y el tratamiento con FB1 (prueba t student, $p \leq 0.05$). **C.** Actividad total de β -1,3-glucanasa en embriones de maíz imbibidos en presencia de FB1 20 μM . Los valores presentados son los promedios \pm desviación estándar ($n=3$). El asterisco por encima de la barra indica que existe diferencia significativa entre el control y la muestra tratada con FB1 (prueba t student, $p \leq 0.05$).

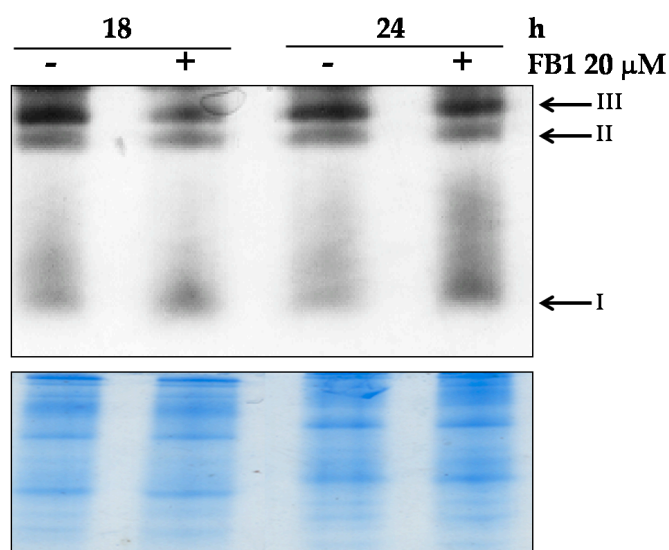


Figura 6. Efecto de la FB1 sobre tres isoformas de β -1,3-glucanasas en embriones de maíz. Patrón de actividad en geles nativos de las distintas isoformas de β -1,3-glucanasa en embriones de maíz germinados en presencia de FB1 20 μ M, en cada carril se cargaron 120 μ g de proteína total. El control de cargado se presenta en la parte inferior y consiste en un gel corrido en condiciones desnaturalizantes y teñido con azul de Coomassie, en cada carril se cargaron 15 μ g de proteína total.

B. Las isoformas II y III de β -1,3-glucanasa de maíz son blancos de inhibición de la toxina FB1.

El decremento observado en la actividad de las isoformas II y III a tiempos tempranos de la germinación en presencia de FB1, indicó que la toxina podría interactuar directamente con estas enzimas para inhibirlas. Con el fin de probar esta hipótesis se analizó el efecto *in vitro* de la FB1 sobre la actividad de las distintas isoformas de las β -1,3-glucanasas mediante geles nativos de actividad y ensayos espectrofotométricos.

Los geles nativos se incubaron en presencia de diferentes dosis de FB1 (10, 25 y 50 μ M) y, como se muestra en la Fig. 7, la intensidad de las bandas que corresponden a la actividad de las isoformas II y III disminuyó a medida que la concentración de FB1 aumentó. Por análisis densitométrico se determinó una reducción aproximada del 25 al 35% en la actividad de las isoformas II y III respectivamente a una concentración de 50 μ M. Para apoyar esta observación de una inhibición directa y selectiva, se obtuvieron fracciones parcialmente purificadas que contuvieran solamente a la isoforma I o las isoformas II y III. A partir de los geles nativos se cortaron las bandas correspondientes a las distintas isoformas y se purificaron parcialmente por electroelución y sus

actividades se probaron en presencia de concentraciones crecientes de FB1 (10 a 50 μM). Los resultados mostraron que la fracción que contenía las isoformas II y III fue altamente sensible a la inhibición por la FB1 con una IC_{50} calculada de 53 μM . En contraste, el patrón de inhibición de la isoforma I fue claramente distinto y para ésta se calculó una IC_{50} de 180 μM . Al utilizar una concentración 100 μM de FB1 en el ensayo en gel fue posible suprimir por completo la actividad de las isoformas II y III de β -1,3-glucanasa. Es evidente que en este ensayo, para que la toxina entre en contacto con su blanco, primero debe penetrar la matriz de poliacrilamida, y por ello se requirió una dosis más alta. En conjunto, estos resultados muestran que la FB1 fue capaz de inhibir directamente *in vitro* a las isoformas II y III, y sugiere que este mecanismo podría ocurrir *in vivo* en los embriones de maíz a tiempos tempranos durante la germinación en presencia de la toxina FB1.

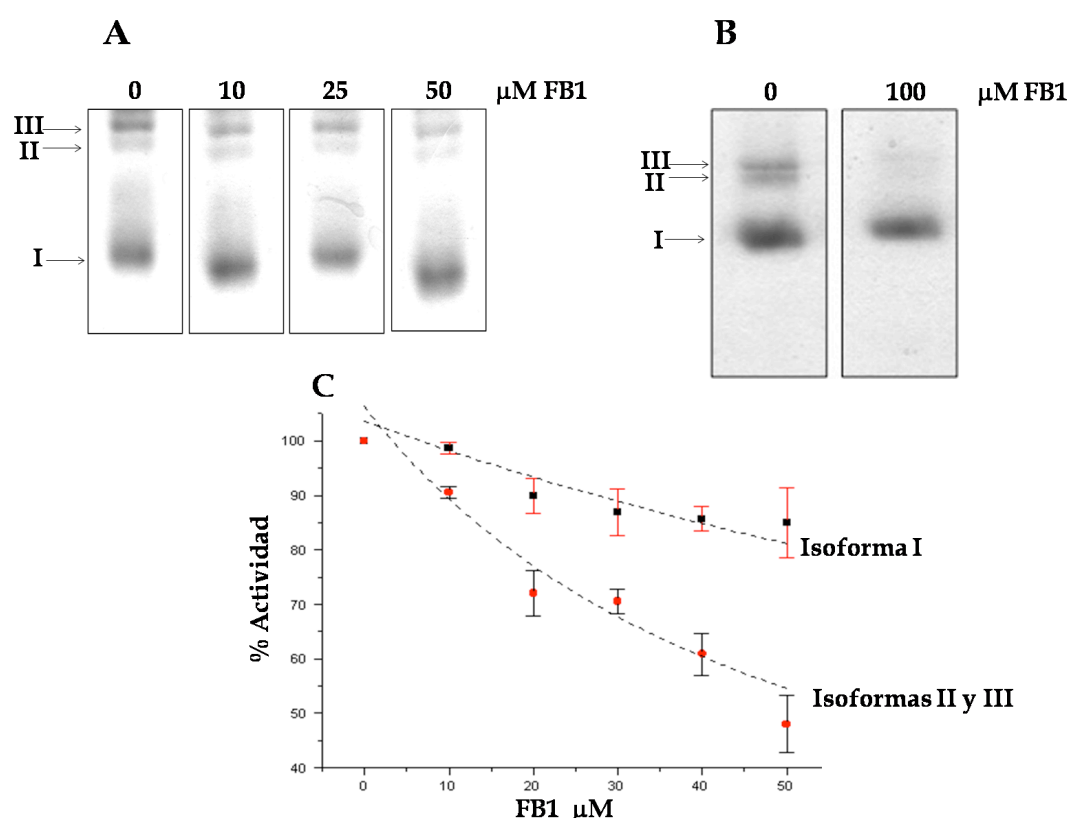


Figura 7. Efecto de la FB1 *in vitro* sobre la actividad de las isoformas II y III de β -1,3-glucanasa. **A** y **B.** Geles nativos de actividad de extractos proteicos de embriones de maíz de 24 h de germinación que muestra la inhibición selectiva de las isoformas II y III de β -1,3-glucanasa por la FB1 a diferentes concentraciones (10, 25, 50 o 100 μM). **C.** Actividad de β -1,3-glucanasa determinada por un ensayo espectrofotométrico en fracciones parcialmente purificadas que contienen a la isoforma I (cuadros) o a las isoformas II y II (círculos) en presencia de distintas concentraciones de FB1 utilizando laminarina como sustrato. Se muestran los datos promedio \pm SD, $n=3$.

Evidencias adicionales que también sugieren que la inhibición es selectiva hacia ciertas isoformas fueron los resultados de los experimentos realizados con extractos proteicos totales de raíz de plántulas de maíz de 11 días. Los extractos proteicos de raíz contienen una gran actividad de la isoforma I y no así de las isoformas II y III en comparación con los extractos de embriones de maíz (Fig. 8A). Al probar el efecto de la FB1 sobre la actividad de β -1,3-glucanasas en los extractos proteicos de raíz, observamos que no hubo inhibición pues apenas se detectó una reducción del 2% a la máxima concentración de FB1 utilizada (Fig.8B). Este hecho corrobora que al menos la isoforma I no fue sensible a la inhibición por FB1.

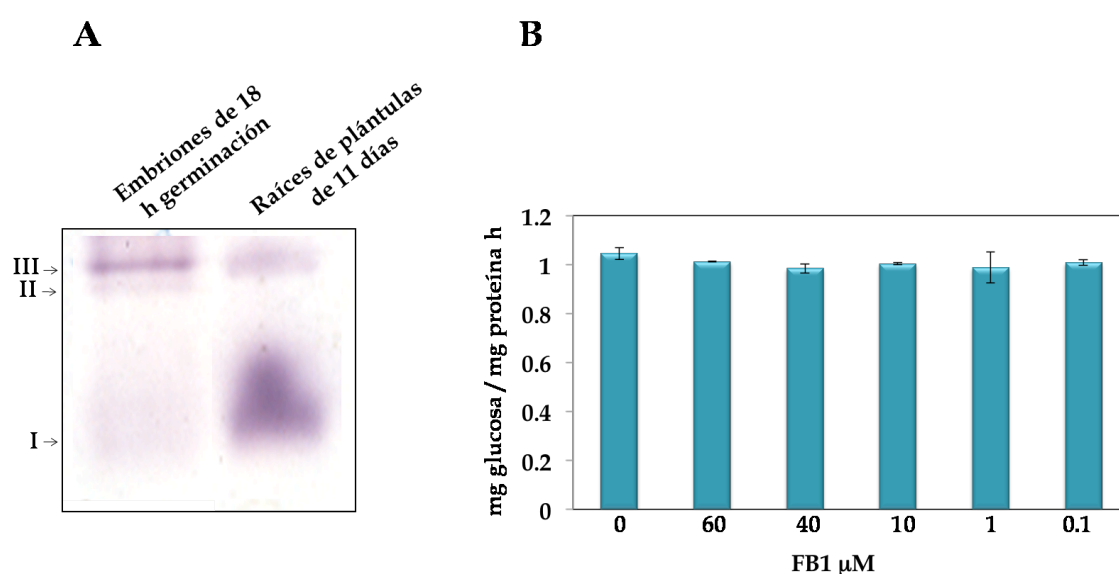


Figura 8. La isoforma I de β -1,3-glucanasa de maíz no es sensible a la inhibición por la FB1. A. Gel nativo de actividad que muestra que los extractos proteicos de raíz de plántulas de 11 días de edad contienen una mayor actividad de la isoforma I con respecto a los extractos de los embriones de maíz. **B.** No se observa un efecto inhibitorio en la actividad total de β -1,3-glucanasas por la FB1 en extractos de raíz de plántulas de maíz de 11 días de edad. Los valores presentados son los promedios \pm desviación estándar (n=3).

Uno de los efectos mejor caracterizados de la FB1, que se discutirá en el siguiente apartado, es su capacidad de inducir acumulación de bases esfingoides. La FB1 posee semejanza estructural con estos compuestos, así que para descartar que las bases esfingoides sean las responsables de la inhibición de las isoformas II y III, se incubaron los gels nativos con una mezcla de dos bases esfingoides: esfinganina y fitoesfingosina. Como se presenta en la Fig. 9, no se observó un efecto significativo en la intensidad de las bandas de las distintas isoformas de β -1,3-glucanasa.

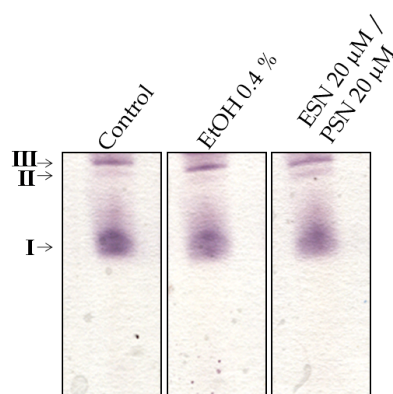


Figura 9. Las bases esfingoideas esfinganina (ESN) y fitoesfingosina (PSN) no inhibieron la actividad de las diferentes isoformas de β -1,3-glucanasa. Geles nativos de actividad de extractos proteicos de embriones de maíz de 24 h de germinación que muestra que no existe un efecto de las bases esfingoideas en la actividad de las isoformas II y III de β -1,3-glucanasa.

C. La inducción en la actividad de la isoforma I por la FB1 está mediada por la vía del SA que se activa por la acumulación de bases esfingoideas.

Dado que la FB1 induce un aumento en los niveles de ácido salicílico (SA) a través de la acumulación de bases esfingoideas en semillas de maíz durante la germinación (de la Torre et al. 2010), se determinó si la isoforma I de β -1,3-glucanasa era un blanco de la vía de señalización mediada por SA.

C.1 Actividad biológica de la FB1 como SAM (sphinganine analog mycotoxin) en los embriones de maíz durante la germinación.

Para contestar la hipótesis anterior, se estudió la actividad de la FB1 como SAM en los embriones de maíz. El mecanismo de la FB1 como SAM consiste en inhibir a la esfinganina *N*-acil transferasa, enzima que participa en la biosíntesis *de novo* de los esfingolípidos complejos (Abbas et al. 1994). Esta inhibición genera una acumulación de bases esfingoideas y reducción de esfingolípidos complejos. Así que a partir de embriones de maíz germinados en presencia de la toxina, se extrajeron, separaron y cuantificaron los niveles celulares libres de tres distintas bases esfingoideas. Para su cuantificación, se formaron derivados entre la base esfingoidea y el reactivo naftalen 2,3-dicarboxialdehído (NDA) que fueron separados por

cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC) y detectados por fluorescencia.

Las estructuras de la fitoesfingosina (t18:0), esfingosina (d18:1⁴) y esfinganina (d18:0), las tres bases esfingoideas detectadas, se presentan en la Fig. 10B y el orden de elución de acuerdo a su polaridad se indica en el cromatograma de la Fig. 10A. Los tiempos de retención promedio para cada una de las bases fueron: fitoesfingosina 7.14 ± 0.12 min, esfingosina 10.04 ± 0.06 min, esfinganina 14.70 ± 0.28 min y el estándar interno C-20 esfingosina 17.49 ± 0.37 min. En los extractos obtenidos de la muestras se detectaron picos con tiempos de retención similares como lo ilustran los cromatogramas de la Fig. 11A y B.

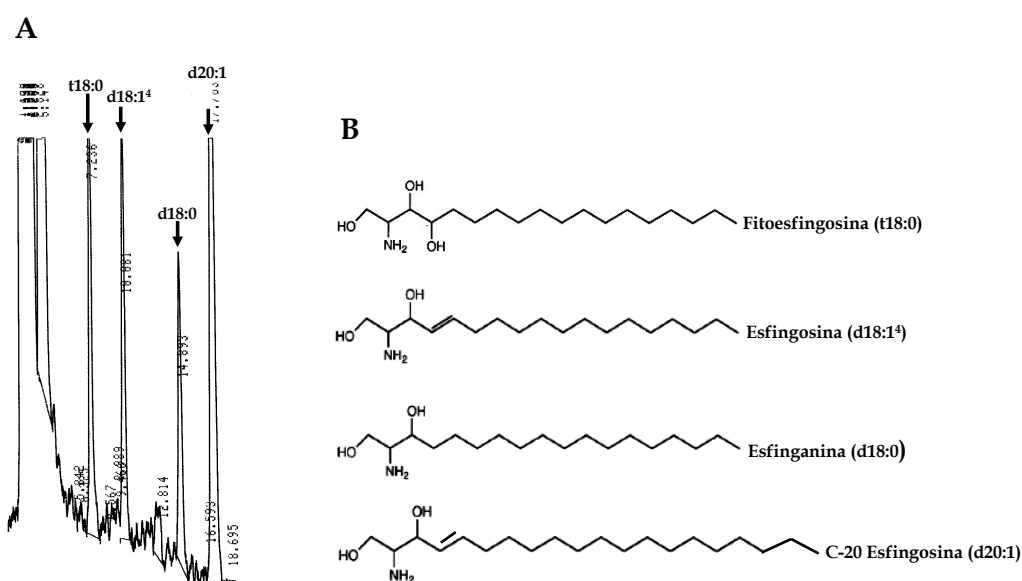


Figura 10. A. Cromatogramas obtenidos de la separación y detección de los derivados de NDA de los estándares de fitoesfingosina (t18:0), esfingosina (d18:1⁴), esfinganina (d18:0) y C-20 esfingosina (d20:1), utilizando como fase móvil acetonitrilo 94% y flujo de 1.2 mL/min. B. Estructuras y nomenclatura de las bases esfingoideas cuantificadas en extractos de embriones germinados en presencia o ausencia de FB1 20 μ M.

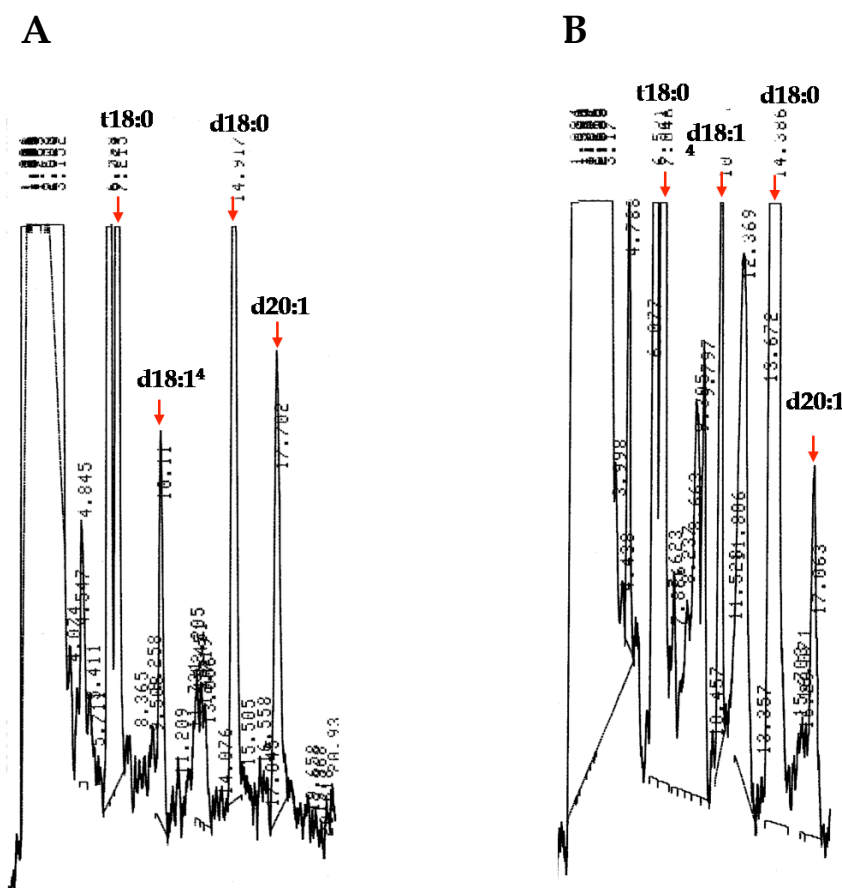


Figura 11. Cromatogramas de la detección por HPLC de las bases: t18:0, d18:14, d18:0 y el estándar interno (d20:1) en muestras control (A) y muestras tratadas con FB1 20 μ M (B), utilizando como fase móvil acetonitrilo 94% y flujo de 1.2 mL/min. Ambas muestras corresponden a 30 h de germinación y se inyectaron las cantidades de 143 μ g de tejido equivalente para la muestra control (A) y 167 μ g de tejido equivalente para la muestra del tratamiento con FB1 (B).

De acuerdo a los resultados de la cuantificación que se ilustran en la Fig. 12, la base esfingoidea que se acumuló en mayores niveles celulares fue la esfingarina y los niveles fueron significativamente diferentes con respecto al control desde las 6 hasta las 30 h de imbibición, que fue el último tiempo analizado (prueba t student, $p \leq 0.05$). El máximo aumento fue de aproximadamente 15 veces con respecto al control. Tanto los niveles de fitoesfingosina como los de esfingosina presentaron una elevación máxima a las 15 h de imbibición y fue de aproximadamente 4 veces, a este tiempo los niveles detectados fueron de 37.51 ± 8.34 pmoles / mg tejido fresco y 7.82 ± 2 pmoles / mg tejido fresco respectivamente.

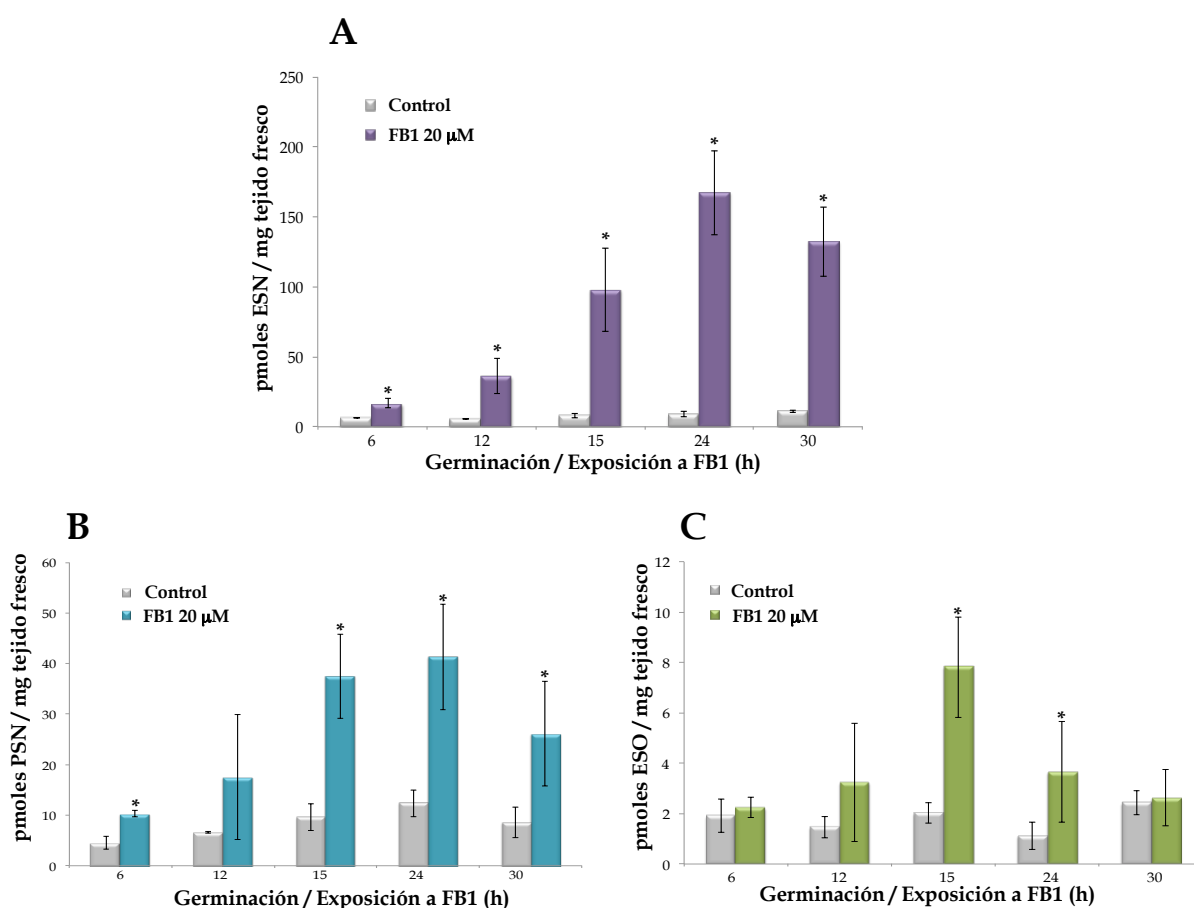


Figura 12. Acumulación de bases esfingoideas en embriones de maíz germinados en presencia de FB1 20 µM. A. Cinética de acumulación de Esfinganina (ESN), B. Fitoesfingosina (PSN) y C. Esfingosina (ESO) en embriones de maíz germinados en presencia de FB1 20 µM. Los valores presentados son los promedios \pm desviación estándar (n=3). El asterisco indica que existe diferencia significativa entre el control y la muestra tratada con FB1 (prueba t student, $p \leq 0.05$).

Una vez determinada la actividad de la FB1 como SAM fue posible correlacionar temporalmente el perfil de acumulación de las bases esfingoideas con el perfil de actividad de la isoforma I durante el tratamiento con FB1. Los datos mostraron que la máxima elevación de esfinganina coincidió temporalmente con la inducción en la isoforma I (Fig 5C y 6). Con la finalidad de comprobar esta asociación se analizó la actividad de β -1,3-glucanasas en los embriones de maíz cuando germinaron en presencia de una mezcla de bases esfingoideas.

C.2 Activación de la isoforma I de β -1,3-glucanasas por bases esfingoideas.

Cuando los embriones de maíz se germinaron entre 12 y 30 h en presencia de una mezcla de esfinganina y fitoesfingosina no se observó efecto en la actividad de las distintas isoformas de β -1,3-glucanasa. Sin embargo a tiempos muy cortos (2 y 6 h) sí se observó una inducción discreta de la isoforma I que se muestra en la Fig. 13.

Es importante mencionar, que a tiempos tempranos de la germinación se detectaron niveles bajos de las isoformas II y III. Este resultado aunque no es concluyente, se sumó a fortalecer la hipótesis acerca de la activación de una vía mediada por las bases esfingoideas que induce la actividad de la isoforma I.

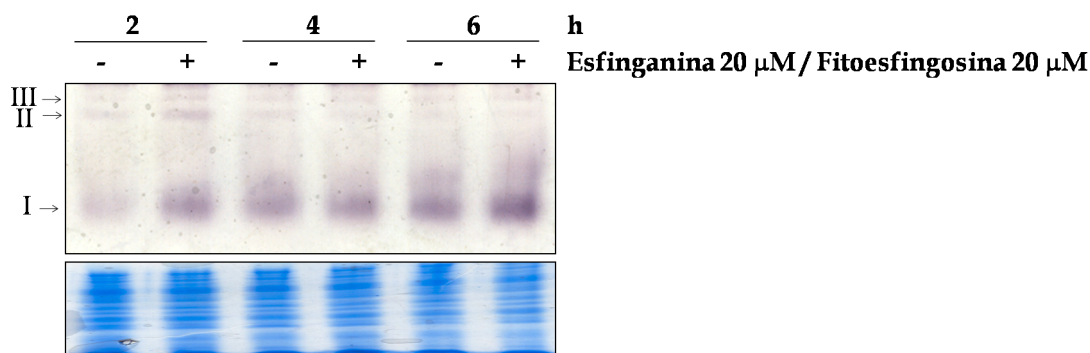


Figura 13. Inducción de la isoforma I de β-1,3-glucanasa por una mezcla de esfinganina y fitoesfingosina. Patrón de actividad en geles nativos de las isoformas de β-1,3-glucanasa de los extractos proteicos totales obtenidos de los embriones germinados en presencia de una mezcla de esfinganina y fitoesfingosina a una concentración cada una de 20 μM, en cada carril se cargaron 120 μg de proteína total. El control de cargado se presenta en la parte inferior y consiste en un gel corrido en condiciones desnaturalizantes y teñido con azul de Coomassie, en cada carril se cargaron 15 μg de proteína total.

C.3 El tratamiento con INA, un análogo del SA, induce la actividad de la isoforma I.

El SA se sintetiza en las plantas a través de dos rutas independientes: la vía mediada por la fenilalanina amonio liasa (PAL) que ocurre en citoplasma y la vía mediada por la isocorismato sintasa (ICS) que ocurre en cloroplasto. En maíz en germinación se ha sugerido que la acumulación de SA provocado por el tratamiento con FB1 (de la Torre et al. 2010) proviene principalmente de la ruta bisosintética mediada por la enzima PAL pues el transcrito se incrementa hasta 4 veces durante las primeras 24 h de germinación, a diferencia de los niveles de transcrito de la ICS que apenas aumentan 1.2 veces y a tiempos más largos (36 h) (Rivas SanVicente, 2004). Dado este antecedente, en este trabajo sólo medimos los niveles de *ZmPAL* en los embriones de maíz que germinaron en presencia de la FB1, y observamos que el máximo de inducción de los niveles de *ZmPAL* fue de aproximadamente 2 veces con respecto al control a las 18 y 24 h de exposición y coincidió temporalmente con la elevación en los niveles celulares de esfinganina (Fig. 14).

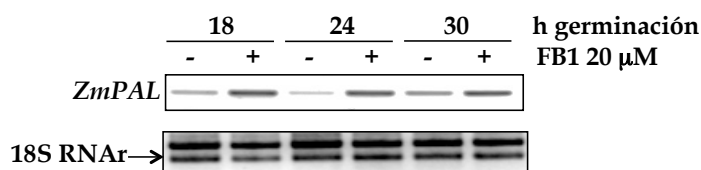


Figura 14. Niveles de transcrito del gen *ZmPAL* en embriones de maíz germinados en presencia de **FB1 20 μ M**. A partir de RNA total se amplificó *ZmPAL* por RT-PCR. Se muestran los niveles de los RNA ribosomales teñidos con bromuro de etidio para comprobar la integridad y calibración del molde.

Finalmente, para determinar si es la vía del SA la que induce un aumento en la actividad de la isoforma I, se germinaron los embriones de maíz en presencia de metil jasmonato (MeJa) o ácido 2,6-dicloroisonicotínico (INA), un análogo del ácido salicílico y se analizaron los patrones de actividad de las distintas isoformas de β -1,3-glucanasa. La Fig. 15B muestra que el MeJa 100 μ M no provocó ningún cambio en el patrón de actividad de la isoforma I. En contraste, el tratamiento con INA indujo la actividad de la isoforma I a las 24 h y esta inducción se mantuvo hasta las 30 h (Fig 15A).

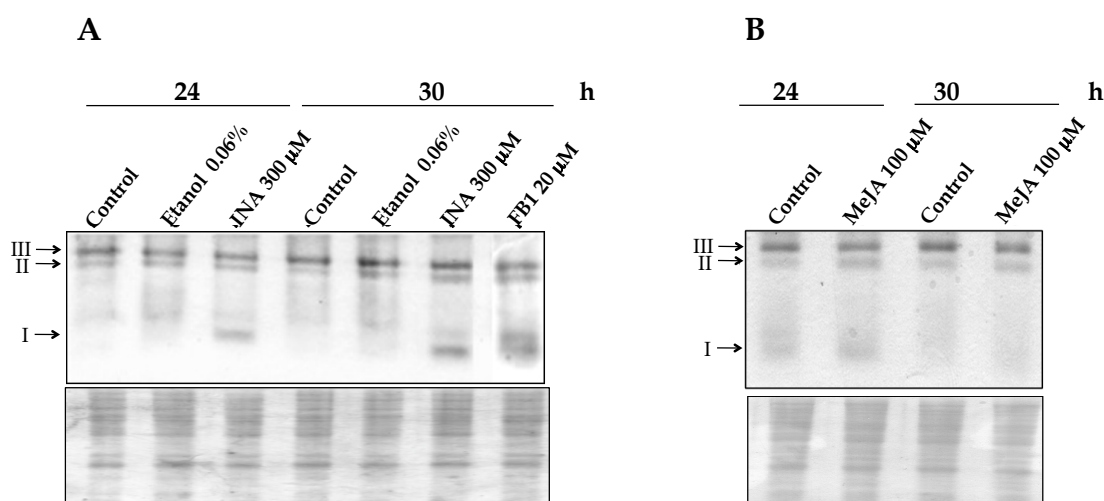


Figura 15. Efecto de las fitohormonas ácido salicílico y ácido jasmónico sobre la actividad de la isoforma I de β -1,3-glucanasa de maíz. **A.** Patrón de actividad en geles nativos de las distintas isoformas de β -1,3-glucanasa de los extractos proteicos totales obtenidos de los embriones germinados en presencia INA 300 μ M, un análogo del ácido salicílico o **(B)** MeJa 100 μ M. El control de cargado se presenta en la parte inferior de cada uno de los geles nativos y consiste en un gel corrido en condiciones desnaturizantes y teñido con azul de Coomassie, en cada carril se cargaron 15 μ g de proteína total.

D. La infección por *Fusarium verticillioides* reproduce el mismo patrón de actividad de las distintas isoformas de β -1,3-glucanasa observado durante el tratamiento con FB1.

Una vez que se demostró que la FB1 modula la actividad de tres diferentes isoformas de β -1,3-glucanasa por dos mecanismos independientes, se evaluó el patrón de actividad de las mismas isoformas en embriones de maíz inoculados con *F. verticillioides*. Este hongo necrótrofo sintetiza FB1 y la pregunta fue conocer si el patógeno era capaz de producir la toxina durante la infección de los embriones de maíz y el efecto de la presencia del hongo sobre la actividad de las distintas isoformas de β -1,3-glucanasa. La cepa MY3 de *F. verticillioides*, aislada de semillas de maíz y caracterizada como una cepa altamente productora de FB1 (Sánchez-Rangel et al. 2005), se utilizó para estos estudios. Para evaluar la colonización y proliferación de la cepa MY3 se realizó un conteo de conidias así como una evaluación fenotípica después de los tiempos post infección seleccionados. El conteo de conidias a lo largo de la infección (Fig. 16A) reflejó que el patógeno proliferó muy eficientemente pues para las 30 horas post inoculación (hpi), hubo aproximadamente 100 veces más conidias (6×10^6 conidias/embrión) que las que se inocularon. El avance de la infección también se observó por los daños visibles como necrosis y ablandamiento del tejido (Fig. 16B).

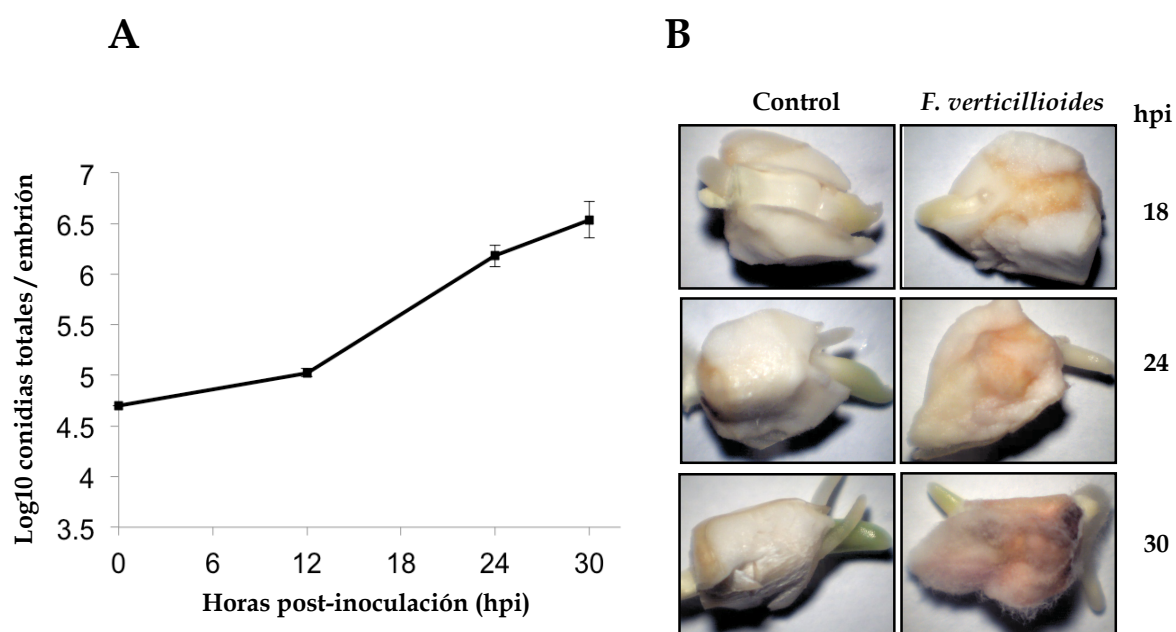


Figura 16. Colonización de embriones de maíz por *Fusarium verticillioides*. A. Los embriones de maíz fueron inoculados con una suspensión de conidias (5×10^4) y germinados a 29°C en agar al 1%. Los embriones se colectaron a las 12, 24 y 30 h y se determinó el contenido total de conidias por embrión ($n=30$). (B) Fotografías de los embriones infectados y no infectados a las distintas hpi.

D.1 *Fusarium verticillioides* produce FB1 a tiempos muy tempranos de la infección.

Para evaluar la producción de FB1 por *F. verticillioides* durante la infección, se analizaron los niveles de transcrito del gen *FUM1*, cuyo producto cataliza la primera reacción en la biosíntesis de fumonisinas (Proctor et al. 2003) y se determinaron los niveles de FB1 en el tejido vegetal. Como se observa en la Fig. 17, el transcrito de *FvFUM1* se detectó desde las 18 hpi y sus niveles incrementaron de 2.5 a 6 veces a las 24 y 30 hpi respectivamente. La expresión de *FvFUM1* correlacionó con la producción de la micotoxina pues ésta se detectó en el tejido a las 24 y 30 hpi (Tabla 8). Los niveles de FB1 en el tejido infectado por *F. verticillioides* son cuantitativamente comparables, incluso superiores, a los niveles que se detectaron en el tejido de maíz cuando germinaron en presencia de la toxina $10 \mu\text{M}$ (Sánchez-Rangel, 2003). Estos datos nos permiten estimar la cantidad de FB1 que se necesita para activar los efectos fitotóxicos, bioquímicos y moleculares observados y que evidentemente es muy pequeña.

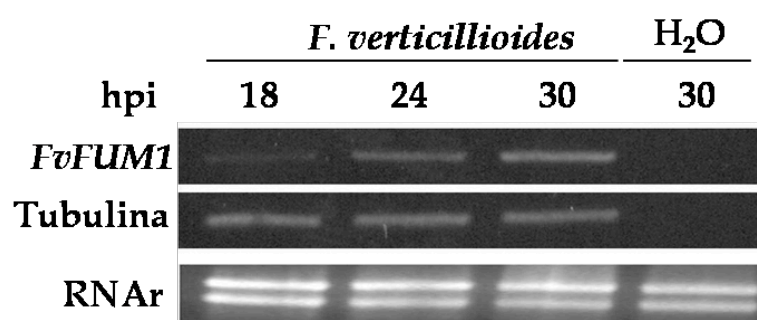


Figura 17. Niveles de transcrito del gen *FvFUM1* durante la infección de los embriones de maíz con *F. verticillioides*. A partir de RNA total de embriones de maíz inoculados y no inoculados se amplificó el cDNA correspondiente de los transcritos de *FvFUM1* y Tubulina, por RT-PCR. También se muestran los niveles de los RNA ribosomales teñidos con bromuro de etidio para comprobar la integridad del molde. Los datos densitométricos de *FvFUM1* están normalizados con los datos del transcrito de tubulina.

Tabla 8. Niveles de FB1 determinados por HPLC en embriones de maíz durante la infección con *F. verticillioides*

Tratamiento	Horas postinoculación (hpi)	FB1 pg/mg tejido fresco
<i>F. verticillioides</i>	24	65.76 ± 11.62
<i>F. verticillioides</i>	30	209.1 ± 21.45

D.2 La infección por *F. verticillioides* induce el transcrito de *PRm*. *PRm* pertenece al grupo de proteínas PR-1.

La infección por *F. verticillioides* indujo un incremento en los niveles del transcrito del gen *ZmPRm* (pathogenesis-related maize seed) observándose un incremento de aproximadamente 2 veces a las 18 y 24 h (Fig. 18A). Este gen pertenece al grupo de proteínas PR-1 y se induce fuertemente por la infección de *F. verticillioides* en semillas de maíz (Casacuberta et al. 1992). Asimismo, se observó que los niveles de transcrito de este gen aumentaron 8 veces por el tratamiento con FB1 como se muestra en la Fig. 18B de la muestra de 18 h de germinación y tratada con la toxina por 3 h.

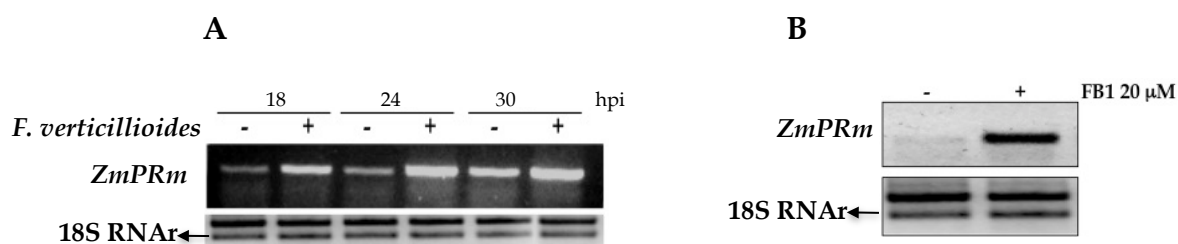


Figura 18. Niveles de transcrito del gen *ZmPRm* durante la infección de los embriones de maíz por *F. verticillioides* (A) y por el tratamiento con FB1 20 μM (B). A partir de RNA total de embriones de maíz inoculados, no inoculados y/o germinados en presencia de FB1 20 μM se amplificó *ZmPRm* por RT-PCR. También se muestran los niveles de los RNA ribosomales teñidos con bromuro de etidio para comprobar la integridad y calibración del molde.

De igual manera, durante las primeras 24 h de la infección por *F. verticillioides* se observó un aumento de aproximadamente 2 veces con respecto al control en los niveles de transcrito del gen *ZmPAL* (Fig 19), lo que es consistente con la activación de la vía del SA por la colonización de este hongo.

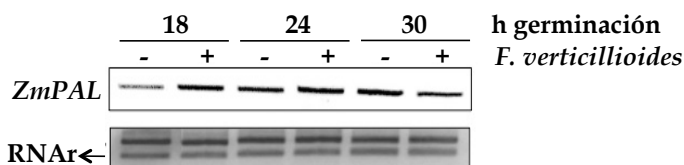


Figura 19. Niveles de transcrito del gen *ZmPAL* durante la infección de los embriones de maíz por *F. verticillioides*. A partir de RNA total se amplificó el cDNA del transcrito de *ZmPAL*. También se muestran los niveles de los RNA ribosomales teñidos con bromuro de etidio para comprobar la integridad y calibración del molde.

Para asociar los efectos de la FB1 sobre las actividades de las hidrolasas con la infección del hongo, se evaluó la actividad de exoquitinasas y de β-1,3-glucanasas en los extractos proteicos obtenidos de embriones inoculados con *F. verticillioides*. La infección provocó un aumento de aproximadamente de 40 y 180% a las 24 y 30 hpi respectivamente en la actividad de exoquitinasa (Fig. 20B). Este resultado contrasta con lo que se observó por el tratamiento con FB1 pues la aplicación de la micotoxina no indujo la actividad de exoquitinasas (Fig. 5B). Sin embargo, la infección indujo un patrón de activación de β-1,3-glucanasas muy similar al tratamiento con FB1. Los ensayos en geles nativos consistentemente revelaron que a las 24 y 30 hpi se indujo la

isoforma I, que es aquella que presenta mayor movilidad electroforética, mientras que a estos mismos tiempos disminuyó la actividad de las isoformas II y III (Fig 20A).

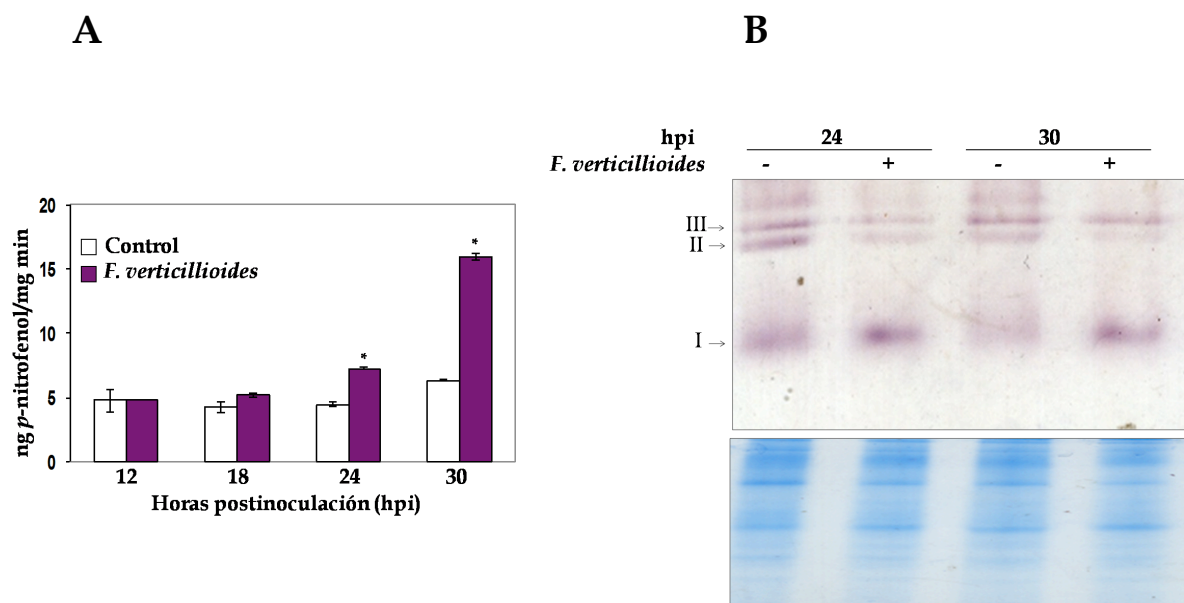


Figura 20. Efecto de la infección de *F. verticillioides* sobre la actividad de hidrolasas en embriones de maíz durante la germinación. A. Actividad total de exoquitinasa en embriones de maíz infectados y no infectados con *F. verticillioides*. Los asteriscos indican que existen diferencias significativas con respecto al control (prueba t student, $p \leq 0.05$). **B.** Patrón de actividad en gels nativos de las distintas isoformas de β -1,3-glucanasa de los extractos proteicos totales obtenidos de los embriones infectados y no infectados a las 24 y 30 hpi. El control de cargado se presenta en la parte inferior y consiste en un gel corrido en condiciones desnaturalizantes y teñido con azul de Coomassie, en cada carril se cargaron 15 μ g de proteína total.

D.3 La infección por *F. oxysporum* no provoca cambios en la actividad de las isoformas de β -1,3-glucanasa.

Los resultados anteriores son consistentes con la contribución de la FB1 en modular la actividad de las isoformas de β -1,3-glucanasa de maíz. Para descartar la función de otros efectores generales, como los PAMP (pathogen-associated molecular pattern) propios del género *Fusarium*, los embriones se inocularon con una cepa de *F. oxysporum* y se determinó la actividad de β -1,3-glucanasas. *F. oxysporum* es un hongo necrótrofo que también es patógeno de maíz pero que no produce la toxina FB1, así que utilizamos la cepa FOX18, previamente aislada de raíz de agave y caracterizada como *F. oxysporum* (SanJuan Badillo y Plasencia, 2003). Como se observa en la Fig 21A, *F. oxysporum* colonizó pobremente el tejido del maíz y los embriones no

mostraron ningún síntoma de necrosis y el número de conidias producidas a las 30 h fue de aproximadamente 18 veces menos en comparación a la cepa MY3 de *F. verticillioides* (comparar con la Fig. 16). Para descartar que este resultado se debiera a una diferencia en la capacidad de conidiación, se evaluó esta característica *in vitro* y como se observa en la Fig. 21B, las dos cepas de *Fusarium* mostraron la misma capacidad de conidiación *in vitro*. La infección por *F. oxysporum* no provocó cambios en la actividad de las distintas isoformas de β -1,3-glucanasa y solamente provocó un aumento discreto (20%) en la actividad total de exoquitinasa. Estos resultados son consistentes con el hecho de que hemos observado que la FB1 no induce la actividad de exoquitinasa pero sí es responsable de modular la actividad de β -1,3-glucanasas por diferentes mecanismos.

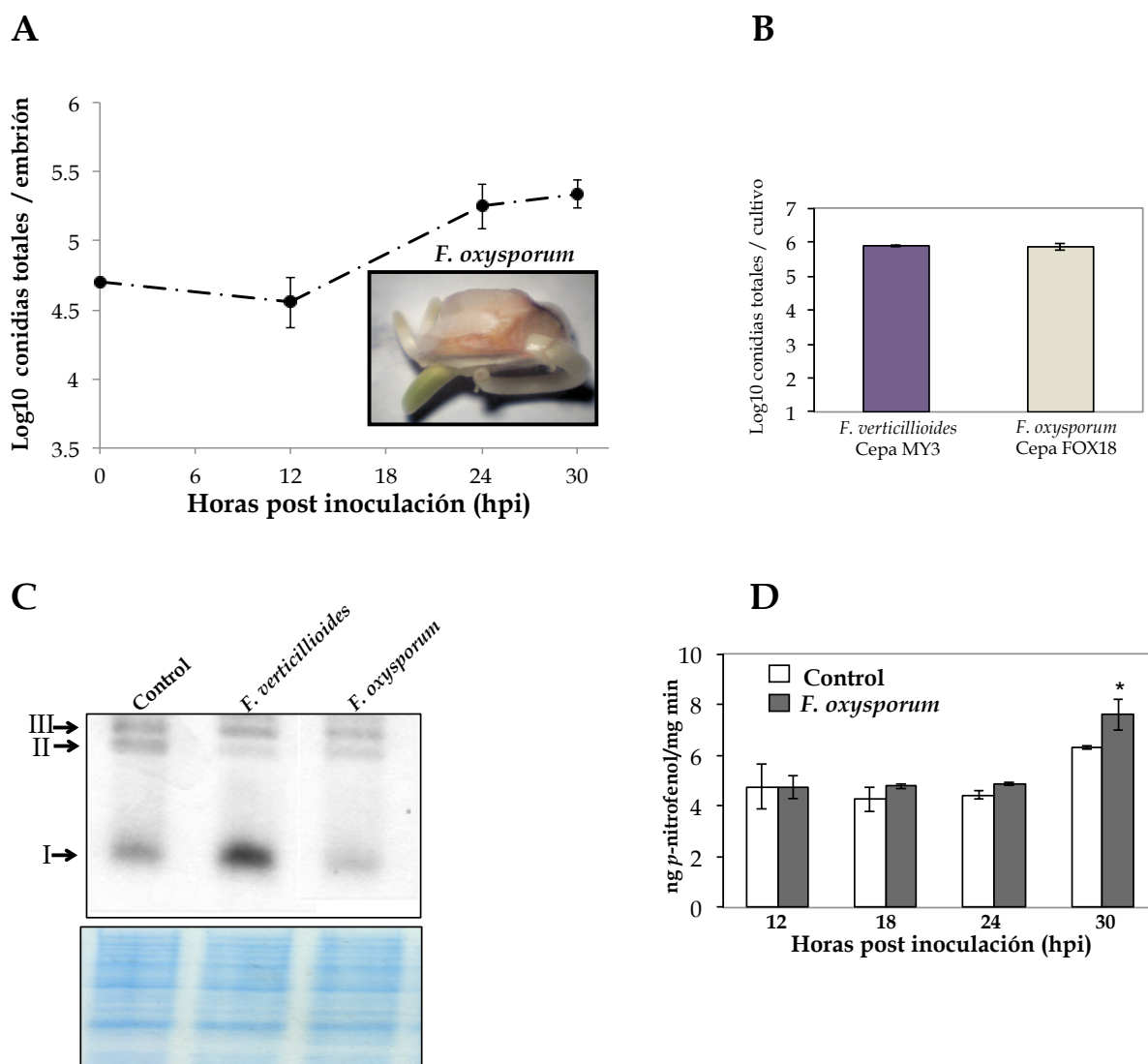


Figura 21. Efecto de la infección de *F. oxysporum* sobre la actividad de hidrolasas en embriones de maíz durante la germinación. **A** Colonización de embriones de maíz por *F. oxysporum*. Los embriones de maíz fueron inoculados con una suspensión de conidias (5×10^4) y germinados a 29°C en agar al 1%. Los embriones se colectaron a las 12, 24 y 30 h y se determinó el contenido total de conidias por embrión ($n=30$). La fotografía muestra un embrión de maíz infectado por 30 h con la cepa FOX18 de *F. oxysporum*. **B**. La cepa MY3 de *F. verticillioides* y la cepa FOX18 de *F. oxysporum* utilizadas en este estudio presentan la misma capacidad de conidiación *in vitro*. **C**. Patrón de actividad en geles nativos de las distintas isoformas de β -1,3-glucanasa de los extractos proteicos totales obtenidos de los embriones infectados y no infectados a las 24 hpi. El control de cargado se presenta en la parte inferior y consiste en un gel corrido en condiciones desnaturalizantes y teñido con azul de Coomassie, en cada carril se cargaron 15 μ g de proteína total. **D**. Actividad total de exoquitinasa en embriones de maíz infectados y no infectados con *F. oxysporum*. Los asteriscos por encima de la barra indican que existen diferencias significativas con respecto al control (prueba t student, $p \leq 0.05$).

E. La isoforma I es ácida mientras que las isoformas II y III son básicas.

Una clasificación de las β -1,3-glucanasas se basa en el punto isoelectrico de la proteína para agruparlas en ácidas o básicas. De acuerdo a esta propiedad se ha propuesto que durante el ataque por patógenos fúngicos, las hidrolasas básicas se

activan para inhibir directamente el crecimiento del patógeno mientras que las glucanasas ácidas principalmente están involucradas en generar elicitores derivados de β -1,3-glucano que funcionan como efectores de una respuesta de defensa (Kasprzewska et al. 2003, Ferreira et al. 2007).

Debido a que las distintas isoformas de β -1,3-glucanasas analizadas en este estudio mostraron diferencia tanto en el patrón de actividad como en el de movilidad electroforética, se determinó su pI. Se realizó un isoelectroenfoque en condiciones nativas en un intervalo de pH de 3 a 10 y el ensayo de actividad en gel. El ensayo en estas condiciones fue de muy baja sensibilidad por lo que se tuvieron que cargar 350 μ g de proteína total en cada carril. La Fig. 22 muestra que en el extracto de los embriones de maíz infectados con *F. verticillioides* de 24 hpi se indujo una β -1,3-glucanasa con respecto al control que migra en la región ácida. Por el patrón de inducción mostrado, esta β -1,3-glucanasa probablemente corresponde a la isoforma I con pI estimado de 5.3. Además, en la región básica se resolvieron 2 bandas de actividad que corresponderían a las isoformas II y III con un pI estimado entre 8.5 y 9.

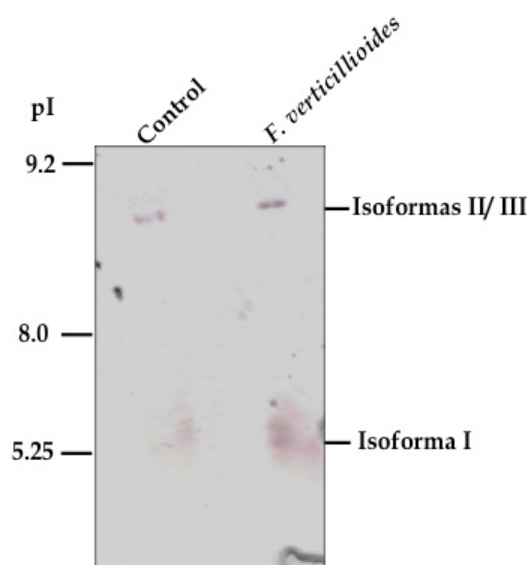


Figura 22. Isoelectroenfoque en condiciones nativas para determinar el pI de las distintas isoformas de β -1,3-glucanasas. En cada carril se cargaron 350 μ g de proteína total a partir de extractos de embriones de maíz no inoculados e inoculados con *F. verticillioides* por 24 h.

VII. DISCUSIÓN

La inoculación de embriones de maíz con *Fusarium verticillioides* representa un modelo adecuado para el estudio de esta interacción planta-patógeno pues permitió determinar la contribución de la producción de la toxina FB1 en la patogénesis. En este trabajo aportamos evidencia del papel de la FB1 como factor de virulencia explorando la capacidad de la toxina en interferir con los mecanismos de defensa en la planta de maíz. La germinación de la semilla y el establecimiento de la plántula son etapas de desarrollo en los cuales el hongo accede e infecta a la planta con la posibilidad de desarrollar una infección sistémica, ya sea por que la semilla está infectada desde un inicio o bien los propágulos del hongo sobreviven en el suelo y acceden a la semilla durante la germinación (Kedera et al. 1994; Munkvold et al. 1997).

La principal estrategia que seguimos en este estudio fue analizar el perfil temporal de actividad de dos proteínas PR: las quitinasas (PR3) y las β -1,3-glucanasas (PR2), tanto en los embriones infectados con el hongo como en los embriones que germinaron en presencia de FB1, con la finalidad de inferir las respuestas mediadas por la toxina durante la infección. Los blancos de estas enzimas son la quitina y el β -1,3-glucano, principales polisacáridos estructurales de la pared celular fúngica por lo que su degradación afecta la arquitectura de la pared celular y como consecuencia la capacidad de infección del patógeno (Pontón, 2008). La función de estas dos hidrolasas en la respuesta de defensa ha sido bien establecido por las siguientes evidencias: 1) los niveles de estas PRs aumentan durante el ataque por patógenos, ii) algunas isoformas, principalmente las formas básicas vacuolares, tienen actividad antifúngica *in vitro*, iii) plantas transgénicas que expresan constitutivamente ambas enzimas muestran menor susceptibilidad al ataque de patógenos y iv) los oligosacáridos derivados de la hidrólisis tanto de quitina como del β -1,3-glucano activan eventos característicos de una respuesta de defensa (Mauch et al. 1988; Collingel et al. 1993; Sela-Burlage et al. 1993; Cordero et al. 1994; Caruso et al. 1999). Tomando en cuenta principalmente la especificidad de sustrato y los efectos inhibitorios sobre el crecimiento de patógenos que tienen las distintas isoformas de quitinasas y β -1,3-glucanasas se ha propuesto un modelo en que estas enzimas cumplen una doble función durante la respuesta de defensa, pues actúan directamente degradando la pared celular para inhibir el crecimiento del patógeno e indirectamente promoviendo la liberación de materiales derivados de la pared celular

que funcionan como elicitores que activan respuestas de defensa en las plantas (Collinge et al. 1993; Leubner-Metzger y Meins, 1999; Kasprzewska, 2003 y Ferreira et al. 2007).

En los embriones de maíz se activan diferencialmente quitinasas y β -1,3-glucanasas en respuesta al tratamiento con FB1 y a la infección por *Fusarium verticillioides*.

Durante la germinación de los embriones de maíz se detectó una actividad basal tanto de exoquitinasas como de β -1,3-glucanasas. Esto sugiere que ambas actividades se requieren durante esta etapa de desarrollo y/o que forman parte de las defensas constitutivas de la planta. Durante la germinación en dicotiledóneas, las β -1,3-glucanasas contribuyen a la degradación del material de las diferentes capas que cubren al embrión, dando como resultado el debilitamiento del endospermo y promoviendo la protrusión radicular (Leubner-Metzger, 2003; Wu et al. 2000). Esta función fisiológica no se puede extrapolar a monocotiledóneas pues en estas plantas, la mayoría de los glucanos endógenos se encuentran en forma de β -1-(1,3-1,4)-glucanos que no son sustratos de las β -1,3-glucanasas, aunque no se puede descartar por completo su participación en la germinación (Hoj y Fincher, 1995; Carpita, 1996).

En este trabajo observamos que, durante la infección por el hongo, incrementaron de manera coordinada las actividades de exoquitinasa y de la isoforma I de β -1,3-glucanasa. Esta inducción concertada de estas dos actividades enzimáticas es consistente con su acción sinérgica. Estudios de proteómica y de expresión por microarreglos documentaron la inducción de ambas enzimas durante la infección de *F. verticillioides* en la planta de maíz (Campo et al. 2004, Lanubile et al. 2010). También, estudios *in vitro* indican que cuando se trata un cultivo de *F. solani* con ambas enzimas purificadas son más efectivas al promover la lisis de las hifas e inhibir el crecimiento (Sela-Buurlage, 1993). Este mismo comportamiento antifúngico de las diferentes isoformas de PRs se ha observado sobre *Alternaria solani*, *Trichoderma viride* y *Phytophthora infestans* (Lawrence et al. 1996). Asimismo, plantas transgénicas de tomate que sobreexpresan constitutivamente ambas enzimas muestran mayor resistencia a la infección de *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* en comparación a plantas que solamente expresan una de las enzimas (Jongedik et al. 1995).

En maíz hay múltiples isoformas de β -1,3-glucanasa cuya expresión depende

de la etapa de desarrollo de la planta y el tipo de patógeno. En este trabajo se estudió una isoforma I ácida que fue inducida por *F. verticillioides* durante la germinación. Mientras que Cordero y colaboradores detectaron por western blot que en plántulas de maíz infectadas con *F. verticillioides* se activa una isoforma básica de 33 kDa en presencia del patógeno, en contraste con otra isoforma de 35 kDa que se expresa de manera constitutiva (Cordero et al. 1994). La activación específica por patógeno también se ha observado en granos de maíz tras la infección de *Aspergillus flavus* en donde se induce una β -1,3-glucanasa de 33 kDa y no la isoforma de 30 kDa que sí se activa por la infección de *F. verticillioides* (Ji et al. 2000).

La FB1 tuvo un efecto diferencial sobre las dos hidrolasas estudiadas pues cuando se aplicó en forma pura no alteró el patrón de actividad de las exoquitinas pero sí el de las β -1,3-glucanasas. El hecho de que la infección con una cepa productora de FB1 de *F. verticillioides* generó los mismos efectos sobre la actividad de β -1,3-glucanasas sugiere que la toxina es un efector importante en la patogénesis del hongo. Para descartar que estas respuestas fueran provocadas por el reconocimiento de moléculas PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) relacionadas con *Fusarium spp*; evaluamos si la infección por *F. oxysporum* era capaz de modular la actividad de las β -1,3-glucanasas. Los PAMPs son moléculas estructurales conservadas que se encuentran en la superficie celular de los patógenos y que no están presentes en la célula huésped como las oligoquitinas, glucanos, péptidos o lipopolisacáridos y su reconocimiento por los PRRs (pattern recognition receptors) a nivel de la membrana plasmática desencadena la activación de una serie de mecanismos de defensa incluyendo la activación de MAPKs, producción de especies reactivas de oxígeno, producción de compuestos antimicrobianos y la fortificación de la pared celular (Hématy et al. 2009, Thomma et al. 2011).

El efecto dual de la FB1 sobre la actividad de las distintas isoformas de β -1,3-glucanasa sugiere claramente vías y mecanismos distintos que se discutirán a continuación.

La fumonisina B1 inhibe directamente a las isoformas básicas de β -1,3-glucanasa.

Los microorganismos patógenos han desarrollado estrategias para obtener ventajas durante la interacción con la planta hospedera; dentro de éstas se encuentran las que ocurren en la interfase extracelular y una de ellas es la secreción de inhibidores

que suprimen principalmente a las hidrolasas que secretan las plantas como parte de una respuesta de defensa (Misas-Villamil y van der Hoorn, 2008). La existencia de inhibidores que producen otros patógenos que suprimen la actividad de enzimas hidrolíticas producidas por las plantas, refleja que aún cuando podría funcionar como una estrategia general, la naturaleza de los inhibidores así como sus blancos son particulares de la interacción que se establece (Stahl y Bishop 2000; York et al. 2004; Misa-Villamil y van der Hoorn, 2008). El oomiceto *Phytophthora infestans*, patógeno de tomate y de papa, produce el inhibidor EPI10 que tiene como blanco a la proteasa P69B de tomate y también durante la infección produce los inhibidores EPIC (EPIC1 y EPIC2) que tienen similitud con inhibidores de cisteín proteasas (Tian et al. 2004, 2005 y 2007). También, el patógeno *Bipolaris zeicola* secreta una proteína de 54 kDa denominada Bz-cmp que modifica a la quitinasa básica de maíz Chia generando una enzima con baja afinidad hacia su sustrato, disminuyendo por tanto su actividad hidrolítica (Naumann et al. 2010). Recientemente Naumann y colaboradores (2011) identificaron también a estas proteínas modificadoras de quitinasas (cmps) en *F. verticillioides*. El último ejemplo relevante que se ha publicado es el que ocurre en la interacción *Phytophthora sojae* – soya, este oomiceto produce durante la infección, el inhibidor de glucanasas GIP1. GIP1 es un inhibidor de naturaleza proteica de 27 kDa y que solo inhibe la β -1,3-glucanasa A de soya (EGasaA) pero no a la isoforma EGasaB, ambas glucanasas son básicas pero durante la infección tienen un perfil de actividad diferente. La EGasaA es de expresión constitutiva mientras que la EGasaB solo se acumula durante la infección (Ham et al. 1997; Rose et al. 2002). Los resultados de este trabajo mostraron que la FB1 fue capaz de inhibir directamente a dos isoformas básicas de β -1,3-glucanasa que son de producción constitutiva y que al ser secretadas por la planta, la interacción con la FB1 podría ocurrir en el espacio extracelular durante la infección por *F. verticillioides*. Una diferencia importante en las inhibiciones selectivas hacia ciertas isoformas de β -1,3-glucanasas que se presenta tanto en la interacción *P. sojae* – soya como en la interacción *Fusarium*-maíz, es la naturaleza química del inhibidor. GIP1 es una proteína con 40% de identidad con serin-proteasas del tipo quimotripsina, aunque la proteína purificada no posee actividad proteolítica ya que carece de la triada catalítica His-Asp-Ser (Damasceno et al. 2008) y la FB1 es una micotoxina análoga a esfinganina derivada del metabolismo de policétidos.

El papel de la FB1 como inhibidor de las β -1,3-glucanasas durante la patogénesis de *F. verticillioides* está sustentado por dos hechos: primero, los niveles de FB1 que el patógeno produce y que libera en el tejido vegetal son comparables a los que se detectan cuando la FB1 se aplica exógenamente, y segundo, el valor de IC_{50} (53 μ M) estimado, corresponde a niveles de toxina que se pueden encontrar en los tejidos de maíz infectados por *F. verticillioides*.

Hay poca información en la literatura sobre inhibidores de β -1,3-glucanasas, y los principales estudios se han hecho en β -1,3-glucanasas aisladas de hongos. Por ejemplo, una β -1,3-glucanasa purificada de *Basidiomycete sp.* QM 806 se inhibe por una D-glucono-1,5-lactona con una IC_{50} de 100 mM, mientras que este mismo compuesto inhibe otras β -1,3-glucanasas aisladas de *Chyso sporium prunosum* con una IC_{50} de 37 mM (Reese and Parrish, 1971). Asimismo, una β -1,3-glucanasa de *Talaromyces emersonii* es inhibida por una glucono- δ -lactona con una K_i de 1.25 mM (O'Connell et al. 2011). También, varias 1,2-alcanolaminas alifáticas inhiben β -1,3-glucanasas de *Candida utilis* con una K_i que varía entre 1 y 300 mM (Steiner et al. 1993). Los valores tan altos de IC_{50} para estos compuestos contrastan con lo calculado para la FB1 cuyo valor está en el rango μ M. En cambio, el inhibidor GIP1 secretado por *P. sojae* forma un complejo estable con la β -1,3-glucanasas de soya (EgasaA), e inhibe a la enzima con una IC_{50} de aproximadamente 0.85 nM, reflejando una alta afinidad entre ambas proteínas (Ham et al. 1997).

La pregunta que surge es ¿cuál es la relevancia de esta inhibición en la interacción *F. verticillioides* - maíz durante la germinación?, anteriormente discutimos la posible función de estas β -1,3-glucanasas durante la germinación de acuerdo a lo publicado en dicotiledóneas (Leubner-Metzger, 2003), por lo que su inhibición podría contribuir a la colonización del patógeno durante el desarrollo de la plántula. También estas β -1,3-glucanasas podrían ser las hidrolasas que actúan en sinergia con las quitinasas y que aún cuando se observa un incremento en la actividad de la isoforma ácida de β -1,3-glucanasa durante la infección por *F. verticillioides* el efecto antifúngico alcanzado no es el óptimo. Experimentos *in vitro* han mostrado que isoformas vacuolares de ambas hidrolasas (quitinasas y β -1,3-glucanasas) son más efectivas cuando se aplican de manera conjunta en cultivos fúngicos, promoviendo la lisis de las hifas y por tanto inhibición del crecimiento (Sela-Buurlage et al. 1993).

La caracterización de la inhibición de las isoformas básicas de β -1,3-glucanasas por la FB1 constituye el tercer blanco molecular identificado para esta toxina sobre enzimas de maíz. El primer blanco que se reportó para esta toxina es la esfinganina *N*-acil transferasa que se encuentra en el retículo endoplásmico y presenta una IC_{50} de 0.1 μ M determinado en hepatocitos de rata (Wang et al. 1991). Aún cuando no se ha estudiado esta inhibición con la enzima purificada de plantas, la acumulación *in vivo* de BCL en tejidos de maíz expuestos a FB1 (Abbas et al. 1994; de la Torre et al. 2010) es producto de una reducción en la actividad de esta enzima. El otro blanco identificado es la ATPasa de protones de membrana plasmática de maíz. Por experimentos *in vitro*, se determinó que la FB1 es un inhibidor no competitivo de esta enzima con un valor de K_i de 17.5 μ M (Gutiérrez-Nájera et al. 2005). La ATPasa de protones regula varios procesos fisiológicos como la nutrición celular, la homeostasis de iones, y también participa en la repuesta de defensa (Vera-Estrella et al. 1994; Schaller and Oecking, 1999). Una de los primeros eventos que ocurren cuando la célula vegetal percibe la presencia de un patógeno, es una rápida desfosforilación de la ATPasa de protones en la membrana plasmática, conduciendo a un incremento en la actividad enzimática y una subsecuente acidificación en el medio extracelular (Vera-Estrella et al. 1994).

Estas tres acciones inhibitorias de la FB1 en blancos que se encuentran en diferentes compartimentos celulares podría ser suficiente para generar un escenario en el cual las respuestas de defensa de la planta son suprimidas o evadidas facilitando la colonización del hongo necrótrofo (Fig. 23). Además, recientemente se ha reportado que en astrocitos, la FB1 inhibe el complejo I mitocondrial que conduce a una disminución en la respiración celular y una desregulación de la homeostasis de calcio celular (Domijan and Abramov, 2011).

No es sorprendente que la FB1 tenga diferentes blancos moleculares ya que comparte estructuralmente algunas características con componentes membranales y esto hace que tenga acceso a componentes proteicos de diferente localización subcelular.

La fumonisina B1 induce la isoforma I de β -1,3-glucanasa a través de la vía del ácido salicílico (SA).

Los resultados de este trabajo mostraron que la isoforma ácida de β -1,3-glucanasa fue inducida tanto por el tratamiento con FB1 como por la infección con

F. verticillioides en los embriones de maíz. Estos datos permiten proponer un modelo en el que la FB1 es producida por el patógeno *in vivo* durante la infección y esta molécula es el efector de la inducción de la isoforma I. Para apoyar esto, determinamos los niveles del transcrito del gen *FvFUM1*, y de la micotoxina a lo largo de la infección. Se detectó el transcrito a partir de las 18 hpi y los niveles de FB1 en el tejido a las 24 y 30 h (65-200 ng/g) son comparables a los que se detectan cuando los embriones de maíz son imbibidos en presencia de la micotoxina. Estos datos son fisiológicamente relevantes pues, aunque la capacidad de producir FB1 es una característica variable entre las cepas de *F. verticillioides*, hay cepas que producen niveles elevados de la toxina *in vivo*. En sustrato esterilizado, los niveles de FB1 pueden alcanzar hasta 5.5 mM (Desjardins et al. 1994; Desjardins et al. 1995; Sánchez-Rangel et al. 2005), y en cuanto a la incidencia natural, se han encontrado niveles de FB1 que oscilan entre 0.03 μ M y 693 μ M de FB1 en semillas de maíz (Doko et al. 1995; Fadl et al. 1998; Kedera et al. 1999).

La FB1 se clasifica como una micotoxina análoga a esfinganina (SAM) y ha sido bien caracterizado su efecto inhibitorio sobre la actividad de la esfinganina *N*-acil transferasa, una enzima asociada al retículo endoplásmico. Esta inhibición provoca la disminución en la síntesis de esfingolípidos complejos y una acumulación de BCLs (Abbas et al. 1994; Abbas et al. 1998). El papel de las BCLs como moléculas señalizadoras ha sido documentado en plantas por distintas estrategias experimentales. La adición exógena de esfingosina, esfinganina y fitoesfingosina a una concentración de 2 μ M en hojas de *A. thaliana* activa la producción de especies reactivas de oxígeno y muerte celular (Shi et al. 2007). La esfinganina activa la vía de la MPK6, que es un transductor en la señalización de las respuestas de defensa asociadas a la respuesta de hipersensibilidad que derivan en muerte celular en plántulas de *A. thaliana* (Saucedo-García, et al. 2011). Estos datos son consistentes con la inducción de la vía de SA por la FB1 pues la MPK6 es inducida por esta fitohormona y células de *A. thaliana* que sobreexpresan el gen *NahG* (SA-hidroxilasa) y por tanto tienen menos niveles de SA, muestran resistencia al tratamiento de la FB1 (70 nM) en comparación a las células no transformadas (Asai et al. 2000). Asimismo, en plántulas de *Arabidopsis* tratadas con FB1 se induce la expresión de genes relacionados con la patogénesis: PR-1, PR-2, y PR-5, que son regulados por SA (Stone et al. 2000). En maíz, la FB1 genera la acumulación de SA de una manera dependiente

de dosis y provoca la activación de una nucleasa. Ambos efectos son mediados por la acumulación de BCLs pues la esfinganina exógena tiene los mismos efectos (de la Torre et al. 2010).

En este estudio, la asociación entre la inducción de la isoforma I de β -1,3-glucanasa y la vía del SA mediado por BCLs se pudo establecer debido a que: 1) la activación de la β -1,3-glucanasa coincidió temporalmente con la máxima acumulación de esfinganina que se detectó en los embriones de maíz cuando germinaron en presencia de la FB1, 2) el tratamiento con INA, un análogo del SA, indujo fuertemente a la isoforma I y 3) tanto el tratamiento con la toxina como la infección por *F. verticillioides* incrementaron los niveles de transcrito del gen *ZmPAL*. Además, el aumento en los niveles de transcrito de *ZmPRm* durante la infección por *F. verticillioides* y el tratamiento con FB1 se suma a las evidencias de la participación de la vía del SA en la interacción *F. verticillioides* - maíz. PRm pertenece al grupo de PR-1, y en dicotiledóneas, el aumento de su expresión se asocia con una activación de la vía del SA. PRm tiene 54% de identidad con *AtPR-1* y el promotor de *ZmPRm* contiene elementos potenciales de respuesta a SA, tales como cajas W y sitios de unión para factores de transcripción del tipo WRKY que se relacionan con la transducción de la señal activada por SA (Loake y Grant, 2007). Además de los resultados asociativos encontrados en este trabajo que sugieren que la actividad de la isoforma I se induce a través de la vía del SA, una estrategia para demostrarlo, sería explorar la actividad de la isoforma I de β -1,3-glucanasa en plantas tratadas con la toxina o infectadas con *F. verticillioides* y que estén comprometidas en la biosíntesis y/o en la vía de señalización mediada por el SA. Sería útil explorar la actividad de la isoforma I en plantas transformadas con el transgen *NahG* (SA-hidroxilasa) y que por tanto tienen menos niveles de SA (Gaffney et al. 1993), o en plantas mutantes *npr1*. La proteína NPR1 es un componente esencial en muchas respuestas mediadas por el SA (Després et al. 2003).

En los embriones de maíz en germinación, la esfinganina fue la BCL que se detectó en niveles más altos y esto contrasta con los datos reportados por otros grupos (Williams et al. 2007; Zitomer et al. 2010) quienes encontraron que en plántulas de maíz inoculadas con *F. verticillioides* tratadas con FB1, la fitoesfingosina es la BCL más abundante. En embriones de maíz, la relación

esfinganina/fitoesfingosina (ESN/PSN) es igual a 4 a las 24 h, tiempo en donde se presentó la mayor acumulación, mientras que en las plántulas de maíz tratadas con FB1 y *F. verticillioides* esta relación es de 0.3 (Williams et al. 2007). Esta discrepancia deriva de la composición lipídica en semillas, y en particular del escutelo de los embriones de maíz que difiere de otros estadios de desarrollo. Por ejemplo en las glucosilceramidas de semillas de chícharo la esfinganina es más abundante que la fitoesfingosina con un valor de (ESN/PSN) igual a 2 (Ito et al. 1985), mientras que en el germen de trigo este valor es de 7 (Takakuwa et al. 2005).

Una pregunta que surge es ¿por qué la infección puede progresar eficientemente si hay un incremento en la actividad de una isoforma de β -1,3-glucanasa que su blanco celular es la pared celular del patógeno?. De acuerdo a la predicción como una isoforma ácida y con la información que se cuenta en la literatura, es posible que esta isoforma participe principalmente en la generación de elicitores derivados de β -1,3-glucano. Se sabe que en monocotiledóneas, la laminarihexosa, un oligosacárido derivado del β -1,3-glucano estimula la actividad de quitinasas y un aumento en la actividad de PAL (Inui *et al*; 1997). Los mecanismos activados por los elicitores derivados de β -1,3-glucano podrían exacerbar la respuesta de defensa y eventualmente conducir a la muerte celular, estado ideal para el crecimiento del hongo necrótrofo.

La Fumonisina B1 modula selectivamente la actividad de las β -1,3-glucanasas de maíz durante la infección de *Fusarium verticillioides* por dos mecanismos independientes.

El papel ya documentado de los esfingolípidos como transductores de señales en la respuesta de defensa y en la muerte celular programada asociada a HR (Shi et al. 2007; Takahashi et al. 2009; Peer et al. 2010), sitúa al metabolismo de esfingolípidos como un blanco potencial de efectores secretados por patógenos. De esta forma, las SAMs han evolucionado al menos en dos hongos necrótrofos diferentes: *Alternaria alternata* y *Fusarium verticillioides* que eficientemente inhiben el metabolismo de esfingolípidos causando acumulación de LCBs promoviendo la muerte celular de la planta hospedera; además las SAMs poseen funciones adicionales que pueden provocar el desvío o evasión de las respuestas de defensa de la planta hospedera (Sánchez-Rangel y Plasencia, 2010). Al inhibir a la esfinganina N-

acil transferasa, las BCLs se acumulan y activan varias vías de señalización que conducen a la producción de SA. En maíz, un efecto de la activación de la vía del SA es el aumento en la actividad de la isoforma ácida de β -1,3-glucanasa y la inducción de *ZmPRm* (Fig. 23).

De manera general se ha establecido que las vías de JA/ET son activadas durante la defensa para actuar de manera sinérgica ante el ataque de patógenos necrótrofos y la vía del SA se activa durante el ataque de patógenos biótropos (Bari and Jones, 2009; Pieterse et al. 2009). Las interacciones entre estas vías de señalización hormonales durante la defensa son muy complejas, sin embargo se ha documentado una relación antagónica entre las vías de SA y JA. En *A. thaliana*, la aplicación de SA suprime la expresión de genes marcadores de la vía del JA como son PDF1 (plant defensin) y VSP2 (vegetative storage protein 2) (Spoel et al. 2003; Koomneef et al. 2008). Además, el SA inhibe la inducción de genes de la biosíntesis de JA como son AOS (aleno óxido sintasa), LOX2 (lipooxigenasa) y OPR3 (12-oxo-fitodienoato reductasa3) (Stenzel et al. 2003; Leon-Reyes et al. 2010). Así que el hecho que se active la vía del SA durante la infección por *F. verticillioides*, podría suprimir la vía de señalización mediada por JA que es activada para la defensa en contra de patógenos necrotrófos (Fig. 23).

La relación entre los niveles de SA y la acumulación de BCLs no sólo se ha observado por la acción de la fumonisina, sino también en varias mutantes de *Arabidopsis* afectadas en el metabolismo de esfingolípidos. Mutaciones en los genes *ACD5*, (Liang et al. 2003), *ACD11* (Brodersen et al. 2002), y *ERH1*, (Wang et al. 2008) que codifican una ceramida cinasa, un transportador de esfingosina y una glucosilceramida sintasa producen un fenotipo con niveles elevados de SA expresión constitutiva de genes relacionados con la patogénesis (PR1, PR2, PR3). De esta manera la FB1, a través de una vía dependiente de la acumulación de BCLs, activa vías que conducen a la muerte celular, y suprime las respuestas de la célula hospedera que favorecen el desarrollo del necrótrofo. También, a través de una vía independiente de la acumulación de BCLs afecta otros blancos celulares, como la inhibición de las isoformas básicas de β -1,3-glucanasas que forman parte de mecanismos de defensa constitutivos, así como la de la ATPasa de membrana plasmática. La actividad de este efector en distintos blancos y compartimentos celulares contribuirá a una infección exitosa del hongo necrótrofo.

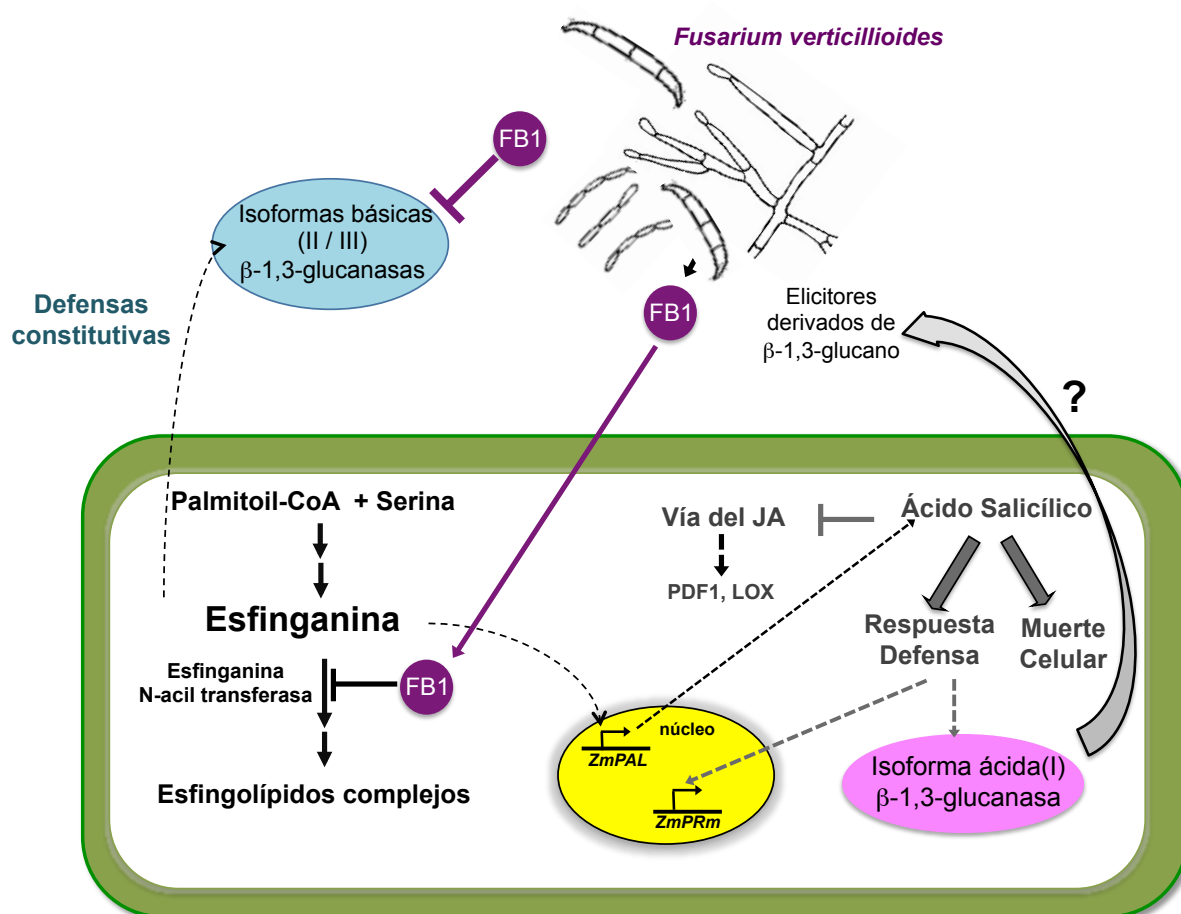


Figura 23. La fumonisina B1 selectivamente modula la actividad de las distintas isoformas de β -1,3-glucanasa durante la infección por *Fusarium verticillioides* por dos mecanismos independientes. La FB1 presente en el suelo o producida y secretada por el hongo durante la infección, probablemente inhibe directamente la actividad de las isoformas básicas en el espacio extracelular facilitando la colonización. También, la FB1 inhibe a la esfinganina N-acil transferasa en la planta hospedera causando acumulación de BCLs que activa la vía del SA y que a su vez induce la isoforma I de β -1,3-glucanasa. La activación de la vía del SA podría suprimir la vía del ácido jasmónico facilitando la proliferación del necrófito. *Flechas sólidas*: indica activación, inducción o acumulación de compuestos o transcritos, mientras que la *flechas no continuas* representan interacciones hipotéticas.

VIII. CONCLUSIONES

La fumonisina B1, producida por *Fusarium verticillioides*, modula la actividad de tres β -1,3-glucanasas de maíz por dos mecanismos independientes. La inhibición de las dos isoformas básicas ocurre posiblemente por una interacción directa entre la enzima y la toxina; mientras que en la inducción de la isoforma ácida participa la vía del ácido salicílico y se asocia con la acumulación de BCL. Ambos mecanismos podrían contribuir al desarrollo de una infección exitosa.

CONCLUSIONES PARTICULARES

- ④ La FB1 no tiene efecto sobre la actividad de exoquitinasa total.
- ④ Las evidencias experimentales sugieren que la FB1 inhibe de manera selectiva y directa la actividad de dos isoformas básicas presentes en los embriones de maíz en germinación.
- ④ El tratamiento con FB1 induce la actividad de una isoforma ácida presente en los embriones de maíz en germinación.
- ④ La esfinganina es la BCL que se acumula en mayores niveles celulares en los embriones de maíz germinados en presencia de la toxina.
- ④ La inducción de la isoforma I coincide temporalmente con el máximo aumento de esfinganina y con la inducción de *ZmPAL*, correlaciones que sugieren la activación de la vía del SA mediada por un aumento en los niveles de BCLs durante el tratamiento con FB1.
- ④ El INA, un análogo del SA, induce la actividad de la isoforma I.
- ④ La colonización en los embriones de maíz por la cepa de *F. verticillioides* es más rápida y eficiente que la colonización por *F. oxysporum*.

- ② *F. verticillioides* produce FB1 en cantidades fisiológicamente relevantes en las primeras 30 horas de infección.
- ② La infección por *F. verticillioides* reproduce el patrón de actividad observado durante el tratamiento con FB1: inducción de la isoforma I y una inhibición de las dos isoforma básicas.
- ② La infección por *F. verticillioides* sí induce la actividad de exoquitinasa total.
- ② La infección por *F. oxysporum* no provocó un efecto en la actividad de las diferentes isoformas de β -1,3-glucanasas.
- ② Durante la infección por *F. verticillioides* se induce los niveles de transcrito de *ZmPAL* indicando la participación de la vía del SA durante la interacción hongo - maíz.
- ② La modulación en la actividad de las distintas isoformas de β -1,3-glucanasas contribuye a la acción de la FB1 como factor de virulencia y al conocimiento de su papel para propiciar un escenario que conducen a una infección más eficiente.

IX. BIBLIOGRAFÍA

- Abbas HK, Boyette CD (1992) Phytotoxicity of fumonisin B1 on weed and crop species. *Weed Technol* 6: 548-52.
- Abbas HK, Paul RN, Riley RT, Tanaka T, Shier WT (1998) Ultrastructural effects of AAL-toxin T_A from the fungus *Alternaria alternata* on black nightshade (*Solanum nigrum* L.) leaf discs and correlation with biochemical measures of toxicity. *Toxicon* 36: 1821-1832.
- Abbas HK, Tanaka T, Duke SO, Porter JK, Wray EM, Hodges L, Sessions AE, Wang E, Merrill AH, Riley RT (1994) Fumonisin- and AAL-toxin-induced disruption of sphingolipid metabolism with accumulation of free sphingoid bases. *Plant Physiol* 106: 1085-1093.
- Antoniw JF, Ritter CE, Pierpoint WS, Van Loon LC (1980) Comparison of three pathogenesis-related proteins from plants. *J Gen Virol* 47:79-87.
- Araki T, Torikata T (1995) Structural classification of plant chitinases: two subclasses in class I and class II chitinases. *Biosci Biotech Biochem*. 59: 336-338.
- Asai T, Stone JM, Heard JE, Kovtun Y, Yorgey P, Sheen J, Ausubel FM (2000) Fumonisin B1-induced cell death in *Arabidopsis* protoplasts requires jasmonate, ethylene, and salicylate-dependent signaling pathways. *Plant Cell* 12: 1823-1835.
- Aziz A, Poinssot B, Daire X, Adrian M, Bézier A, Lambert B, Oubert JM, Pugin A (2003) Laminarin elicits defense responses in grapevine and induces protection against *Botrytis cinerea* and *Plasmopara viticola*. *Mol Plant-Microbe Interac* 16: 1111-1128.
- Bacon CW, Marijanovic DR, Norred WP, Hinton DM (1989) Production of fusarin C on cereal and soybean by *Fusarium moniliforme*. *Appl Environ Microbiol* 55: 2745-48.
- Bacon CW, Porter JK, Norred WP, Leslie JF (1996) Production of fusaric acid by *Fusarium* species. *Appl Environ Microbiol* 62: 4039-43.
- Bacon CW, Yates IE, Hinton DM, Meredith F (2001) Biological control of *Fusarium moniliforme* in maize. *Environ Health Persp* 109: 325-332.
- Bartók T, Szécsi A, Szekeres A, Mesterházy A, Bartók M (2006) Detection of new fumonisin mycotoxins and fumonisin-like compounds by reversed-phase high-performance liquid chromatography/electrospray ionization ion trap mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 20: 2447-62.
- Bari R, Jones J (2009) Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Mol Biol* 69: 473-88.
- Bishop JG, Dean AM, Mitchell-Olds T (2000) Rapid evolution in plant chitinases: molecular targets of selection in plant-pathogen coevolution. *PNAS USA* 97: 5322-5327.
- Blackwell BA, Edwards OE, Fruchier A, ApSimon JW, Miller JD (1996) NMR structural studies of fumonisin B1 and related compounds from *Fusarium moniliforme*. *Adv. Exp. Med. Biol* 392: 75-91.
- Bluhm BH, Woloshuk CP (2005) Amylopectin induces fumonisin B1 production by *Fusarium verticillioides* during colonization of maize kernels. *Mol Plant-Microbe Interact* 18: 1333-9.
- Bluhm BH, Woloshuk CP (2006) Fck1, a C-type cyclin-dependent kinase, interacts with Fcc1 to regulate development and secondary metabolism in *Fusarium verticillioides*. *Fungal Genet Biol* 43: 146-54.
- Bluhm BH, Kim H, Butchko RA, Woloshuk CP (2008) Involvement of ZFR1 of *Fusarium verticillioides* in kernel colonization and the regulation of FST1, a putative sugar transporter gene required for fumonisin biosynthesis on maize kernels. *Mol Plant Pathol* 9: 203-11.
- Bojja RS, Cerny RL, Proctor RH, Du L (2004) Determining the biosynthetic sequence in the early steps of the fumonisin pathway by use of three gene-disruption mutants of *Fusarium verticillioides*. *J Agric Food Chem* 19: 2855-60.
- Boller T, Gehri A, Mauch F, Vögeli U (1983) Chitinase in bean leaves: induction by ethylene, purification, properties, and possible function *Planta*. 157: 22-31.
- Borner GH, Sherrier DJ, Weimar T, Michaelson LV, Hawkins ND, Macaskill A, Napier JA, Beale MH, Lilley KS, Dupree P (2005) Analysis of detergent-resistant membranes in *Arabidopsis*. Evidence for plasma membrane lipid rafts *Plant Physiol*. 137: 104-116
- Bradford M (1976) A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Anal Biochem* 72: 248-254
- Brodhagen M, Keller NP (2006) Signalling pathways connecting mycotoxin production and sporulation. *Mol Plant Pathol* 7: 285-301.
- Brodersen P, Petersen M, Pike HM, Olszak B, Skov S, Odum N, Jørgensen LB, Brown RE, Mundy J (2002) Knockout of *Arabidopsis accelerated-cell-death11* encoding a sphingosine transfer protein causes activation of programmed cell death and defense. *Genes Dev* 16: 490-502.

- Brogliè K, Cher I, Holliday M, Cressman R, Biddle P, Knowlton S, Mauvais CJ, Brogliè R (1991) Transgenic plants with enhanced resistance to the fungal pathogen *Rhizoctonia solani*. *Science*. 254: 1194-1197.
- Bromley PE, Li YO, Murphy SM, Sumner CM, Lynch DV (2003) Complex sphingolipids synthesis in plants: characterization of inositolphosphorylceramide synthase activity in bean microsomes. *Arch Biochem Biophys* 417: 219-226.
- Brown DW, Butchko RA, Busman M, Proctor RH (2007) The *Fusarium verticillioides* FUM gene cluster encodes a Zn(II)2Cys6 protein that affects FUM gene expression and fumonisin production. *Eukaryot Cell*. 6: 1210-8.
- Butchko RA, Plattner RD, Proctor RH (2003) FUM13 encodes a short chain dehydrogenase/reductase required for C-3 carbonyl reduction during fumonisin biosynthesis in *Gibberella moniliformis*. *J. Agric. Food Chem* 51: 3000-3006.
- Campo S, Carrascal M, Coca M, Abian J, San Segundo B (2004) The defense response in germinating maize embryos against fungal infection: A proteomics approach. *Proteomics* 4: 383-396
- Carpita N (1996) Structure and biogenesis of the cell walls of grasses. *Annu Rev Plant Physiol. Plant Mol Biol* 47: 445-476.
- Caruso C, Chilosi G, Caporale C, Leonardo L, Bertini L, Magro P, Buonocore V (1999) Induction of pathogenesis-related proteins in germinating wheat seeds infected with *Fusarium culmorum*. *Plant Sci* 140: 87-97
- Casacuberta JM, Puigdomènech P, San Segundo B (1991) A gene coding for a basic pathogenesis-related (PR-like) protein from *Zea mays*. Molecular cloning and induction by a fungus (*Fusarium moniliforme*) in germinating maize seeds. *Plant Mol Biol* 16: 527-536.
- Casacuberta JM, Raventós D, Puigdomènech P, San Segundo B (1992) Expression of the gene encoding the PR-like protein PRms in germinating maize embryos. *Mol Gen Genet* 234: 97-104.
- Chen M, Cahoon EB, Saucedo-García M, Plasencia J, Gavilanes-Ruiz M. 2009. Plant sphingolipids; structure, synthesis and function. In: Wada H, Murata N, Govindjee, eds. *Lipids in Photosynthesis: Essential and regulatory functions*. Dordrecht: Springer Science, 77-115.
- Choi YE, Shim WB (2008) Functional characterization of *Fusarium verticillioides* CPP1, a gene encoding a putative protein phosphatase 2A catalytic subunit. *Microbiology* 154: 326-36.
- Cohen-Kupiec R, Chet I (1998) The molecular biology of chitin digestion. *Curr. Opin. Biotech* 9: 270-277.
- Collingel DB, Kragh KM, Mikkelsen JD, Nielsen KK, Rasmussen U, Vad K (1993) Plant chitinases. *Plant J* 3: 31-40.
- Cordero MJ, Raventós D, San Segundo B (1994) Differential expression and induction of chitinases and β -1,3-glucanases in response to fungal infection during germination of maize seeds. *Mol Plant-Microbe Interact* 7: 23-31.
- Cortez-Rocha MO; Ramírez-Astudillo WR; Sánchez-Mariñez RI; Rosas-Burgos EC; Wong-Corral FJ; Borboa-Flores J; Castellón-Campaña LG; Tequida-Meneses M (2003) Fumonisin and fungal species in corn from Sonora, Mexico. *Bull Environ Contam Toxicol* 70:668-673.
- Coursol S, Fan LM, Le Stunff H, Spiegel S, Gilroy S, y Assmann SM (2003) Sphingolipid signalling in *Arabidopsis* guard cells involves heterotrimeric G proteins. *Nature* 423: 651-654.
- Damasceno C, Bishop JG, Ripoll DR, Win J, Kamoun S, Rose JKC (2008) Structure of the glucanase inhibitor protein (GIP) family from *Phytophthora* species suggests coevolution with endo-beta-1,3-glucanases. *Mol Plant-Microbe Interact* 21: 820-830.
- de la Torre-Hernandez ME, Rivas-San Vicente M, Greaves-Fernandez N, Cruz-Ortega R, Plasencia J (2010) Fumonisin B1 induces nuclease activation and SA accumulation through long-chain sphingoid base build-up in germinating maize. *Physiol Mol Plant Pathol* 74: 337-334.
- Derckel JP, Bailleul F, Manteau S, Audran JC, Haye B, Lambert B, Legendre L (1999) Differential induction of grapevine defenses by two strains of *Botrytis cinerea*. *Biochem Cell Biol*. 89: 197-203.
- Desjardins AE, Plattner RD, Nelson PE (1994) Fumonisin production and other traits of *Fusarium moniliforme* strains from maize in northeast Mexico. *Appl Environ Microbiol* 60: 1695-1697.
- Desjardins AE, Plattner RD, Nelsen TC, Leslie JF. (1995) Genetic analysis of fumonisin production and virulence of *Gibberella fujikuroi* mating population A (*Fusarium moniliforme*) on maize (*Zea mays*) seedlings. *Appl Environ Microbiol* 61: 79-86.
- Desjardins AE, Plattner RD (2000) Fumonisin B1-nonproducing strains of *Fusarium verticillioides* cause maize (*Zea mays*) ear infection and ear rot. *J Agric Food Chem* 48: 5773-5780.
- Desjardins AR, Plattner RD, Stessman RJ, McCormick SP, Millard MJ (2005) Identification and heritability of fumonisin insensitivity in *Zea mays*. *Phytochemistry* 66: 2474-80.
- Desjardins, A.E. 2006. *Fusarium* mycotoxins: chemistry, genetics and biology. St. Paul, MN: The

- American Phytopathological Society.
- Desjardins AE, Busman M, Muhitch M, Proctor RH (2007) Complementary host-pathogen genetic analyses of the role of fumonisins in the *Zea mays-Gibberella moniliformis* interaction. *Physiol Mol Plant Pathol* 70: 149-160.
- Després C, Chubak C, Rochon A, Clark R, Bethune T, Desveaux D, Fobert P (2003) The Arabidopsis NPR1 disease resistance protein is a novel cofactor that confers redox regulation of DNA binding activity to the basic domain/leucine zipper transcription factor TGA1. *Plant Cell* 15: 2181-2191.
- Doehlert DC, Knutson CA, Vesonder RF (1994) Phytotoxic effects of fumonisin B1 on maize seedling growth. *Mycopathologia* 127: 117-121.
- Doko MB, Rapior S, Visconti AN, Schojoth JE (1995) Incidence and levels of fumonisin contamination in maize genotypes grown in Europe and Africa. *J Agric Food Chem* 43:429-434.
- Domijan AM, Abramov AY (2011) Fumonisin B1 inhibits mitochondrial respiration and deregulates calcium homeostasis Implication to mechanism of cell toxicity. *Int J Biochem Cell Biol* 43: 897-904.
- Duncan KE, Howard RJ (2010) Biology of maize kernel infection by *Fusarium verticillioides*. *Mol Plant Microbe Interact* 23: 6-16.
- Dunn TM, Lynch DV, Michaelson LV, Napier JA (2004) A post-genomic approach to understanding sphingolipid metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Ann Bot* 93: 483-97.
- Elmore JM, Coaker G (2011) The role of the plasma membrane H⁺-ATPase in plant-microbe interactions. *Mol Plant* 4: 416-427.
- Fadl AEM (1998) Occurrence and toxigenicity of *Fusarium moniliforme* from freshly harvested maize ears with special references to fumonisin production in Egypt. *Mycopathologia* 140: 99-103.
- Felix G, Baureithel K, Boller, T (1998) Desensitisation of the perception system for chitin fragments in tomato cells. *Plant Physiol* 117: 643-650.
- Ferreira R, Monteiro S, Freitas R, Santos C, Chen Z, Batista L, Duarte J, Borges A, Teixeira A (2007) The role of plant defence proteins in fungal pathogenesis. *Mol Plant Pathol* 8: 677-700.
- Flaherty JE, Pirttil AM, Bluhm BH, Woloshuk CP (2003) PAC1, a pH regulatory gene from *Fusarium verticillioides*. *Appl Environ Microbiol* 69: 5222-27.
- Flaherty JE, Woloshuk CP (2004) Regulation of fumonisin biosynthesis in *Fusarium verticillioides* by a zinc binuclear cluster-type gene, ZFR1. *Appl Environ Microbiol* 70: 2653-59.
- Gable K, Han G, Monaghan E, Bacikova D, Natarajan M, Williams R, Dunn TM (2002) Mutations in the yeast LCB1 and LCB2 genes, including those corresponding to the hereditary sensory neuropathy type I mutations, dominantly inactivate serine palmitoyltransferase. *J Biol Chem* 277: 10194-10200.
- Gaffney T, Friedrich L, Vernooij B, Negrotto D, Nye G, Uknes S, Ward E, Kessmann H, Ryals J (1993) Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. *Science* 261: 754-756.
- Gao X, Shim WB, Göbel C, Kunze S, Feussner I, Meeley R, Balint-Kurti P, Kolomiets M (2007) Disruption of a maize 9-lipoxygenase results in increased resistance to fungal pathogens and reduced levels of contamination with mycotoxin fumonisin. *Mol Plant-Microbe Interact* 20: 922-33.
- Glenn AE, Zitomer NC, Zimeri AM, Williams LD, Riley RT, Proctor RH (2008) Transformation-mediated complementation of a *FUM* gene cluster deletion in *Fusarium verticillioides* restores both fumonisin production and pathogenicity on maize seedlings. *Mol Plant-Microbe Interact* 21: 87-97.
- Greenberg JT, Silverman FP, Liang H (2000) Uncoupling salicylic acid-dependent cell death and defense-related responses from disease resistance in the *Arabidopsis* mutant *acd5*. *Genetics* 156: 341-350.
- Gutiérrez-Nájera N, Muñoz-Clares RA, Palacios-Bahena S, Ramirez J, Sanchez-Nieto S, Plasencia J, Gavilanes-Ruiz M (2005) Fumonisin B1, a sphingoid toxin, is a potent inhibitor of the plasma membrane H⁺-ATPase. *Planta* 221: 589-596.
- Haïssam J, Lepoivre P (1998) Characterization of an Exo-β-1,3-glucanase produced by *Pichia animala* Strain K, antagonist of *Botrytis cinerea* on apples. *Phytopathology* 88: 335-343
- Ham K, Wu S, Darvill A, Albersheim P (1997) Fungal pathogens secrete and inhibitor protein that distinguishes isoforms of plant pathogenesis-related endo-β-1,3-glucanases. *Plant J* 11: 169-179.
- Hamel F, Bellemare G (1995) Characterization of a class I c-hitinase gene and of wound-inducible, root and flower-specific chitinase expression in *Brassica napus*. *Biochim Biophys Acta* 1263: 212-220.

- Hao D, Ohme-Takagi M, Sarai A (1998) Unique mode of GCC box recognition by the DNA-binding domain of ethylene-responsive element-binding factor (ERF domain) in plant. *J. Biol. Chem* 273: 26857-26861.
- Hématy K, Cherk C, Somerville S (2009) Host-pathogen warfare at the plant cell wall. *Curr Opin Plant Biol* 12: 406-413.
- Hillig I, Leipelt M, Ott C, Zahringer U, Warnecke D, Heinz E (2003) Formation of glucosylceramide and sterol glucoside by a UDP-glucose-dependent glucosylceramide synthase from cotton expressed in *Pichia pastoris*. *FEBS Lett* 553: 365-369.
- Henrissat B, Bairoch A (1996) Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. *Biochem. J* 316: 695-696.
- Hoj PB, Fincher GB (1995) Molecular evolution of plant β -glucan endohydrolases. *Plant J* 7: 367-79.
- Hu LB, Zhang T, Yang ZM, Zhou W, Shi ZQ (2009) Inhibition of fengycins on the production of fumonisin B1 from *Fusarium verticillioides*. *Lett Appl Microbiol* 48: 84-89.
- Huffman J, Gerber R, Liangcheng, D (2010) Recent advancements in the biosynthetic mechanisms for polyketide-derived mycotoxins. *Biopolymers* 93: 764-776.
- Ingle RA, Carstens M, Denby KJ (2006) PAMP recognition and the plant-pathogen arms race. *BioEssays* 28: 880-889.
- Inui H, Yamaguchi Y, Hirano S (1997) Elicitor actions of N-acetylchitooligosaccharides and laminarioligosaccharides for chitinase and L-phenylalanine ammonia-lyase induction in rice suspension culture. *Biosci Biotech Biochem* 61: 975-978.
- Ito S, Ohnishi M, Fujino Y (1985) Investigation of sphingolipids in pea seeds. *Agric Biol Chem* 49: 539-540.
- Jach G, Gornhardt B, Mundy J, Logemann J, Pinsdorf E, Leah R, Schell J, Maas C (1995) Enhanced quantitative resistance against fungal disease by combinatorial expression of different barley antifungal proteins in transgenic tobacco *Plant J*. 8: 97-109.
- Ji C, Norton RA, Wicklow DT, Dowd P (2000) Isoform patterns of chitinase and β -1,3-glucanase in maturing corn kernels (*Zea mays* L.) associated with *Aspergillus flavus* milk stage infection. *J Agric Food Chem* 48: 507-511
- Jiménez M, Matei JJ, Hinojo MJ, Mateo R (2003) Sugars and amino acids as factors affecting the synthesis of fumonisins in liquid cultures by isolates of the *Gibberella fujikuroi* complex. *Int J Food Microbiol* 89: 185-93
- Jongedik E, Tigelaar H, van Roekel JSC, Bres-Vloemans SA, Dekker I, van den Elzen PMJ, Cornelissen BCJ, Melchers LS (1995) Synergetic activity of chitinases and β -1,3-glucanases enhances fungal resistance in transgenic tomato plants *Euphytica*. 85: 173-180.
- Jurado M, Marín P, Magan N, González-Jaén MT (2008) Relationship between solute, matric potential stress, temperature, growth, and *FUM1* gene expression in two *Fusarium verticillioides* strains from Spain. *Appl Environ Microbiol* 74: 2032-36.
- Kasprzewska A (2003) Plant Chitinases: regulation and function. *Cell Mol Biol Lett* 8: 809-824.
- Kedera CJ, Leslie JF, Claflin LE (1994) Genetic diversity of *Fusarium* Section Liseola (*Gibberella fujikuroi*) in individual maize stalks. *Phytopathology* 84: 603-607
- Kedera CJ, Plattner RD, Desjardins AE (1999) Incidence of *Fusarium spp.* and levels of fumonisin B1 in maize western Kenya. *Appl Environ Microbiol* 65: 41-44
- Keller SE, Sullivan TM, Chirtel S (1997) Factors affecting the growth of *Fusarium proliferatum* and the production of fumonisin B1: oxygen and pH. *J Ind Microbiol Biotechnol* 19: 305-09.
- Kim H, Woloshuk CP (2008) Role of AREA, a regulator of nitrogen metabolism, during colonization of maize and fumonisin biosynthesis in *Fusarium verticillioides*. *Fungal Genet Biol* 45: 947-53.
- Kim H, Woloshuk CP (2011) Functional characterization of *fst1* in *Fusarium verticillioides* during colonization of maize kernels. *Mol Plant-Microbe Interact* 24: 18-24.
- Klarzynski O, Plesse B, Joubert JM, Yvin JC, Kopp M, Kloareg B, Fritig B (2000) Linear β -1,3-glucans are elicitors of defense responses in tobacco *Plant Physiol*. 124: 1027-1037.
- Koornneef A, Leon-Reyes A, Ritsema T, Verhage A, Den Otter FC, Van Loon LC, Pieterse CMJ (2008) Kinetics of salicylate mediated suppression of jasmonate signaling reveal a role for redox modulation. *Plant Physiol* 147: 1358-1368.
- Kuchitsu K, Yazaki Y, Sakano K, Shibuya N (1997) Transient cytoplasmic pH change and ion fluxes through the plasma membrane in suspension cultured rice cells triggered by N-acetylchitooligosaccharide elicitor *Plant Cell Physiol*. 38: 1012-1018.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lam E, Kato N, Lawton M (2001) Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response. *Nature* 411: 848-853.

- Lamprecht SC, Marasas WFO, Alberts JF, Cawood ME, Gelderblom WCA, Shephard GS, Thiel PG, Calitz FJ (1994) Phytotoxicity of fumonisins and TA-toxin to corn and tomato. *Phytopathology* 84: 383-91.
- Lanubile A, Pasini L, Marocco A (2010) Differential gene expression in kernels and silks of maize lines with contrasting levels of ear rot resistance after *Fusarium verticillioides* infection. *J Plant Physiol* 167: 1398-1406.
- Lawrence CB, Joosten MH, Tuzun S (1996) Differential induction of pathogenesis-related proteins in tomato by *Alternaria solani* and the association of a basic chitinase isozyme with resistance. *Physiol Mol Plant Pathol* 48: 361-377.
- Leon-Reyes A, Van der Does D, De Lange ES, Delker C, Wasternack C, Van Wees SCM, Ritsema T, Pieterse CMJ (2010) Salicylate-mediated suppression of jasmonate-responsive gene expression in Arabidopsis is targeted downstream of the jasmonate biosynthesis pathway. *Planta* 232: 1423-1432
- Leslie JF, Summerell BA (2006) *The Fusarium Laboratory Manual*. First Edition. Blackwell Publishing. USA.
- Leubner-Metzger G, Fruëndt C, Vögeli-Lange R, Meins F (1995) Class I β -1,3-glucanase in the endosperm of tobacco during germination. *Plant Physiol* 109: 751-759.
- Leubner-Metzger G. y Meins F. (1999) Functions and regulation of plant β -1,3-glucanases (PR-2). pp. 49-76 in Datta, S.K.; Muthukrishnan, S. (Eds) *Pathogenesis-related proteins in plants*. Boca Raton, Florida, CRC Press.
- Leubner-Metzger G (2003). Functions and regulation of β -1,3-glucanases during seed germination, dormancy release and after-ripening. *Seed Sci Res* 13: 17-34.
- Liang H, Yao N, Song JT, Luo S, Lu H, Greenberg JT (2003) Ceramides modulate programmed cell death in plants. *Genes Dev* 17: 2636-2641.
- Lieberherr D, Thao NP, Nakashima A, Umemura K, Kawasaki T, Shimamoto K (2005) A sphingolipid elicitor-inducible mitogen-activated protein kinase is regulated by the small GTPase OsRac1 and heterotrimeric G-protein in rice. *Plant Physiol* 138: 1644-52.
- Liu J, Elmore JM, Fuglsang AT, Palmgren MG, Staskawicz BJ, Coaker G. (2009) RIN4 functions with plasma membrane H⁺-ATPases to regulate stomatal apertures during pathogen attack. *PLOS Biology* 7: 1-16.
- Loake G, Grant M (2007) Salicylic acid in plant defence the players and protagonists. *Curr Opin Plant Biol* 10: 466-472.
- Markham JE, Li J, Cahoon E, Jaworski JG (2006) Separation and identification of major plant sphingolipid classes from leaves. *J Biol Chem* 281: 22684-22694.
- Marasas WF (2001) Discovery and occurrence of the fumonisins: a historical perspective. *Environ Health Perspect* 109:239-43.
- Marasas WF, Riley RT, Hendricks KA, Stevens VL, Sadler TW, Gelineau-van Waes J, Missmer SA, Cabrera J, Torres O, Gelderblom WC, Allegood J, Martínez C, Maddox J, Miller JD, Starr L, Sullards MC, Roman AV, Voss KA, Wang E, Merrill AH (2004) Fumonisins disrupt sphingolipid metabolism, folate transport, and neural tube development in embryo culture and in vivo: a potential risk factor for human neural tube defects among populations consuming fumonisin-contaminated maize. *J Nutr* 134: 711-6.
- Marín SV, Sanchis Vinas I, Canela R, Magan N (1995) Effect on water activity and temperature on growth and fumonisin B1 and B2 production by *Fusarium proliferatum* and *F. moniliforme* in grain. *Lett Appl Microbiol* 21: 298-301.
- Marín S, Magan N, Bell N, Ramos AJ, Canela R, Sanchis V (1999) Two-dimensional profiles of fumonisin B1 production by *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* in relation to environmental factors and potential for modelling toxin formation in maize grain. *Int J Food Microbiol* 51: 159-67.
- Mauch F, Mauch-Mani B, Boller (1988) Antifungal Hydrolases in pea tissue *Plant Physiol*. 88: 936-942.
- Misas-Villamil J, van der Hoorn R (2008) Enzyme-inhibitor interactions at the plant-pathogen interface. *Curr Opin Plant Biol* 11: 380-388.
- Molodchenkova OO, Adamovskaya VG, Levitskii YA, Gontarenko OV, Sokolov VM (2002) Maize response to salicylic acid and *Fusarium moniliforme*. *Appl Biochem Microbiol* 38: 381-385.
- Mongrand S, Morel J, Laroche J, Claverol S, Carde JP, Hartmann MA, Bonneau M, Simon-Plas F, Lessire R, Bessoule JJ (2004) Lipid rafts in higher plant cells: purification and characterization of Triton X-100-insoluble microdomains from tobacco plasma membrane. *J Biol Chem* 279: 36277-36286.
- Montesinos E (2000) Pathogenic plant-microbe interactions. What we know and how we benefit. *Internatl Microbiol* 3: 69-70.

- Munkvold GP, McGee DC, Cariton WM (1997) Importance of different pathways for maize kernel infection by *Fusarium moniliforme*. *Phytopathology* 87: 209-217.
- Murata T, Amarume S, Hattori T, Tokuyama S, Tokuyasu K, Kawagishi H, Usui T (2005) Purification and characterization of a chitinase from *Amycolatopsis orientalis* with N-acetyllactosamine-repeating unit releasing activity. *Biochem Biophys Res Comm* 336: 514-520.
- Murillo I, Cavallarin L, San Segundo B (1997) The maize pathogenesis-related PRms protein localizes to plasmodesmata in maize radicles. *Plant Cell* 9: 145-156.
- Murillo I, Cavallarin L, San Segundo B (1999) Cytology of infection of maize seedlings by *Fusarium verticillioides* and immunolocalization of the pathogenesis-related PRms protein. *Phytopathol* 89: 737-747.
- Murillo I, Jaek E, Cordero MJ, San Segundo B (2001) Transcriptional activation of a maize calcium-dependent protein kinase gene in response to fungal elicitors and infection. *Plant Mol Biol* 45:145-158.
- Myung K, Li S, Butchko RAE, Busman M, Proctor RH, Abbas HK, Calvo AM (2009) FvVE1 regulates biosynthesis of the mycotoxins fumonisins and fusarins in *Fusarium verticillioides*. *J Agric Food Chem* 57: 5087-94.
- Nascimento V, Campos F, Cortez A, Baggio D, Palma A, Hiroko R, Correa B. 2006. Characterization and genetic variability of *Fusarium verticillioides* strains isolated from corn and sorghum in Brazil based on fumonisins production, microsatellites, mating type locus, and mating crosses. *Can J Microbiol* 52: 798-804.
- Naumann TA, Wicklow DT, Kendra DF (2010) Maize seed chitinase is modified by a protein secreted by *Bipolaris zeicola*. *Physiol Mol Plant Pathol* 74: 134-141.
- Nelson PE (1992). Taxonomy and biology of *Fusarium moniliforme*. *Mycopathologia* 117:29-36
- Ng CY, Carr K, McAinsh MR, Powell B, Hetherington AM (2001) Drought-induced guard cell signal transduction involves sphingosine-1-phosphate. *Nature* 410: 596-599.
- O'Connell E, Piggott C, Tuohy M (2011) Purification of exo-1,3-beta-glucanase, a new extracellular glucanolytic enzyme from *Talaromyces emersonii*. *Appl Microbiol Biotechnol* 89: 685-696.
- Pan SQ, Ye XS, Kuc J (1989) Direct detection of β -1,3-glucanase isozymes on polyacrylamide. *Anal Biochem* 182: 136-140.
- Parker JE (2003) Plant recognition of microbial patterns. *Trends Plant Sci* 8: 245-247.
- Peer M, Stegmann M, Mueller MJ, Waller F (2010) *Pseudomonas syringae* infection triggers *de novo* synthesis of phytosphingosine from sphinganine in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett* 584: 4053-4056.
- Picot A, Barreau C, Pinson-Gadais L, Caron D, Lannou C, Richard-Forget F (2010) Factors of the *Fusarium verticillioides*-maize environment modulating fumonisin production. *Crit Rev Microbiol* 36:221-31.
- Pieterse CM, Leon-Reyes A, Van der Ent A, Van Wees SCM (2009) Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nature Chem Biol* 5: 308-316.
- Pontón J (2008) La pared celular de los hongos y el mecanismo de acción de la anidulafungina. *Rev Iberoam Micol* 25: 7-82.
- Postel S, Kemmerling B (2009) Plant systems for recognition of pathogen-associated molecular patterns. *Seminars in Cell and Develop Biol* 20:1025-1031.
- Proctor RH, Desjardins AE, Plattner RD, Hohn TM (1999) A poliketide synthase gene required for biosynthesis of fumonisin mycotoxins in *Gibberella fujikuroi* mating population A. *Fungal Genet Biol* 27:100-112.
- Proctor RH, Brown DW, Plattner RD, Desjardins AE (2003) Co-expression of 15 contiguous genes delineates a fumonisin biosynthetic gene cluster in *Gibberella moniliformis*. *Fungal Genet Biol* 38: 237-249.
- Proctor RH, Plattner RD, Desjardins AE, Busaman M, Butchko R (2006) Fumonisin production in the maize pathogen *Fusarium verticillioides*: genetic basis of naturally occurring chemical variation. *J Agric Food Chem* 54: 2424-2430.
- Punja ZK, Zhang Y (1993) Plant chitinases and their roles in resistance to fungal diseases. *J Nematol* 25: 526-540.
- Rabie CJ, Marasas WFO, Thiel PG, Lübben A, Vlegaar R (1982) Moniliformin production and toxicity of different *Fusarium* species from Southern Africa. *Appl Environ Microbiol* 43: 517-21.
- Reese ET, Parrish FW (1971) Nojirimycin and d-glucono-1,5-lactone as inhibitors of carbohydrases. *Carbohydr Res* 18: 381-388.
- Rheeder JP, Marasas WFO, Vismar HF (2002) Production of fumonisin analogs by *Fusarium* species. *Appl Environ Microbiol* 68: 2101-05.
- Rivas SanVicente M (2004) Asociación del metabolismo de esfingolípidos con la acumulación de ácido

- salicílico en tejidos vegetales. Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas. Fac. de Química, UNAM 99 pp.
- Rose JKC, Ham KS, Darvill AG, Albersheim P (2002) Molecular cloning and characterization of glucanase inhibitor proteins: coevolution of a counterdefense mechanism by plant pathogens. *Plant Cell* 14: 1329-1345.
- SanJuan-Badillo A, Palacios-Bahena, S., Gavilanes-Ruiz, M. Plasencia J. 2004. *Limitantes en el establecimiento de hijuelos de Agave tequilana Weber; Análisis molecular de patógenos que causan marchitez y desarrollo de una prueba diagnóstica*. Informe Final entregado a la empresa Allied-Domecq. Convenio UNAM-Domecq. 173 pp.
- Sagaram US, Butchko RAE, Shim WB (2006) The putative monomeric G-protein GBP1 is negatively associated with fumonisin B1 production in *Fusarium verticillioides*. *Mol Plant Pathol* 7: 381-389.
- Sagaram US, Shaw BD, Shim WB (2007) *Fusarium verticillioides* GAP1, a gene encoding a putative glycolipid-anchored surface protein participates in conidiation and cell wall structure but not virulence. *Microbiology* 153:2850-2861.
- Sahai AS, Manocha MS (1993) Chitinases of fungi and plants: their in morphogenesis and host-parasite involvement interaction. *FEMS Microbiol Rev.* 11: 317-338.
- Samac DA, Hironaka CM, Yallaly PE, Shah DM (1999) Isolation and characterisation of the genes encoding basic and acidic chitinase in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* 93: 907-914.
- Samapundo S, Devlieghere F, De Meulenaer B, Debevere J (2005) Effect of water activity and temperature on growth and the relationship between fumonisin production and the radial growth of *Fusarium verticillioides* and *Fusarium proliferatum* on corn. *J Food Prot* 68: 1054-1059.
- Sánchez-Rangel D, SanJuan-Badillo A, Plasencia J (2005) Fumonisin production by *Fusarium verticillioides* strains isolated from maize in México and development of a polymerase chain reaction to detect potential toxigenic strains in grains. *J Agric Food Chem* 53: 8565-8571.
- Sánchez-Rangel D, Plasencia J (2010) The role of sphinganine analog mycotoxins on the virulence of plant pathogenic fungi. *Toxin Rev* 29: 73-86.
- Saucedo-García M, Guevara-García A, González-Solís A, Cruz-García F, Vázquez-Santana S, Markham JE, Lozano-Rosas MG, Dietrich CR, Ramos-Vega M, Cahoon EB, Gavilanes-Ruiz M (2011) MPK6, sphinganine and the LCB2a gene from serine palmitoyltransferase are required in the signaling pathway that mediates cell death induced by long chain bases in *Arabidopsis*. *New Phytologist* 191: 943-957.
- Schaller A, Oecking C (1999) Modulation of plasma membrane H⁺-ATPase activity differentially activates wound and pathogen defense responses in tomato plants. *Plant Cell* 11: 263-272.
- Sela-Buurlage M, Ponstein A, Bres-Vloemans S, Melchers L, van den Elzen P, Cornelissen B (1993) Only specific tobacco (*Nicotiana tabacum*) chitinases and β -1,3-glucanases exhibit antifungal activity. *Plant Physiol* 101: 857-863.
- Seo JA, Proctor RH, Plattner RD (2001) Characterization of four clustered and coregulated genes associated with fumonisin biosynthesis in *Fusarium verticillioides*. *Fungal Genet Biol* 34: 155-65.
- Shah J. (2005) Lipids, lipases, and lipid-modifying enzymes in plant disease resistance. *Annu. Rev. Phytopathol* 43: 1-32.
- Shi L, Bielawski J, Mu J, Dong H, Teng C, Zhang J, Yang X, Tomishige N, Hanada K, Hannun YA, Zuo J (2007) Involvement of sphingoid bases in mediating reactive oxygen intermediate production and programmed cell death in *Arabidopsis*. *Cell Res* 17: 1030-1040.
- Shim WB, Woloshuk CP (1999) Nitrogen repression of fumonisin B1 biosynthesis in *Gibberella fujikuroi*. *FEMS Microbiol Lett* 177: 109-116.
- Shim WB, Woloshuk CP (2001) Regulation of fumonisin B1 biosynthesis and conidiation in *Fusarium verticillioides* by a cyclin-like (C-type) gene, FCC1. *Appl Environ Microbiol* 67: 1607-12.
- Somssich IE, Hahlbrock K (1998) Pathogen defence in plant. A paradigm of biological complexity. *Trends Plant Sci* 3: 86-90.
- Sperling P, Franke S, Luthje S and Heinz E (2005) Are glucocerebrosides the predominant sphingolipids in plant plasma membranes?. *Plant Physiol Biochem* 43: 1031-1038.
- Spoel SH, Koornneef A, Claessens SMC, Korzelius JP, Van Pelt JA, Mueller MJ, Buchala AJ, Métraux JP, Brown R, Kazan K, Van Loon LC, Dong X, Pieterse CMJ (2003) NPR1 modulates crosstalk between salicylate-and jasmonate-dependent defense pathways through a novel function in the cytosol. *Plant Cell* 15: 760-770.
- Stahl EA, Bishop JG (2000) Plant-pathogen arms race at the molecular level. *Curr Opin Plant Biol* 3: 299-304.
- Steiner B, Omelková J, Proksa B, Sasinková V, Koós M (1993) Aliphatic 1,2-alkanolamines inhibitors of β -glucanase from *Candida utilis*. *Folia Microbiol* 38: 392-394.

- Stergiopoulos I, Zwiers LH, De Waard MA (2002) Secretion of natural and synthetic toxic compounds from filamentous fungi by membrane transporters of the ATP-binding cassette and major facilitator superfamily. *Europ J Plant Pathol* 108: 719–734.
- Stenzel I, Hause B, Miersch O, Kurz T, Maucher H, Weicher H, Ziegler J, Feussner I, Wastemack C (2003) Jasmonate biosynthesis and the allene oxide cyclase family of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* 51: 895–911.
- Sticher L, Hinz U, Meyer AD, Meins F (1992) Intracellular transport and processing of a tobacco vacuolar β -1,3-glucanase. *Planta* 188: 559–565.
- Stone JM, Heard JE, Asai T, Ausubel FM (2000) Simulation of fungal-mediated cell death by fumonisin B1 and selection of fumonisin B1-resistant (*fbr*) *Arabidopsis* mutants. *Plant Cell* 12: 1811–1822.
- Suharsono U, Fujisawa Y, Kawasaki T, Iwasaki Y, Satoh H, Shimamoto K (2002) The heterotrimeric G protein subunit acts upstream of the small GTPase Rac in disease resistance of rice. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 13307–12.
- Sydenham EW, Shepard GS, Thiel PG (1992) Liquid chromatographic determination of fumonisin B1, B2 and B3 in foods and feeds. *JAOAC Int* 75: 313–316.
- Takahashi Y, Berberich T, Kanzaki H, Matsumura H, Saitoh H, Kusano T, Terauchi R. (2009) Serine palmitoyltransferase, the first step enzyme on sphingolipid biosynthesis, is involved in non-host resistance. *Mol Plant-Microbe Int* 22: 31–38.
- Takakuwa N, Saito K, Ohnishi M, Oda Y (2005) Determination of glucosylceramide contents in crop tissues and by-products from their processing. *Bioresource Tech* 96: 1089–1092
- Tamura K, Mitsunashi N, Hara-Nishimura I, Imai H (2001) Characterization of an *Arabidopsis* cDNA encoding a subunit of serine palmitoyltransferase, the initial enzyme in sphingolipid biosynthesis. *Plant Cell Physiol* 42: 1274–1281.
- Theis T, Stahl U (2004) Antifungal proteins: targets, mechanisms and prospective applications. *Cell Mol. Life Sci* 61: 437–455.
- Thomma BPHJ, Eggermont K, Penninckx IAMA, Mauch-Mani B, Vogelsang R, Cammue BPA, Broekaert WF (1998) Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defence-response pathways in *Arabidopsis* are essential for resistance to distinct microbial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci* 95 : 15107–15111.
- Thomma BPHJ, Nürnberger T, Joosten MHAJ (2011) Of PAMPs and effectors: the blurred PTI-ETI dichotomy. *Plant Cell* 23: 4–15.
- Tian M, Huitema E, da Cunha L, Torto-Alalibo T, Kamoun S (2004) A Kazal-like extracellular serine protease inhibitor from *Phytophthora infestans* targets the tomato pathogenesis related protease P69B. *J Biol Chem* 279: 26370–26377.
- Tian M, Benedetti B, Kamoun S (2005) A second Kazal-like protease inhibitor from *Phytophthora infestans* inhibits and interacts with the apoplastic pathogenesis-related protease P69B of tomato. *Plant Physiol* 138:1785–1793.
- Tian M, Win J, Song J, van der Hoorn R, van der Knaap E, Kamoun S (2007) A *Phytophthora infestans* cystatin-like protein targets a novel tomato papain-like apoplastic protease. *Plant Physiol* 143:364–377.
- Townley HE, McDonald K, Jenkins GI, Knight MR, Leaver, CJ (2005) Ceramides induce programmed cell death in *Arabidopsis* cells in a calcium-dependent manner. *Biol Chem* 386: 161–166.
- Umemura, K; Ogawa, N; Yamauchi, T; Iwata, M; Shimura, M; y Koga, J. 2000. Cerebroside elicitors found in diverse phytopathogens activate defense responses in rice plants. *Plant Cell Physiol*, 41: 676–683.
- Van Asch MAJ, Rijkenberg FHJ, Coutinho TA (1992). Phytotoxicity of fumonisin B1, moniliformin and T-2 toxin to corn cultures. *Phytopathology* 82: 1330–1332.
- Vander P, Varum KM, Domard A, Gueddari NE, Moerschbacher BM (1998) Comparison the ability of partially N-acetylated chitosans and chitoooligosaccharides to elicit resistance reaction in wheat leaves. *Plant Physiol* 118: 1353–1359.
- van der Holst PPG, Schlaman HRM, Spaik HP (2001) Proteins involved in the production and perception of oligosaccharides in relation to plant and animal development *Curr Opin Struc Biol.* 11: 608–616.
- Van Hove F, Waalwijk C, Logrieco A, Munaut F, Moretti A (2011) *Gibberella musae* (*Fusarium musae*) sp. nov; a recently discovered species from banana is sister to *F. verticillioides*. *Mycologia* 103: 570–585
- van Loon LC, Rep M, Pieterse CM (2006) Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu. Rev. Phytopathol* 44:135–162.
- Vera-Estrella R, Barkla BJ, Higgins VJ, Blumwald E (1994) Plant defense response to fungal pathogens. Activation of host-plasma membrane H⁺-ATPase by elicitor-induced enzyme

- desphosphorylation. *Plant Physiol* 104: 209-215.
- Wang E, Norred WP, Bacon CW, Riley RT, Merrill AH (1991) Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins. *J Biol Chem* 266: 14486-14490.
- Wang W, Yang X, Tangchaiburana S, Ndeh R, Markham JE, Tsegaye Y, Dunn TM, Wang GL, Bellizzi M, Parsons JF, Morrissey D, Bravo JE, Lynch DV, Xiao S (2008) An inositolphosphorylceramide synthase is involved in regulation of plant programmed cell death associated with defense in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 20: 3163-3179.
- Ward ER, Uknes SJ, Williams SC, Dincher SS, Wiederhold DL (1991) Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. *Plant Cell* 3:1085-1094.
- Williams LD, Glenn AE, Bacon CW, Smith MA, Riley RT (2006) Fumonisin production and bioavailability to maize seedlings grown from seeds inoculated with *Fusarium verticillioides* and grown in natural soils. *J Agric Food Chem* 54: 5694-5700.
- Williams LD, Glenn AE, Zimeri AM, Bacon CW, Smith MA, Riley RT (2007) Fumonisin disruption of ceramide biosynthesis in maize roots and the effects on plant development and *Fusarium verticillioides*-induced seedling disease. *J Agric Food Chem* 55: 2937-2946.
- Windels CE, Burnes PM, Kommedahl T (1988) Five-years preservation of *Fusarium* species on silica gel and soil. *Phytopathology* 78: 107-109.
- Wolpert TJ, Dunkle LD, Ciuffetti LM (2002) Host-selective toxins and avirulence determinants: what's in a name?. *Annu Rev Phytopathol* 40: 251-285.
- Wu CT, Leubner-Metzger G, Meins F, Bradford KJ (2000) Class I β -1,3-glucanase and chitinase are expressed in the micropylar endosperm of tomato seeds prior to radicle emergence. *Plant Physiol* 126:1299-1313.
- Yamada A, Shibuya N, Kodama O, Atasuka T (1993) Induction of phytoalexin formation in suspension-cultured rice cells by N acetylchitooligosaccharides. *Biosci Biotechnol Biochem* 57:405-409.
- Yamaguchi T, Yamada A, Hong N, Ogawa T, Ishii T, Shibuya N (2000) Differences in the recognition of glucan elicitor signals between rice and soybean: β -glucan fragments from the rice blast disease fungus *Pyricularia oryzae* that elicit phytoalexin biosynthesis in suspension-cultured rice cells. *Plant Cell* 12:817-826.
- Yeh S, Moffat BA, Griffith M, Xiong F, Yang DSC, Wiseman SB, Sarhan F, Danyluk J, Xue YQ, Hew CL, Doherty-Kirby A., Lajoie G (2000) Chitinase genes responsive to cold encode antifreeze proteins in winter cereals *Plant Physiol*. 124: 1251-1263.
- York WS, Qin Q; Rose J (2004) Proteinaceous inhibitors of endo- β -glucanases. *Biochim Biophys Acta* 1696: 223-233.
- Zhang B, Ramonell K, Somerville S, Stacey G (2002) Characterization of early, chitin-induced gene expression in *Arabidopsis*. *Mol Plant-Microbe Interact* 15: 963-970.
- Zitomer NC, Jones S, Bacon C, Glenn AE, Baldwin T, Riley RT (2010) Translocation of sphingoid bases and their 1-phosphates, but not fumonisins, from roots to aerial tissues of maize seedlings watered with fumonisins. *J Agric Food Chem* 58: 7476-7481.

Páginas web consultadas

Centro Internacional de Mejoramiento de Maiz y Trigo (CIMMYT)
<http://www.cimmyt.org/>

Food and Agricultural Organization
<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>

X. ANEXOS

A. Artículo

Sánchez-Rangel D, Sánchez-Nieto S, Plasencia J (2012) Fumonisin B1, a toxin produced by *Fusarium verticillioides*, modulates maize β -1,3glucanase activities involved in defense response. *Planta* no. DOI 10.1007/s00425-011-1555-0.

Fumonisin B1, a toxin produced by *Fusarium verticillioides*, modulates maize β -1,3-glucanase activities involved in defense response

Diana Sánchez-Rangel · Sobeida Sánchez-Nieto ·
Javier Plasencia

Received: 29 September 2011 / Accepted: 13 November 2011
© Springer-Verlag 2011

Abstract *Fusarium verticillioides* is an important pathogen in maize that causes various diseases affecting all stages of plant development worldwide. The fungal pathogen could be seed borne or survive in soil and penetrate the germinating seed. Most *F. verticillioides* strains produce fumonisins, which are of concern because of their toxicity to animals and possibly humans, and because they enhance virulence against seedlings of some maize genotypes. In this work, we studied the action of fumonisin B1 (FB1) on the activity of maize β -1,3-glucanases involved in plant defense response. In maize embryos, FB1 induced an acidic isoform while suppressing the activity of two basic isoforms. This acidic isoform was induced also with 2,6-dichloroisonicotinic acid, an analog of salicylic acid. Repression of the basic isoforms suggested a direct interaction of the enzymes with the mycotoxin as in vitro experiments showed that pure FB1 inhibited the basic β -1,3-glucanases with an IC_{50} of 53 μ M. When germinating maize embryos were inoculated with *F. verticillioides* the same dual effect on β -1,3-glucanase activities that we observed with the pure toxin was reproduced. Similar levels of FB1 were recovered at 24 h germination in maize tissue when they were treated with pure FB1 or inoculated with an FB1-producing strain. These results suggest that β -1,3-glucanases are a relevant physiological target and

their modulation by FB1 might contribute to *F. verticillioides* colonization.

Keywords Fumonisin B1 · *Fusarium verticillioides* · β -1,3-Glucanase · Chitinase · Maize · Sphinganine analog mycotoxin

Abbreviations

FB1	Fumonisin B1
GIP1	Glucanase inhibitor protein-1
hpi	Hours postinoculation
INA	2,6-Dichloroisonicotinic acid
LCB	Long chain base
MeJA	Methyl jasmonate
PDA	Potato dextrose agar
PS	Phytosphingosine
SA	Salicylic acid
SAM	Sphinganine analog mycotoxin
SN	Sphinganine
PR	Pathogenesis related

Introduction

Fusarium verticillioides is the most prevalent ascomycetous fungus isolated from maize (*Zea mays* L.) tissues where it can survive as an endophyte causing no visible symptoms, or as a necrotrophic pathogen causing various diseases such as seedling blight, root, stem, and ear rot. Seed-borne infection facilitates fungal access to a new plant during seed germination because the fungus is capable of moving systemically from infected seeds to upper parts through passage to the seedling, moving within the stalk to reach the ear (Kedera et al. 1994; Munkvold

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00425-011-1555-0) contains supplementary material, which is available to authorized users.

D. Sánchez-Rangel · S. Sánchez-Nieto · J. Plasencia (✉)
Departamento de Bioquímica, Facultad de Química,
Universidad Nacional Autónoma de México,
04510 Mexico, D.F., Mexico
e-mail: javierp@unam.mx

et al. 1997). Silk infection is the dominant pathway resulting in kernel infection (Munkvold et al. 1997) and even in absence of wounds, the fungal conidia deposited on the silk might reach the pericarp cells by penetrating through the bottom of the stylar canal (Duncan and Howard 2010).

Moreover, fungal propagules surviving in soil produce lytic enzymes and toxins that facilitate the infection process. Among the toxins produced by *F. verticillioides*, fumonisins might be physiologically relevant for infection because they are produced by most *F. verticillioides* isolates (Desjardins et al. 1995; Sánchez-Rangel et al. 2005) and they show phytotoxic activity (van Asch et al. 1992; Doehlert et al. 1994; Williams et al. 2007). FB1 is the major fumonisin found in naturally infected maize tissue, as it constitutes over 75% of total fumonisins (Marín et al. 1995; Proctor et al. 2006). FB1 production is highly variable among strains; some do not produce FB1 or synthesize it at very low levels (0.1 mg/g substrate), while other strains produce up to 4 mg/g substrate (Desjardins et al. 1994; Sánchez-Rangel et al. 2005).

FB1 is a sphinganine analog mycotoxin (SAM) and potent inhibitor of sphinganine *N*-acyl transferase causing the accumulation of long-chain sphingoid bases and complex sphingolipid depletion (Wang et al. 1991; Abbas et al. 1994; de la Torre-Hernandez et al. 2010). Besides disrupting sphingolipid metabolism FB1 also inhibits the maize plasma membrane H⁺-ATPase (Gutiérrez-Nájera et al. 2005). However, despite the discovery of these cellular targets, the role of FB1 production in fungal virulence has been controversial. Recent evidence demonstrates its role in pathogenesis and endophytic infection, while FB1-nonproducing strains of *F. verticillioides* can cause ear infection and rotting (Desjardins and Plattner 2000; Desjardins et al. 2007). More severe symptoms, such as stunting, necrotic leaf lesions and reduced root development are observed in maize seedlings inoculated with FB1-producing strains (Williams et al. 2007). Moreover, when a *Fusarium musae* strain isolated from banana (Van Hove et al. 2011), that is unable to colonize maize and does not produce fumonisin, is transformed with the entire FUM cluster responsible for the biosynthesis of FB1, it gains the ability to produce the toxin and to infect maize seedlings displaying full disease symptoms (Glenn et al. 2008).

Consistent with its mode of action as an SAM, FB1 application to maize seedlings causes root accumulation of sphingoid long-chain bases (LCBs) and their phosphorylated forms, and both are translocated to the aerial parts of the maize seedlings (Williams et al. 2007; Zitomer et al. 2010). LCB elevation is also observed by *F. verticillioides* infection, thus FB1 is produced in vivo, disrupting sphingolipid biosynthesis, which contributes to symptom severity by triggering downstream cellular responses. In addition, in maize, exogenous FB1 application induces a

dose-dependent SA accumulation and nuclease activation (de la Torre-Hernandez et al. 2010). Both responses are canonical components of the hypersensitive response (HR) in plants, a form of programmed cell death (Lam et al. 2001), suggesting that induction of cell death by SA could be a strategy used by *F. verticillioides* to successfully colonize plant tissues.

In response to pathogen attack, plant cells activate various defense pathways including production of antimicrobial compounds, generation of ROS, and secretion of hydrolytic enzymes. In germinating maize embryos inoculated with *F. verticillioides*, pathogenesis-related (PR) protein genes are strongly induced (Murillo et al. 1997; Campo et al. 2004). Among the many PR proteins, chitinases (PR2) and glucanases (PR3) are particularly relevant against fungal pathogens because chitinases cleave β -(1-4) glucosidic bonds in chitin (Kasprzewska 2003), whereas glucanases hydrolyze β -(1-3),(1-6) linked glucans in the pathogen cell wall (Hoj and Fincher 1995). The activity of both enzymes weakens the pathogen cell wall, and oligosaccharides with elicitor activity are released that further promote the host defense response (Rose et al. 2002). Some pathogens, in turn, have evolved to respond to this attack by producing inhibitors that suppress these enzymes. For example, *Phytophthora sojae* secretes a glucanase inhibitor protein-1 (GIP1), which targets specific soybean endo- β -1,3-glucanases (Rose et al. 2002). In addition, the maize pathogen, *Bipolaris zeicola*, modifies a specific type of chitinase found in maize seeds rendering an enzyme with low affinity for its substrate (Naumann et al. 2010).

In this context we were interested in determining whether FB1 is an effector on the activity of chitinases and β -1,3-glucanases that are key enzymes in the defense response against fungal pathogens, and to explore its potential role in *F. verticillioides* tissue infection. We found that, in germinating maize embryos, FB1 had a dual effect on β -1,3-glucanase activity as it induced the acidic isoform while repressing the basic glucanase isoforms. In vitro experiments demonstrated that FB1 inhibited β -1,3-glucanases basic isoforms and represents a new target for the mycotoxin. The potential role of FB1 production in *F. verticillioides* virulence is discussed.

Materials and methods

Plant material, fungal strain and chemicals employed

Maize embryos were manually dissected from dry seeds (landrace “Chalqueño”, México). Embryos were disinfected by immersion in a 0.5% sodium hypochlorite solution (vol/vol) for 2 min and were shaken vigorously, followed

by three washes with sterile water. The embryos were plated in Petri dishes containing 1% agar or agar supplemented with 20 μM FB1, 300 μM INA or 100 μM MeJA (methyl jasmonate). All biochemicals were obtained from Sigma Chemical Co (St. Louis, MO). MY3 strain was isolated previously from maize seeds and identified as FB1-producing strain (Sánchez-Rangel et al. 2005).

Maize embryos inoculation and conidia count

The strains were maintained in sterile soil at -20°C (Windels et al. 1988) and approximately 200 mg of this substrate was plated on potato dextrose agar $0.5\times$. Plates were incubated for 5–7 days at room temperature under fluorescent white light to promote sporulation. Fungal spores were collected by gently shaking the plate with 5 mL of sterile water at room temperature. The suspension was collected and transferred to 2 mL Eppendorf tubes, and centrifuged at 13,400 rpm for 15 min. The supernatant was decanted and the conidia were washed twice with sterile water. Total microconidia were counted under an optical microscope in a hemacytometer and a suspension containing 5×10^6 conidia/mL was prepared in sterile water. Each embryo was inoculated by placing 10 μL (50,000 conidia) of the spore suspension on the tissue surface. Plates were incubated at 29°C under fluorescent light and samples were taken at different times (hours postinoculation, hpi). To determine fungal colonization, each embryo was placed in an Eppendorf tube with 1 mL of distilled water and conidia were released by agitation for 1 h. Total conidia per embryo were counted in the suspension using the hemacytometer as described above.

Exochitinase and β -1,3-glucanase total activity assay

Soluble protein was extracted from germinating maize embryos at different time points. Twelve embryos per time point were pulverized with liquid nitrogen and homogenized in 2 mL of extraction buffer (0.05 M sodium acetate (pH 5.0) + 250 mM sucrose + 5 mM β -mercaptoethanol + 10 mM EDTA + 1% polyvinylpyrrolidone and a tablet of complete protease inhibitor cocktail (ROCHE)/50 mL buffer). The extract was centrifuged at 13,400 rpm for 30 min at 4°C in a MiniSpin Eppendorf centrifuge, the supernatant was removed, and total protein was determined using the Bradford colorimetric method (Bradford 1976) in the supernatant. Total exochitinase activity also referred as β -*N*-acetylglucosaminidase (EC 3.2.1.52) was determined according to the technique described by Murata et al. (2005) with minor modifications. Briefly, 20 μg total protein was incubated at 40°C for 15 min in 0.3 mL of 0.05 M sodium phosphate (pH 5.8) + 2.5 mM *p*-nitrophenyl *N*-acetyl- β -*D*-glucosaminide (Sigma) as a substrate. The reaction was stopped by adding

0.1 mL of 1 M Na_2CO_3 . The amount of liberated *p*-nitrophenol was determined by measuring the absorbance at 405 nm using a microplate reader and results are reported as ng *p*-nitrophenol/mg min. Total β -1,3-glucanase activity was analyzed according to the protocol reported by Haïssam and Lepoivre (1998) with slight modifications. Total protein (20 μg) was incubated at 40°C for 30 min in 0.25 mL of 0.05 M sodium acetate (pH 5.0) + 2.5 mg/mL laminarin (Sigma) as a substrate. At the end of the incubation period, 25 μL of the reaction mixture was taken and mixed with 200 μL of glucose assay reagent (Sigma). Released NADH^+ was determined at 340 nm using a microplate reader and the amount of glucose was estimated from a calibration curve. Results are reported as mg glucose $\text{mg}^{-1} \text{h}^{-1}$.

Electrophoretic separation of proteins

Native polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and sodium dodecyl sulfate (SDS)-PAGE were performed according to the method of Laemmli (1970), with a 4% (wt/vol) polyacrylamide stacking gel and a 12% (wt/vol) polyacrylamide separating gel. For native PAGE, SDS was excluded and loaded with 100–120 μg total protein, whereas the SDS-PAGE gel was loaded with 15 μg total protein. The gels for SDS-PAGE were stained with SimplyBlue Safe Stain (Invitrogen) in distilled water.

In-gel β -1,3-glucanase isoform activity assay

Following electrophoresis, the native gel was incubated with gentle shaking at 40°C for 1 h in 5 mL of 0.05 M sodium acetate (pH 5.0) + laminarin (2.5 mg/mL) as a substrate. The gel was washed with 0.05 M potassium phosphate (pH 7.0) for 5 min at room temperature and rinsed with distilled water for 5 min. Activity was revealed by adding 5 mL of glucose reagent and the gel was incubated at room temperature for 20 min with gentle shaking and addition of blue tetrazolium (NBT 0.25 mg/mL Bio-Rad). The gel was further incubated overnight at 50°C . β -1,3-glucanase activities were identified as purple bands.

Effect of FB1 on β -1,3-glucanase activity

To characterize the β -1,3-glucanase activities that were inhibited by FB1, native PAGE was performed as described above. The gel was first incubated for 20 min in the presence of FB1 (10–100 μM) in buffer (0.05 M sodium acetate, pH 5.0) at room temperature with gentle shaking. Negative controls contained buffer only. Gels were then incubated (30 min) in buffer with both laminarin (2.5 mg/mL) and the indicated dose of FB1.

Glucanase isoforms were partially purified from native gels by cutting the regions corresponding to the isoforms I, II, and III, and electro-eluted in native conditions in a Bio-Rad 422 Electro-Eluter and then concentrated to a final volume about 400 μ L with Amicon Ultra 10 K tubes (Millipore).

Native isoelectrofocusing

Proteins were separated by isoelectric focusing in gels containing 5% acrylamide/bisacrylamide and 2.4% ampholytes with a pH range 3–10. Anode and cathode solutions were 10 mM phosphoric acid and 20 mM NaOH, respectively. Total protein (350 μ g) was loaded onto the gel, subjected to 200 V for 90 min and 400 V for an additional 90 min. After focusing, the gel was assayed for β -1,3-glucanase activity as described above.

LCB analysis

Free LCBs from maize embryos germinating in the presence or absence of 20 μ M FB1 were extracted following the method described by Markham et al. (2006). Briefly, 10–15 maize embryos per time point were pulverized with liquid nitrogen and transferred to a Pyrex tube and resuspended in 5 ml of propanol:hexane:H₂O (55:20:25 v/v). One nmol of internal standard (C20 dihydrosphingosine) was added and the samples were incubated for 15 min at 60°C and then centrifuged for 15 min at 3,600 rpm in a GS-6R Beckman centrifuge. The extraction was repeated with 3 mL of the solvent mixture. The organic phase was evaporated and dried under nitrogen; afterwards, 1 mL of dioxane and 1 mL of 10% (w/v) barium hydroxide were added and incubated for 1 h at room temperature. After the incubation, 2 mL of 2% (w/v) ammonium sulfate was added followed by 2 mL of diethyl ether. Samples were shaken, vortexed, and centrifuged to separate the phases. The upper phase was transferred to a second tube and the extraction was repeated. The solvent was evaporated and the lipid extract was resuspended in 200 μ L of ethanol. LCBs were derivatized with 2.5 mM naphthalene-2,3-dialdehyde (NDA) reagent in 25 mM sodium tetraborate (pH 9.5) + 2.5 mM KCN. The tube containing the reaction mixture was heated at 65°C for 20 min. A Shimadzu LC-10ADVP delivery module coupled to a Shimadzu RF-10AXL fluorescence detector set at 419 nm excitation/493 nm emission wavelengths was employed, and LCBs were separated isocratically in a 15 cm \times 4.6 mm i.d., 5 μ m, SuperCosil LC-18 analytical C18 column with a flow rate of 1.2 mL/min using 94% acetonitrile as a mobile phase. LCBs were quantified based on the recovery of the internal standard. Results are reported as pmoles mg⁻¹ fresh weight.

FB1 extraction and analysis

Approximately 50 maize embryos (6.5 g) infected with *F. verticillioides* MY3 strain or uninfected were pulverized with liquid nitrogen and then transferred to a 50 mL Falcon tube containing 15 mL of acetonitrile–water (1:1; v/v). The tubes were kept at room temperature for 12 h and then placed in an orbit shaker at 200 rpm for 4 h, and centrifuged for 20 min at 3,600 rpm in a GS-6R Beckman centrifuge, to collect the supernatant. This extract was dried under stream of nitrogen and the residue resuspended in 200 μ L of acetonitrile–water (1:1; v/v) for HPLC analysis setting the fluorescence detector wavelengths at 335 nm excitation/440 nm emission. FB1 was derivatized with *o*-phthaldialdehyde (Sigma) (2 mg/ml) and 2-mercaptoethanol in 0.05 M borate buffer (pH 9.7), and separated isocratically in the C18 column described above with a flow rate of 1.2 mL/min using methanol-0.1 M NaH₂PO₄ (pH 3.0) (70:30 vol/vol) as a mobile phase Sydenham et al. (1992).

RNA extraction and RT-PCR amplification

Total RNA from *F. verticillioides*-infected and uninfected maize embryos per time point (18, 24, and 30 hpi) was extracted using the Trizol reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Reverse transcription was performed with 1 μ g of RNA using ImProm-II reverse transcriptase (Promega) and 1 μ L of 500 μ g/ μ L oligo dT (5'-TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTVN-3'). Specific oligonucleotides for the amplification of *FUM1* gene (accession number AF155773) were [FUM53F (5'-CTT GAACGCGGAGCTAGATTAT-3') and FUM53R (5'-AT CCGTGTATGCATATGTCGAG-3')] that amplifies a 354 bp fragment (Sánchez-Rangel et al. 2005) and used in this study. Tubulin gene was amplified as control using the primers 5'-TGCTCATTTC AAGATCCGCG-3' and 5'-GTAGTTGAGGTCACCGTAGGAGG-3' that amplifies a 233 bp fragment (Hu et al. 2009). *PAL* gene was amplified using the primers 5'-GAGGAGTGCAACAAGGTGTTTC-3' and 5'-CAGGGCACAGCTACACAAAA-3' that amplifies a 297 bp fragment. *PRm* gene was amplified using the primers 5'-AGAGAAGTACGCCGCACAGA-3' and 5'-GT AGTGGCCACACACCTTGC-3' that amplifies a 196 bp fragment. PCR amplification of the *FUM1*, *PAL*, *PRm* and *Tubulin* fragments was carried out in an Applied Biosystems GeneAmp System 9700 thermocycler (Applied Biosystems) programmed for one cycle of 3 min at 94°C, 30 cycles for *PAL*, 32 cycles for *FUM1*, 26 cycles for *PRm* or 25 cycles for *Tubulin* of 40 s at 94°C, 40 s at 56°C, 40 s at 72°C, and one cycle of 7 min at 72°C. Reactions were carried out as previously described. PCR products were resolved in a 2% agarose ethidium bromide gel in 40 mM

Tris acetate and 2 mM EDTA buffer. The 100 bp DNA ladder (Promega) was used as a molecular size marker.

Statistical analysis

Data were analyzed with the paired Student's *t* test to determine the statistical significance at $p = 0.05$. β -1,3-Glucanase activity gels presented are representative of at least three biological replicates.

Results

FB1 selectively modulates the activity of maize β -1,3-glucanases

The main objective of this study was to determine the role of FB1 as an effector of plant defense responses, particularly defense against fungal pathogens. In order to test this, we measured total exochitinase (β -*N*-acetylglucosaminidase) and β -1,3-glucanases activities in soluble protein

extracts from mock and toxin-treated embryos. First, we observed that when maize embryos were imbibed in presence of FB1, germination took place but a significant reduction in radicle elongation was observed (Fig. 1a). Then, we found that chitinase activity increased discretely during germination but FB1 did not induce its activation (Fig. 1b). In contrast, FB1 had a dual effect on total β -1,3-glucanase activity, while at early germination times a significant reduction was observed (50% at 18 h); a 30 and 40% increase in activity was detected at 24 and 30 h, respectively (Fig. 1c).

Given that multiple β -1,3-glucanase isoforms occur in plant tissues, we prepared activity gels in an attempt to explain the dual effect on this enzymatic activity observed at 18 and 24 h imbibition. Our analysis consistently showed that at least three major isoforms were active during germination, and therefore the three contributed to the total activity determined, but it was clear that the fast-migrating isoform (isoform I) was selectively induced by FB1, especially at 24 h. In contrast, the two slow-migrating isoforms (isoforms II and III) were repressed in embryos

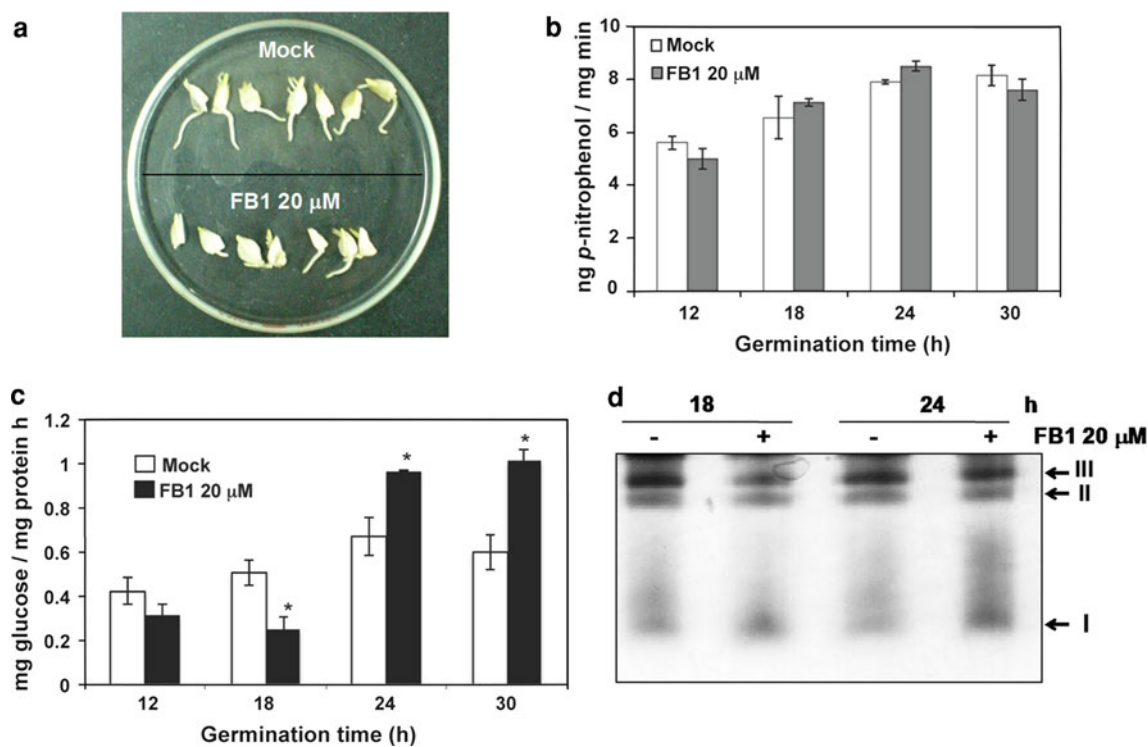


Fig. 1 FB1 effect on maize radicle elongation and on exochitinase (β -*N*-acetylglucosaminidase) and β -1,3-glucanase activities during germination. **a** Maize embryos were imbibed for 30 h in absence (upper panel) or presence of 20 μ M FB1 (lower panel). **b** Total exochitinase activity in germinating maize embryos imbibed in absence or presence of 20 μ M FB1 was determined using *p*-nitrophenyl *N*-acetyl- β -D-glucosaminide as substrate. Values are expressed as a means \pm SD, and means were compared using the paired Student's *t* test ($n = 3$; $p \leq 0.05$). **c** Total β -1,3-glucanase activity in

germinating maize embryos imbibed in absence or presence of 20 μ M FB1 was determined using laminarin as substrate. Values are expressed as a means \pm SD, and means were compared using the paired Student's *t* test ($n = 3$). An asterisk indicates a significant difference between the control and FB1-treated embryos at each time point ($p \leq 0.05$). **d** Isoform pattern of β -1,3-glucanase from maize embryos imbibed for 18 and 24 h in absence or presence of 20 μ M FB1 determined by native protein gel assays using laminarin as substrate (100 μ g total protein was loaded in each lane)

germinating in the presence of 20 μM FB1 (Fig. 1d). Such inhibition was particularly obvious at 18 h and might explain the pattern observed when total β -1,3-glucanase activity was determined (Fig. 1c).

Maize basic β -1,3-glucanases as novel FB1 targets

Due to the different mobility and activity patterns of the three major β -1,3-glucanase isoforms in maize embryos, we determined their pI by isoelectric focusing followed by activity assay. Under these conditions, high amounts of protein must be loaded (350 μg) into the gel, and despite this low sensitivity, we could detect an acidic isoform that was induced in embryos inoculated with *F. verticillioides* for 24 h (Fig. S1). On account of its expression pattern and mobility, this acidic glucanase might correspond to isoform I observed in native gels. A pI of about 5.3 was estimated for this band, whereas a pI between 8.5 and 9 was calculated for isoforms II and III.

Early repression of β -1,3-glucanase isoforms II and III by FB1 suggested that the toxin could directly interact with the enzymes. To test this hypothesis, we performed activity gels of protein extracts from control embryos (24 h germination) in the presence of increasing FB1 doses (10, 25, and 50 μM). As shown in Fig. 2a, intensity of the bands corresponding to the activities of basic isoforms decreased as toxin concentration increased. Densitometric analysis showed a significant reduction of about 25 and 35% in the activity of isoforms II and III, respectively, with 50 μM FB1. We were able to resolve isoform I from isoforms II and III in order to test them individually in the presence of increasing FB1 concentration using the quantitative spectrophotometric assay. While the basic isoforms (II and III) were sensitive to FB1 shown by a calculated IC_{50} of 53 μM , acidic isoform (I) was only partially inhibited and an IC_{50} of 180 μM was calculated (Fig. 2b). Because in the gel assay, FB1 must penetrate the matrix, higher concentrations were needed to observe enzyme inhibition and total suppression of basic isoforms was achieved by employing 100 μM FB1 and, as shown in Fig. 2c, acidic isoform I activity remained unchanged. Thus, the evidence shows that FB1 is able to directly inhibit the activity of basic β -1,3-glucanases in vitro, supporting the observation of glucanase repression obtained in vivo at early times.

Isoform I induction by FB1 is mediated by SA pathway through long-chain sphingoid bases accumulation

Because FB1 induces elevation of free SA levels through the accumulation of LCBs in maize seeds during germination (de la Torre-Hernandez et al. 2010), we evaluated if isoform I was a target of the SA-signaling pathway. First, FB1 activity as an SAM was determined in the maize

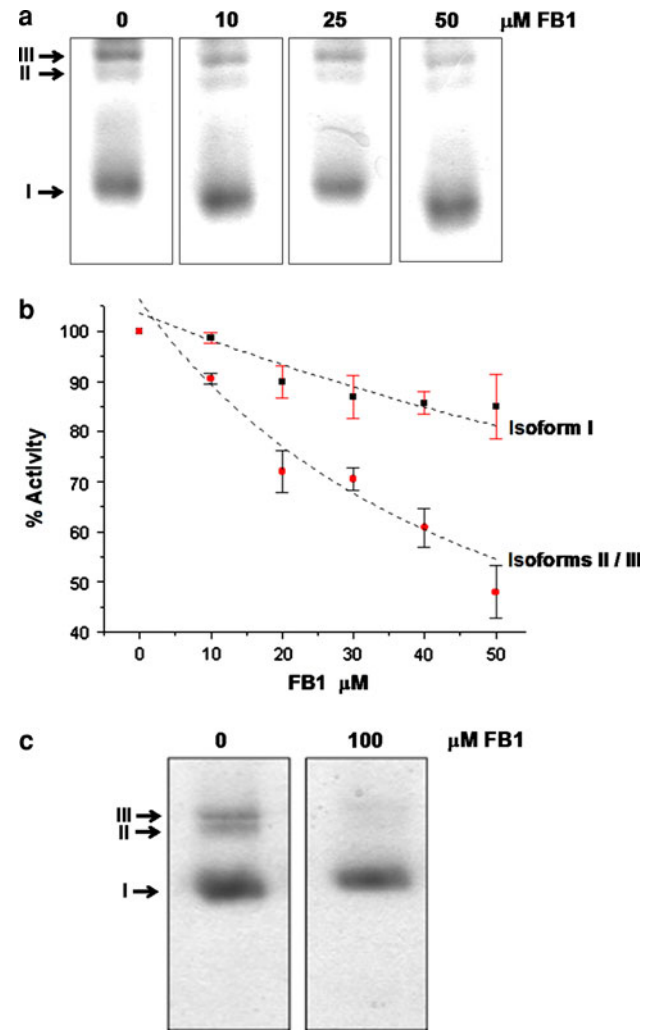


Fig. 2 In vitro effect of FB1 on maize basic β -1,3-glucanase isoforms II and III. **a** β -1,3-Glucanase activity determined in protein extracts from 24-h germinated embryos using the gel assay incubated with increasing FB1 doses (10, 25 or 50 μM) and laminarin as substrate (100 μg total protein was loaded in each lane). **b** β -1,3-Glucanase activity determined in purified protein fractions containing isoform I (filled square) and isoforms II and III (filled circle) in presence of increasing FB1 concentrations using laminarin as substrate. The released glucose was determined spectrophotometrically and percentage of maximum activity calculated from samples incubated without the toxin. **c** β -1,3-Glucanase activity determined in protein extracts from 24-h germinated embryos using the gel assay incubated with 100 μM FB1 (100 μg total protein was loaded in each lane)

embryos by analyzing LCB levels at various time points during germination. A significant increase in sphinganine levels was detected at 6 h and reached a maximum 15-fold accumulation at 24 h (167 ± 30 pmol/mg fresh tissue). Levels of phytosphingosine were also augmented significantly and reached a maximum fourfold accumulation at 15 h, and remained thereafter with subtle changes (Fig. 3a). The raise in sphinganine levels coincided

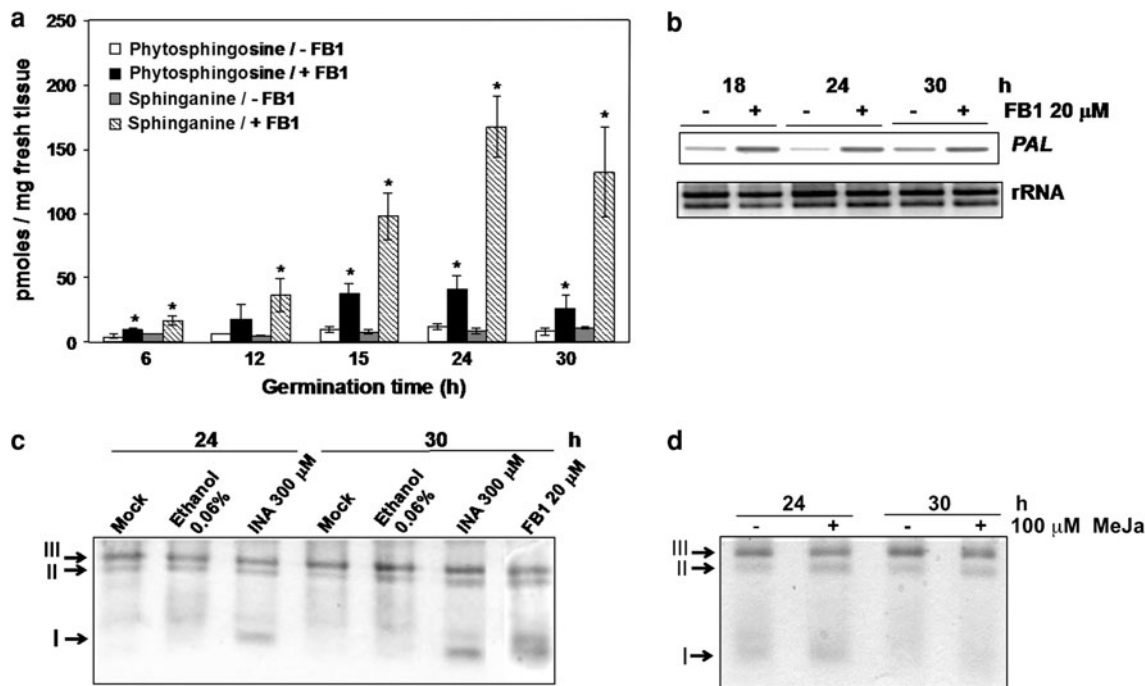


Fig. 3 β -1,3-Glucanase isoform I induction by FB1 is mediated by SA pathway through long-chain bases accumulation. **a** Levels of free long-chain bases sphinganine and phytosphingosine in maize embryos germinated in absence or presence of (20 μ M FB1). Values are expressed as a means \pm SD ($n = 3$). An asterisk indicates a significant difference between the control and FB1-treated embryos at each time point ($p < 0.05$, Student's t test). **b** *ZmPAL* transcripts levels determined by RT-PCR. Total RNA isolated from mock and FB1-imbibed embryos was reverse-transcribed and cDNAs amplified by PCR. 18S ribosomal RNA was used as loading control. **c** Isoform

pattern of β -1,3-glucanase from maize embryos imbibed for 24 and 30 h in absence or presence of 300 μ M INA, an SA analog, by native protein gel assays using laminarin as substrate (120 μ g total protein was loaded in each lane). A solvent control (0.06% ethanol) was included as control and induction was compared with 20 μ M FB1 at 30 h. **d** Isoform pattern of β -1,3-glucanase from maize embryos imbibed for 24 and 30 h in absence or presence of 100 μ M MeJA by native protein gel assays using laminarin as substrate (120 μ g total protein was loaded in each lane)

temporarily with the induction in transcript levels of maize phenylalanine ammonia lyase (PAL), the first enzyme in SA biosynthesis (Fig. 3b). Finally, to directly test if the SA is responsible for the induction of isoform I, maize embryos were germinated in the presence of 300 μ M (INA), an SA analog. Such treatment induced isoform I activity at 24 h, and this induction was maintained until 30 h (Fig. 3c). In contrast, treatment with 100 μ M MeJA did not cause any change in the activity of any isoform of β -1,3-glucanase (Fig. 3d).

F. verticillioides infection reproduces the dual activity pattern of β -1,3-glucanase isoforms in maize embryos

Once it was demonstrated that FB1 is able to modulate the activity of three different β -1,3-glucanase isoforms by two independent mechanisms and because FB1 is produced by *F. verticillioides*, we were interested in evaluating β -1,3-glucanase activity patterns in germinating maize embryos inoculated with the necrotroph. We employed the *F. verticillioides* MY3 strain that was isolated from maize seeds and characterized previously as a high FB1 producer

(Sánchez-Rangel et al. 2005). *F. verticillioides* colonized efficiently the maize embryos reaching above 6×10^6 conidia/embryo at 30 h post inoculation (Fig. 4a) and causing visible damage characterized by necrotic discoloration (Fig. 4b). In order to associate the effects observed by fungal infection with FB1 activity, we determined the mycotoxin levels, produced in vivo during the infection of maize embryos as well as *FUM1* transcript. *FUM1* gene transcript was detected at 18 hpi and levels increased steadily until 30 hpi (Fig. 5a). Gene expression correlated with FB1 production as the toxin was detected at 24 hpi (65.7 ± 11.6 ng/g fresh tissue) and at 30 hpi (209.1 ± 21.4 ng/g fresh tissue). Such FB1 levels in the embryos were comparable with those found in embryos germinated for 24 h in presence of the exogenously mycotoxin, as 41.7 ± 1 ng/g fresh weight was recorded under these conditions. These data represent a very efficient delivery of the toxin by the fungus and allowed us to estimate the amount of FB1 that penetrates the maize tissue which is necessary to trigger the phytotoxic, biochemical and molecular effects observed. Given that *F. verticillioides* produced FB1 during embryo infection, it will then most

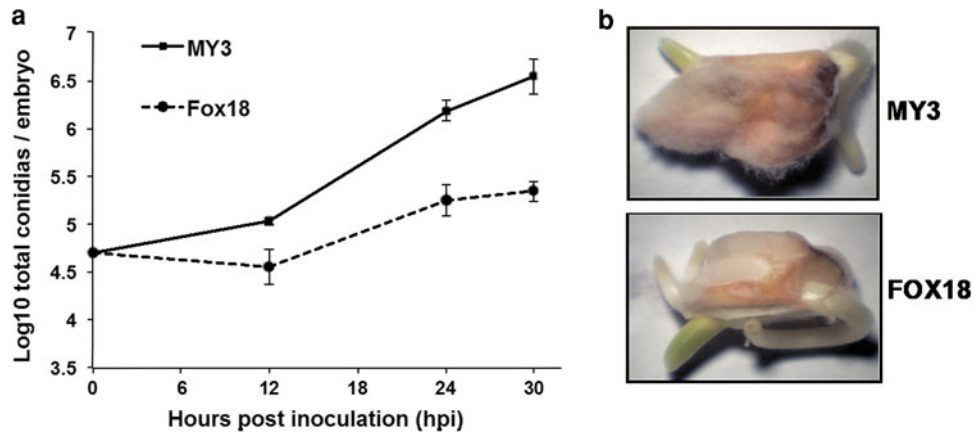


Fig. 4 *Fusarium verticillioides* efficiently colonizes maize embryos. **a** Growth of *F. verticillioides* and *F. oxysporum* in germinating maize embryos. 5×10^4 conidia were used to inoculate each embryo that were harvested at 12, 24 and 30 hpi. Conidia were released and

counted. The results shown are the mean \pm SD obtained from 30 embryos for each time point. **b** Maize embryos of 30-h germination inoculated with *F. verticillioides* or *F. oxysporum*

likely reproduce the same activity pattern of the three β -1,3-glucanase isoforms studied during FB1 treatment.

We demonstrate that maize embryos activate defense responses in the selected time period by analyzing PRms (pathogenesis-related maize seed) transcript levels. PRms belongs to the PR-1 group and is induced strongly in germinating maize seed upon *F. verticillioides* infection (Casacuberta et al. 1992). We found that in germinating maize embryos, the *PRm* transcript was strongly induced by fungal infection reaching a maximum around 24 hpi (Fig. 5b). Interestingly, FB1 treatment also induced elevation of *PRm* transcript levels in germinating maize embryos (Fig. S2). *ZmPAL* transcript levels peaked at 18–24 h of fungal infection (Fig. 5b), linking the SA pathway to the *F. verticillioides*–maize interaction.

When embryos were inoculated with *F. verticillioides*, a 40% increase in exochitinase activity was recorded at 24 hpi and a 200% raise observed at 30 hpi (Fig. 6a). This pattern contrasted with the one observed with FB1 that did not induce exochitinase activity during the time course tested (Fig. 1b). However, the pattern observed for β -1,3-glucanase activity isoforms was comparable with the one found for FB1 treatment. While it was clear that the isoform I was activated at 24 and 30 hpi, a decrease in the activity of the isoforms II and III of β -1,3-glucanase was observed (Fig. 6b).

Because inoculation with *F. verticillioides* reproduced the molecular effects observed in maize β -1,3-glucanase activities that we reported for purified FB1, to discard other PAMP effectors responsible of this effect, we inoculated maize embryos with *F. oxysporum*, a non-fumonisin-producing species that also infects maize, and analyzed β -1,3-glucanase activities and tissue colonization. *F. oxysporum* affected neither the basic nor the acidic β -1,3-glucanase

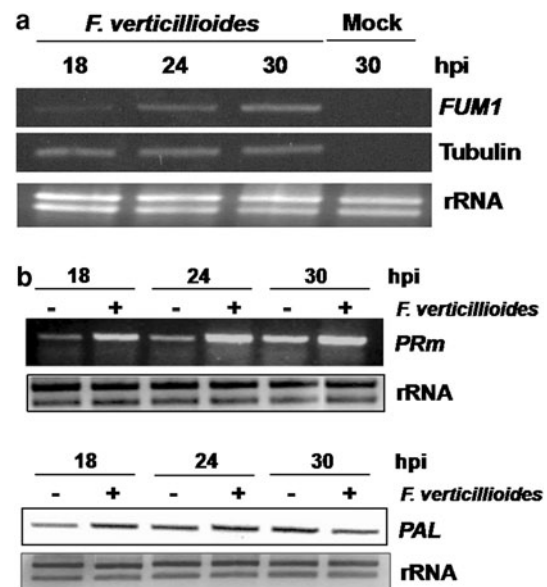


Fig. 5 Expression of *FvFUM1*, *ZmPRm* and *ZmPAL* transcripts at early times of infection. **a** *FvFUM1* transcript levels analyzed by RT-PCR during colonization of maize tissue. Total RNA isolated from inoculated and non-inoculated maize embryos was reverse-transcribed and the cDNA amplified by PCR. *FvTUB* was used as normalization control. **b** *ZmPRm* and *ZmPAL* transcripts levels determined by RT-PCR. Total RNA isolated from mock and *Fusarium*-inoculated embryos was reverse-transcribed and cDNAs amplified by PCR. 18S ribosomal RNA was used as loading control

isoforms (Fig. S3) and poorly colonized the embryo tissue reaching a tenfold lower conidia count at 30 hpi in comparison with *F. verticillioides*, and the embryos did not show any necrotic symptoms (Fig. 4a, b). Such difference is related to pathogenicity of both strains as an in vitro conidiation test in PDA, showed that both strains reached similar cell count levels after 24 h (Table 1S).

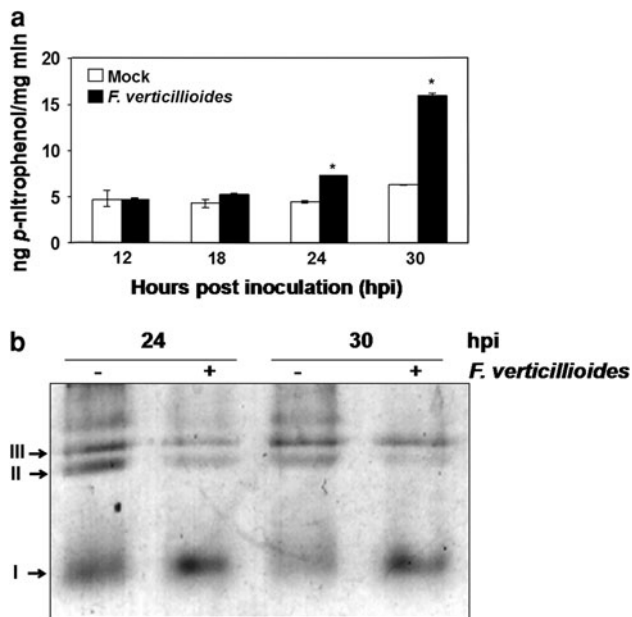


Fig. 6 Effect of *F. verticillioides* infection on maize exochitinase (β -*N*-acetylglucosaminidase) and β -1,3-glucanase activities. **a** Total exochitinase activity in germinating maize embryos inoculated with *F. verticillioides* was determined using *p*-nitrophenyl *N*-acetyl- β -D-glucosaminide as substrate. Values are expressed as a means \pm SD and means were compared using the paired Student's *t* test ($n = 3$). An asterisk indicates a significant difference between the control and infected embryos at each time point ($p \leq 0.05$). **b** Isoform pattern of β -1,3-glucanase in germinating maize embryos inoculated with *F. verticillioides* determined by native protein gel assays using laminarin as substrate (100 μ g total protein was loaded in each lane)

Discussion

Pathogenesis-related hydrolases in germinating maize embryos are differentially activated during FB1 treatment and *F. verticillioides* infection

Plant cells have evolved to recognize and target the cell wall of fungal pathogens through the synthesis and secretion of hydrolytic enzymes such as chitinases and β -1,3-glucanases (Cordero et al. 1994; Caruso et al. 1999). Their role in defense has been well established as they are induced upon infection, possess antifungal activity in vitro and, when overexpressed in transgenic plants, confer enhanced resistance to fungal pathogens (Sela-Buurlage et al. 1993; Seetharaman et al. 1997). Because chitin and β -1,3-glucan are synthesized simultaneously in the apex of growing hyphae during colonization of plant host tissue, it has been suggested that the efficient hydrolysis of the cell wall depends on the coordinated action of both enzymatic activities. Moreover, such activity releases cell-wall-derived materials that can act as elicitors of defense reactions (Hoj and Fincher 1995; Kasprzewska 2003; Ferreira et al. 2007). Both proteins are classified as pathogenesis-

related proteins, and have multiple isoforms that differ in size, isoelectric point, primary structure, cellular localization, and mode of regulation (Ferreira et al. 2007). Chitin is hydrolyzed by exochitinase that catalyzes the cleavage of terminal non-reducing β -*N*-acetylglucosamine residues from oligosaccharides and by endochitinases that perform a random hydrolysis of *N*-acetyl- β -D-glucosaminide 1,4- β -linkages. Because of the substrate employed, we detected the former in this work. Both, exochitinases and β -1,3-glucanases have an active role in defense against fungal pathogens (Collingel et al. 1993; Kasprzewska 2003; Ferreira et al. 2007), and are constitutively expressed in germinating seeds (Leubner-Metzger 2003); β -1,3-glucanases isolated from germinating cereal grains possess antifungal activity in vitro (Leah et al. 1991; Seetharaman et al. 1997).

Because of this prominent role in defense we studied the activation pattern of chitinases and β -1,3-glucanases in maize embryos germinating in presence of FB1 or of an FB1-producing strain of *F. verticillioides*. While FB1 treatment did not affect total chitinase activity it had a dual effect on β -1,3-glucanase activity isoforms.

FB1 down-regulated the basic isoforms II and III while inducing the acidic isoform I, and the same activation pattern was observed upon *F. verticillioides* infection. These results suggest that FB1 could be responsible for modulating β -1,3-glucanase isoforms activity. To discard the role of common PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) related to *Fusarium* spp., we evaluated whether *F. oxysporum* was able to induce β -1,3-glucanase activity. No such activation was observed thus supporting the role of FB1 as an effector to induce this type of response. However, we cannot rule out other PAMPs like oligochitins, glucans, peptides, or lipopolysaccharides restricted to *F. verticillioides* that can be tested by using an isogenic strain unable to produce FB1.

The complexity of multiple PR hydrolases genes in plants is reflected by the differential activation pattern that depends on the developmental stage and the type of infecting fungi. For example, in maize seedlings infected with *F. verticillioides*, a basic isoform (Mr, 33 kDa), detected by Western blot, is induced while other isoforms remain unchanged and three acidic chitinases are induced in the first day post-infection (Cordero et al. 1994). A selective induction, determined by the pathogen, has been suggested in maize kernels infected with *Aspergillus flavus*, because a 33 kDa β -1,3-glucanase is induced upon infection, but not the 30 kDa isoform, that in turn, is activated by *F. verticillioides* (Ji et al. 2000). It is clear that distinct β -1,3-glucanase isoforms have differential modes of regulation and the scenario is further complicated because of the multiple isoforms coded in the maize genome.

FB1 directly inhibits β -1,3-glucanase basic isoforms during *F. verticillioides* infection

In this work, we observed that during FB1 treatment and *F. verticillioides* infection, a reduction in enzymatic activity of the two basic isoforms expressed constitutively throughout the germination, and demonstrate that such inhibition might be due to a direct interaction between the toxin and the enzyme. This novel inhibitory activity of β -1,3-glucanases by FB1 exemplifies the “arms race” in an antagonistic interaction where the pathogen produces effector molecules that suppress the host basal defense response (Misas-Villamil and van der Hoorn 2008).

The role of inhibitors that suppress plant defense hydrolytic enzymes during pathogenesis has been demonstrated in other plant-pathogen interactions (Stahl and Bishop 2000; York et al. 2004; Misas-Villamil and van der Hoorn 2008). For example, the tomato/potato pathogen *Phytophthora infestans* secretes extracellular protease inhibitors EPI1 and EPI10 that target the tomato PR-7 Ser protease P69B; and also produces cystatin-like inhibitors called EPIC (EPIC1 and EPIC2) that are exclusively expressed during infection (Tian et al. 2004, 2005, 2007). In the *Phytophthora sojae*-soybean interaction, the oomycete produces the glucanase inhibitor GIP1 during infection. This 27-kDa protein only inhibits the soybean β -1,3-glucanase-A (EGaseA), but not the related isoform, EgaseB, although both of them are basic glucanases but with distinct expression pattern. While EGaseA is constitutively expressed in soybean, EGaseB only accumulates during pathogen infection (Ham et al. 1997; Rose et al. 2002). Such selective inhibition resembles what we observed in the *Fusarium*-maize interaction, however, a fundamental difference between FB1 and GIP1 is their chemical nature; GIP1 is a protein that shares sequence similarity with chymotrypsin-type serine proteases that have lost its proteolytic activity (Damasceno et al. 2008) and FB1 is a sphinganine analog mycotoxin derived from the polyketide metabolism.

In *F. verticillioides* pathogenesis, the role of FB1 as an inhibitor of β -1,3-glucanases is supported by two facts: firstly, the mycotoxin levels delivered by the pathogen in the plant tissue are comparable with those found when the toxin is applied exogenously; thus, the concentration of FB1, used in this work, appears to be physiologically relevant; secondly, the IC_{50} value (53 μ M) for the basic isoforms is quite low and can be reached in colonized tissues. So far, there is information about inhibitors mainly of β -1,3-glucanases isolated from fungi. For example, a purified β -1,3-glucanase from *Basidiomycete* sp. QM 806 is inhibited by D-glucono-1,5-lactone with an IC_{50} of 100 mM, while this same compound inhibits other β -1,3-glucanase isolated from *Chyso sporium prunosum* with an IC_{50} of 37 mM (Reese and Parrish 1971). A β -1,3-glucanase of *Talaromyces emersonii*

is inhibited by a glucono- δ -lactone with a K_i of 1.25 mM (O’Connell et al. 2011). And finally, according to data reported by Ham et al. (1997), GIP1, the inhibitor secreted by *P. sojae*, and the soybean β -1,3-glucanase EgaseA, form stable multimeric complexes and GIP1 inhibited the enzyme with an IC_{50} of approximately 0.85 nM reflecting a strong affinity between both proteins.

Because these β -1,3-glucanases isoforms act in synergy with chitinases, even partial inhibition of the former might significantly reduce the antifungal activity of the plant hydrolases. For example, in vitro tests have shown that both isoforms of vacuolar hydrolases are most effective when applied together promoting hyphal lysis and inhibition of growth of various fungal pathogens (Sela-Buurlage et al. 1993; Lawrence et al. 1996).

Thus, we are reporting a third target of action of FB1: two basic isoforms of β -1,3-glucanase of maize embryos during germination. The first target was reported to be the sphinganine *N*-acyl transferase (ceramide synthase) from the endoplasmic reticulum with an IC_{50} of 0.1 μ M in rat hepatocytes (Wang et al. 1991) and in multiple plant species (Abbas et al. 1994; de la Torre-Hernandez et al. 2010). Second, FB1 is an uncompetitive inhibitor of the maize H^+ -ATPase with a K_i value of 17.5 μ M (Gutiérrez-Nájera et al. 2005).

FB1 induces β -1,3-glucanase isoform I activation through SA pathway

Our results clearly showed that β -1,3-glucanase acidic isoform was induced in both treatment with FB1 and during *F. verticillioides* infection in maize embryos. The fact that during infection, the *FUM1* gene transcript was detected as well as FB1 levels (65–200 ng/g) comparable to those found when the embryos were imbibed in presence of the mycotoxin, supports the notion that the toxin produced in vivo was the effector. On the other hand, these data are physiologically relevant because in a natural environment high FB1 amounts can be recorded, both in seeds (Doko et al. 1995; Fadl 1998; Kedera et al. 1999) and in soil (Williams et al. 2006). The complexity of β -1,3-glucanases isoforms is also reflected by the fact that they respond to different hormone pathways associated with plant defense. The maize β -1,3-glucanase isoform I characterized here was induced by the SA analog INA but not by MeJA at the times tested thus suggesting it is a target of the SA pathway. Such activation is consistent with our hypothesis that the SA pathway operates upon FB1 addition and *F. verticillioides* infection causing through LCB accumulation (Fig. 7).

FB1 inhibits sphinganine *N*-acyl-transferase activity causing the accumulation of LCBs (Abbas et al. 1994). The signaling role of these LCBs has been documented in

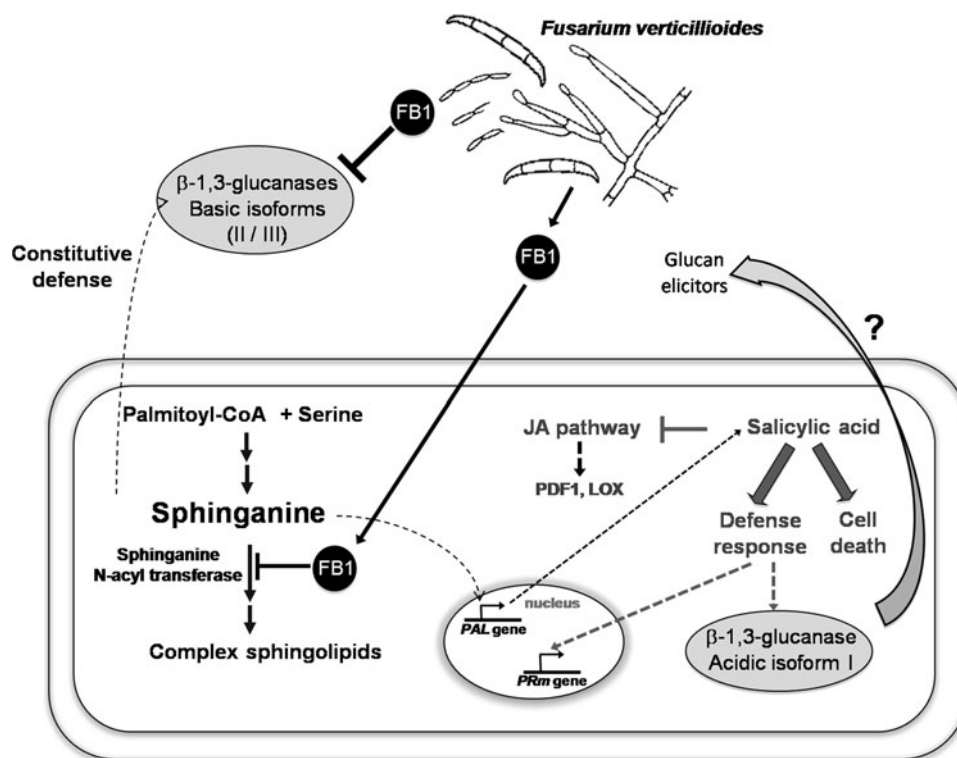


Fig. 7 Fumonisin B1 selectively modulates the activity of maize β -1,3-glucanases during *Fusarium verticillioides* infection by two independent pathways. FB1 present in soil and newly toxin secreted by *F. verticillioides* during the infection probably directly inhibits basic β -1,3-glucanases in the extracellular space facilitating fungal colonization. Second, the FB1 inhibits sphinganine *N*-acyl transferase in the host cell causing LCBs build-up that might activate the SA

pathway that in turn, induced β -1,3-glucanase activity. Activation of the SA pathway might suppress the jasmonic acid pathway thus facilitating necrotroph proliferation. *Solid arrows* indicate activation, induction, or accumulation of compounds or gene transcript, while *dashed arrows* represent hypothesized interactions. *End-blocked lines* indicate inhibition of enzymatic activity or antagonistic interactions

plants as they induce reactive oxygen intermediates generation and cell death (Shi et al. 2007), probably through a mitogen-activated protein kinase 6 (MPK6) in *Arabidopsis* (Saucedo-García et al. 2011). In addition, FB1 treatment induces the expression in *Arabidopsis* protoplasts of the SA-regulated genes flavonoid glucosyltransferase, extensions, and vacuolar proteases (Asai et al. 2000), as well as the pathogenesis-related genes PR-1, PR-2, and PR-5 in seedlings (Stone et al. 2000). In maize, evidence linking the action of SAMs to the SA pathway comes from the observation that FB1 induces a dose-dependent SA elevation and nuclease activation through LCB accumulation (de la Torre-Hernandez et al. 2010). The association between the observed acidic β -1,3-glucanase induction and the SA pathway could be established because first, such activation coincided temporally with the highest sphinganine cell levels are reached in maize embryos germinated in the presence of FB1. Second, INA, an SA analog, strongly induced the acidic β -1,3-glucanase isoform I activity, and third, concomitant to this induction, occurs transcriptional activation of the PAL gene with both, FB1 treatment and *F. verticillioides* infection. Additional evidence of the involvement of SA in the interaction *F. verticillioides*–

maize is the fact that FB1 induced the expression of PRm transcript that also is strongly induced during *F. verticillioides* infection. PRm belongs to PR-1 group and, in dicots increased expression is associated with activation of the SA pathway. PRm has 54% identity with AtPR1 and in the *PRm* promoter we found potential elements that might respond to SA, such as W boxes and binding sites for WRKY-type transcription factors that are related in transducing the signal activated by SA (Loake and Grant 2007).

It was interesting that in germinating embryos, sphinganine was the LCB found in higher levels as this contrasts with data reported by Williams et al. (2007) and Zitomer et al. (2010) in maize seedlings. These authors found higher levels of the trihydroxylated LCB phytosphingosine in maize seedlings, treated with FB1 or *F. verticillioides*. We typically found a sphinganine/phytosphingosine (SN/PS) ratio of 4 at 24 h, a time point with the highest accumulation of sphinganine, whereas in maize seedlings treated with FB1 or *F. verticillioides* an average SN/PS 0.3 ratio is found (Williams et al. 2007). Such discrepancy might be explained by the particular lipid composition in the escutellum of maize embryos as it has been reported that in glycosylceramides from pea seeds the sphinganine/

phytosphingosine ratio is 2 (Ito et al. 1985), and in wheat germ this value is 7 (Takakuwa et al. 2005).

The documented role of sphingolipids and LCBs as signal transducers of plant defense response and programmed cell death (Shi et al. 2007; Takahashi et al. 2009; Peer et al. 2010) makes sphingolipid metabolism an attractive target for pathogen attack. In this way, SAMs have evolved in at least two distinct necrotrophic fungi that efficiently disrupt sphingolipid metabolism causing LCBs accumulation and promoting host cell death. Although this role for fungal toxins produced by necrotrophs is generally accepted (Abramovitch and Martin 2004; Wolpert et al. 2002), SAMs might have an additional and more subtle function in diverting the host cell defense response (Sánchez-Rangel and Plasencia 2010). By inhibiting sphinganine *N*-acyl transferase activity, LCBs accumulate and trigger various signaling pathways that result in SA build-up. In maize, one effect of activating the SA-dependent pathway is the activation of the acidic β -1,3-glucanase isoform and *ZmPRm* gene induction (Fig. 7). Moreover, because cross-talk occurs between plant hormone pathways, activation of the SA response might suppress the jasmonic acid (JA) signaling pathway that is commonly turned on against necrotrophic pathogens. The link between LCB accumulation and SA levels is not only observed through the action of fumonisin, but also in several *Arabidopsis* mutants affected in sphingolipid biosynthesis and metabolism. All three *Arabidopsis* mutants, *acd5* ceramide kinase (Liang et al. 2003), *acd11* sphingosine transporter (Brodersen et al. 2002), and *erh1*, IPCS (Wang et al. 2008) constitutively express pathogenesis-related genes (PR1, PR2, PR3), and contain increased SA levels compared with wild-type plants. Thus FB1, through an LCB-dependent pathway, might suppress host cell responses favoring the development of a necrotroph, and through an LCB-independent pathway might affect other targets such as the inhibition of the basic β -1,3-glucanases that participate in the constitutive defense response.

Acknowledgments The authors gratefully acknowledge the critical comments and support received from Drs. Helena Porta and Tzvetanka Dinkova. We thank Dr. R. Cruz-Ortega for critically reviewing the manuscript. Technical help from M. Najera-Martinez in Molecular Biology techniques is greatly appreciated. This research was supported by Grants 50503-Z from CONACYT to JP and IN220511 from DGAPA-PAPIIT to SSN. DSR received a fellowship from CONACYT (49792) to pursue the PhD degree in the Biochemical Sciences Program, UNAM.

References

- Abbas HK, Tanaka T, Duke SO, Porter JK, Wray EM, Hodges L, Sessions AE, Wang E, Merrill AH, Riley RT (1994) Fumonisin- and AAL-toxin-induced disruption of sphingolipid metabolism with accumulation of free sphingoid bases. *Plant Physiol* 106:1085–1093
- Abramovitch RB, Martin GB (2004) Strategies used by bacterial pathogens to suppress plant defenses. *Curr Plant Biol* 7:356–364
- Asai T, Stone JM, Heard JE, Kovtun Y, Yorgey P, Sheen J, Ausubel FM (2000) Fumonisin B1-induced cell death in *Arabidopsis* protoplasts requires jasmonate, ethylene, and salicylate-dependent signaling pathways. *Plant Cell* 12:1823–1835
- Bradford M (1976) A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Anal Biochem* 72:248–254
- Brodersen P, Petersen M, Pike HM, Olszak B, Skov S, Odum N, Jørgensen LB, Brown RE, Mundy J (2002) Knockout of *Arabidopsis accelerated-cell-death11* encoding a sphingosine transfer protein causes activation of programmed cell death and defense. *Genes Dev* 16:490–502
- Campo S, Carrascal M, Coca M, Abian J, San Segundo B (2004) The defense response in germinating maize embryos against fungal infection: a proteomics approach. *Proteomics* 4:383–396
- Caruso C, Chilosi G, Caporale C, Leonardo L, Bertini L, Magro P, Buonocore V (1999) Induction of pathogenesis-related proteins in germinating wheat seeds infected with *Fusarium culmorum*. *Plant Sci* 140:87–97
- Casacuberta JM, Raventós D, Puigdoménech P, San Segundo B (1992) Expression of the gene encoding the PR-like protein PRms in germinating maize embryos. *Mol Gen Genet* 234:97–104
- Collingel DB, Kragh KM, Mikkelsen JD, Nielsen KK, Rasmussen U, Vad K (1993) Plant chitinases. *Plant J* 3:31–40
- Cordero MJ, Raventós D, San Segundo B (1994) Differential expression and induction of chitinases and β -1,3-glucanases in response to fungal infection during germination of maize seeds. *Mol Plant Microbe Interact* 7:23–31
- Damasceno C, Bishop JG, Ripoll DR, Win J, Kamoun S, Rose JKC (2008) Structure of the glucanase inhibitor protein (GIP) family from *Phytophthora* species suggests coevolution with endo-beta-1,3-glucanases. *Mol Plant Microbe Interact* 21:820–830
- de la Torre-Hernandez ME, Rivas-San Vicente M, Greaves-Fernandez N, Cruz-Ortega R, Plasencia J (2010) Fumonisin B1 induces nuclease activation and SA accumulation through long-chain sphingoid base build-up in germinating maize. *Physiol Mol Plant Pathol* 74:334–337
- Desjardins AE, Plattner RD (2000) Fumonisin B1-nonproducing strains of *Fusarium verticillioides* cause maize (*Zea mays*) ear infection and ear rot. *J Agric Food Chem* 48:5773–5780
- Desjardins AE, Plattner RD, Nelson PE (1994) Fumonisin production and other traits of *Fusarium moniliforme* strains from maize in northeast Mexico. *Appl Environ Microbiol* 60:1695–1697
- Desjardins AE, Plattner RD, Nelsen TC, Leslie JF (1995) Genetic analysis of fumonisin production and virulence of *Gibberella fujikuroi* mating population A (*Fusarium moniliforme*) on maize (*Zea mays*) seedlings. *Appl Environ Microbiol* 61:79–86
- Desjardins AE, Busman M, Muhitch M, Proctor RH (2007) Complementary host-pathogen genetic analyses of the role of fumonisins in the *Zea mays*-*Gibberella moniliformis* interaction. *Physiol Mol Plant Pathol* 70:149–160
- Doehlert DC, Knutson CA, Vesonder RF (1994) Phytotoxic effects of fumonisin B1 on maize seedling growth. *Mycopathologia* 127:117–121
- Doko MB, Rapior S, Visconti AN, Schojth JE (1995) Incidence and levels of fumonisin contamination in maize genotypes grown in Europe and Africa. *J Agric Food Chem* 43:429–434
- Duncan KE, Howard RJ (2010) Biology of maize kernel infection by *Fusarium verticillioides*. *Mol Plant Microbe Interact* 23:6–16
- Fadl AEM (1998) Occurrence and toxigenicity of *Fusarium moniliforme* from freshly harvested maize ears with special references to fumonisin production in Egypt. *Mycopathologia* 140:99–103

- Ferreira R, Monteiro S, Freitas R, Santos C, Chen Z, Batista L, Duarte J, Borges A, Teixeira A (2007) The role of plant defence proteins in fungal pathogenesis. *Mol Plant Pathol* 8:677–700
- Glenn AE, Zitomer NC, Zimeri AM, Williams LD, Riley RT, Proctor RH (2008) Transformation-mediated complementation of a *FUM* gene cluster deletion in *Fusarium verticillioides* restores both fumonisin production and pathogenicity on maize seedlings. *Mol Plant Microbe Interact* 21:87–97
- Gutiérrez-Nájera N, Muñoz-Clares RA, Palacios-Bahena S, Ramirez J, Sanchez-Nieto S, Plasencia J, Gavilanes-Ruiz M (2005) Fumonisin B1, a sphingoid toxin, is a potent inhibitor of the plasma membrane H⁺-ATPase. *Planta* 221:589–596
- Haïssam J, Lepoivre P (1998) Characterization of an Exo- β -1,3-glucanase produced by *Pichia animala* Strain K, antagonist of *Botrytis cinerea* on apples. *Phytopathology* 88:335–343
- Ham K, Wu S, Darvill A, Albersheim P (1997) Fungal pathogens secrete and inhibitor protein that distinguishes isoforms of plant pathogenesis-related endo- β -1,3-glucanases. *Plant J* 11:169–179
- Hoj PB, Fincher GB (1995) Molecular evolution of plant β -glucan endohydrolases. *Plant J* 7:367–379
- Hu LB, Zhang T, Yang ZM, Zhou W, Shi ZQ (2009) Inhibition of fengycins on the production of fumonisin B1 from *Fusarium verticillioides*. *Lett Appl Microbiol* 48:84–89
- Ito S, Ohnishi M, Fujino Y (1985) Investigation of sphingolipids in pea seeds. *Agric Biol Chem* 49:539–540
- Ji C, Norton RA, Wicklow DT, Dowd P (2000) Isoform patterns of chitinase and β -1,3-glucanase in maturing corn kernels (*Zea mays* L.) associated with *Aspergillus flavus* milk stage infection. *J Agric Food Chem* 48:507–511
- Kasprzewska A (2003) Plant Chitinases: regulation and function. *Cell Mol Biol Lett* 8:809–824
- Kedera CJ, Leslie JF, Claffin LE (1994) Genetic diversity of *Fusarium* Section *Liseola* (*Gibberella fujikuroi*) in individual maize stalks. *Phytopathology* 84:603–607
- Kedera CJ, Plattner RD, Desjardins AE (1999) Incidence of *Fusarium* spp. and levels of fumonisin B1 in maize western Kenya. *Appl Environ Microbiol* 65:41–44
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685
- Lam E, Kato N, Lawton M (2001) Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response. *Nature* 411:848–853
- Lawrence CB, Joosten MH, Tuzun S (1996) Differential induction of pathogenesis-related proteins in tomato by *Alternaria solani* and the association of a basic chitinase isozyme with resistance. *Physiol Mol Plant Pathol* 48:361–377
- Leah R, Tommerup H, Svendsen I, Mundy J (1991) Biochemical and molecular characterization of three barley seed proteins with antifungal properties. *J Biol Chem* 266:1564–1573
- Leubner-Metzger G (2003) Functions and regulation of β -1,3-glucanases during seed germination, dormancy release and after-ripening. *Seed Sci Res* 13:17–34
- Liang H, Yao N, Song JT, Luo S, Lu H, Greenberg JT (2003) Ceramides modulate programmed cell death in plants. *Genes Dev* 17:2636–2641
- Loake G, Grant M (2007) Salicylic acid in plant defence the players and protagonists. *Curr Plant Biol* 10:466–472
- Marín SV, Sanchis Vinas I, Canela R, Magan N (1995) Effect on water activity and temperature on growth and fumonisin B1 and B2 production by *Fusarium proliferatum* and *F. moniliforme* in grain. *Lett Appl Microbiol* 21:298–301
- Markham JE, Li J, Cahoon E, Jaworski JG (2006) Separation and identification of major plant sphingolipid classes from leaves. *J Biol Chem* 281:22684–22694
- Misas-Villamil J, van der Hoorn R (2008) Enzyme–inhibitor interactions at the plant–pathogen interface. *Curr Plant Biol* 11:380–388
- Munkvold GP, McGee DC, Cariton WM (1997) Importance of different pathways for maize kernel infection by *Fusarium moniliforme*. *Phytopathology* 87:209–217
- Murata T, Amarume S, Hattori T, Tokuyama S, Tokuyasu K, Kawagishi H, Usui T (2005) Purification and characterization of a chitinase from *Amycolatopsis orientalis* with N-acetylglucosamine-repeating unit releasing activity. *Biochem Biophys Res Commun* 336:514–520
- Murillo I, Cavallarin L, San Segundo B (1997) The maize pathogenesis-related PRms protein localizes to plasmodesmata in maize radicles. *Plant Cell* 9:145–156
- Naumann TA, Wicklow DT, Kendra DF (2010) Maize seed chitinase is modified by a protein secreted by *Bipolaris zeicola*. *Physiol Mol Plant Pathol* 74:134–141
- O’Connell E, Piggott C, Tuohy M (2011) Purification of exo-1,3-beta-glucanase, a new extracellular glucanolytic enzyme from *Talaromyces emersonii*. *Appl Microbiol Biotechnol* 89:685–696
- Peer M, Stegmann M, Mueller MJ, Waller F (2010) *Pseudomonas syringae* infection triggers de novo synthesis of phytosphingosine from sphinganine in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett* 584:4053–4056
- Proctor RH, Plattner RD, Desjardins AE, Busaman M, Butchko R (2006) Fumonisin production in the maize pathogen *Fusarium verticillioides*: genetic basis of naturally occurring chemical variation. *J Agric Food Chem* 54:2424–2430
- Reese ET, Parrish FW (1971) Nojirimycin and d-glucono-1,5-lactone as inhibitors of carbohydrases. *Carbohydr Res* 18:381–388
- Rose JKC, Ham KS, Darvill AG, Albersheim P (2002) Molecular cloning and characterization of glucanase inhibitor proteins: coevolution of a counter defense mechanism by plant pathogens. *Plant Cell* 14:1329–1345
- Sánchez-Rangel D, Plasencia J (2010) The role of sphinganine analog mycotoxins on the virulence of plant pathogenic fungi. *Toxin Rev* 29:73–86
- Sánchez-Rangel D, SanJuan-Badillo A, Plasencia J (2005) Fumonisin production by *Fusarium verticillioides* strains isolated from maize in México and development of a polymerase chain reaction to detect potential toxigenic strains in grains. *J Agric Food Chem* 53:8565–8571
- Saucedo-García M, Guevara-García A, González-Solís A, Cruz-García F, Vázquez-Santana S, Markham JE, Lozano-Rosas MG, Dietrich CR, Ramos-Vega M, Cahoon EB, Gavilanes-Ruiz M (2011) MPK6, sphinganine and the LCB2a gene from serine palmitoyltransferase are required in the signaling pathway that mediates cell death induced by long chain bases in *Arabidopsis*. *New Phytol* 191:943–957
- Seetharaman K, Whitehead E, Keller N, Waniska R, Rooney L (1997) In vitro activity of sorghum seed antifungal proteins against grain mold pathogens. *J Agric Food Chem* 45:3666–36671
- Sela-Buurlage M, Ponstein A, Bres-Vloemans S, Melchers L, van den Elzen P, Cornelissen B (1993) Only specific tobacco (*Nicotiana tabacum*) chitinases and β -1,3-glucanases exhibit antifungal activity. *Plant Physiol* 101:857–863
- Shi L, Bielawski J, Mu J, Dong H, Teng C, Zhang J, Yang X, Tomishige N, Hanada K, Hannun YA, Zuo J (2007) Involvement of sphingoid bases in mediating reactive oxygen intermediate production and programmed cell death in *Arabidopsis*. *Cell Res* 17:1030–1040
- Stahl EA, Bishop JG (2000) Plant-pathogen arms race at the molecular level. *Curr Opin Plant Biol* 3:299–304
- Stone JM, Heard JE, Asai T, Ausubel FM (2000) Simulation of fungal-mediated cell death by fumonisin B1 and selection of fumonisin B1-resistant (*fbr*) *Arabidopsis* mutants. *Plant Cell* 12:1811–1822
- Sydenham EW, Shepard GS, Thiel PG (1992) Liquid chromatographic determination of fumonisin B1, B2 and B3 in foods and feeds. *JAOAC Int* 75:313–316

- Takahashi Y, Berberich T, Kanzaki H, Matsumura H, Saitoh H, Kusano T, Terauchi R (2009) Serine palmitoyltransferase, the first step enzyme on sphingolipid biosynthesis, is involved in non-host resistance. *Mol Plant Microbe Int* 22:31–38
- Takakuwa N, Saito K, Ohnishi M, Oda Y (2005) Determination of glucosylceramide contents in crop tissues and by-products from their processing. *Bioresour Tech* 96:1089–1092
- Tian M, Huitema E, da Cunha L, Torto-Alalibo T, Kamoun S (2004) A Kazal-like extracellular serine protease inhibitor from *Phytophthora infestans* targets the tomato pathogenesis related protease P69B. *J Biol Chem* 279:26370–26377
- Tian M, Benedetti B, Kamoun S (2005) A second Kazal-like protease inhibitor from *Phytophthora infestans* inhibits and interacts with the apoplastic pathogenesis-related protease P69B of tomato. *Plant Physiol* 138:1785–1793
- Tian M, Win J, Song J, van der Hoorn R, van der Knaap E, Kamoun S (2007) A *Phytophthora infestans* cystatin-like protein targets a novel tomato papain-like apoplastic protease. *Plant Physiol* 143:364–377
- Van Asch MAJ, Rijkenberg FHJ, Coutinho TA (1992) Phytotoxicity of fumonisin B1, moniliformin and T-2 toxin to corn cultures. *Phytopathology* 82:1330–1332
- Van Hove F, Waalwijk C, Logrieco A, Munaut F, Moretti A (2011) *Gibberella musae* (*Fusarium musae*) sp. nov; a recently discovered species from banana is sister to *F. verticillioides*. *Mycologia* 103:570–585
- Wang E, Norred WP, Bacon CW, Riley RT, Merrill AH (1991) Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins. *J Biol Chem* 266:14486–14490
- Wang W, Yang X, Tangchaiburana S, Ndeh R, Markham JE, Tsegaye Y, Dunn TM, Wang GL, Bellizzi M, Parsons JF, Morrissey D, Bravo JE, Lynch DV, Xiao S (2008) An inositolphosphorylceramide synthase is involved in regulation of plant programmed cell death associated with defense in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 20:3163–3179
- Williams LD, Glenn AE, Bacon CW, Smith MA, Riley RT (2006) Fumonisin production and bioavailability to maize seedlings grown from seeds inoculated with *Fusarium verticillioides* and grown in natural soils. *J Agric Food Chem* 54:5694–5700
- Williams LD, Glenn AE, Zimeri AM, Bacon CW, Smith MA, Riley RT (2007) Fumonisin disruption of ceramide biosynthesis in maize roots and the effects on plant development and *Fusarium verticillioides*-induced seedling disease. *J Agric Food Chem* 55:2937–2946
- Windels CE, Burnes PM, Kommedahl T (1988) Five-years preservation of *Fusarium* species on silica gel and soil. *Phytopathology* 78:107–109
- Wolpert TJ, Dunkle LD, Ciuffetti LM (2002) Host-selective toxins and avirulence determinants: what's in a name? *Annu Rev Phytopathol* 40:251–285
- York WS, Qin Q, Rose J (2004) Proteinaceous inhibitors of endo- β -glucanases. *Biochim Biophys Acta* 1696:223–233
- Zitomer NC, Jones S, Bacon C, Glenn AE, Baldwin T, Riley RT (2010) Translocation of sphingoid bases and their 1-phosphates, but not fumonisins, from roots to aerial tissues of maize seedlings watered with fumonisins. *J Agric Food Chem* 58:7476–7481

A. Revisión

Sánchez-Rangel D, Plasencia J (2010) The role of sphinganine analog mycotoxins on the virulence of plant pathogenic fungi. *Toxin Reviews* 29: 73-86.

REVIEW ARTICLE

The role of sphinganine analog mycotoxins on the virulence of plant pathogenic fungi

Diana Sánchez-Rangel, and Javier Plasencia

Department of Biochemistry, School of Chemistry, Universidad Nacional Autónoma de México. Av. Universidad y Copilco. 04510, México, D.F. México

Abstract

Functional genomics and recent analytical developments have contributed to partially resolving the complexity and the important roles of sphingolipids in plant cell physiology. In the light of these discoveries, it is worthwhile to reassess the function of the sphinganine analog mycotoxins, which are produced by plant pathogenic fungi. The mode of action of sphinganine analog mycotoxins, which disrupt cellular sphingolipid metabolism, contributes to unravelling the role of sphingolipid intermediaries in the defense reaction mediated by the phytohormones salicylic acid, jasmonic acid, and ethylene. Thus toxin production appears to be an effective pathogen strategy to modulate the host cell defense response.

Keywords: *Fumonisin*; *AAL-toxin*; *Fusarium verticillioides*; *Alternaria alternata*; *sphingolipid*; *plant defense*

Introduction

Fumonisin and *Alternaria alternata* f.sp. *lycopersici* (AAL)-toxins are mycotoxins produced, respectively, by *Fusarium verticillioides* and *Alternaria alternata*, two plant pathogenic fungi. They have been characterized as sphinganine-analog mycotoxins (SAMs) because of their structural similarity to sphinganine (d18:0), the backbone precursor of sphingolipids (Figure 1). In light of recent progress describing the biosynthesis of plant sphingolipids and the role of these molecules on the plant defense response, it is appropriate to reassess the role of these mycotoxins on fungal virulence. Both SAMs are inhibitors of sphinganine *N*-acyltransferase blocking the synthesis of complex sphingolipids and causing the accumulation of long-chain sphingoid bases (Abbas et al., 1998; Abbas et al., 1994). However, it is clear now that such effects not only affect plant cell membrane integrity, but also trigger programmed cell death pathways facilitating colonization by the fungal necrotrophs. Distinct lines of evidence also have shown that unbalanced sphingolipid levels have a profound effect on the defense pathways regulated by the plant hormones salicylic acid (SA), jasmonic acid (JA), and

ethylene (ET), suggesting that targeting sphingolipid metabolism through SAMs might constitute a novel mechanism of diverting the plant defense response. In this review we present and analyze the evidence supporting the role of SAMs as virulence factors in light of the newest information on plant sphingolipid metabolism and function, and the interactions among the hormone-mediated defense responses.

Overview of sphingolipid biosynthesis in plants and key enzymes in biosynthesis

Unraveling the complex nature and biosynthesis of plant sphingolipids is a task being performed currently by several laboratories worldwide, and recent breakthroughs in this area have been facilitated by the advancement of new tools in two different fields: 1) the development of LC-MS-MS protocols for the quantitative analysis of complex mixtures of sphingolipids and precursors from plant cells, and 2) the annotated genome of the model plant *Arabidopsis thaliana*, along with the development of insertion mutants and RNA-based silenced lines that allow the

Address for Correspondence: Dr. Javier Plasencia de la Parra, Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México. Av. Universidad y Copilco. 04510, México, D.F. México. Telephone: +52-55-56225275; Fax: +52-55-56225329. E-mail: javierp@servidor.unam.mx

(Received 15 July 2010; accepted 10 August 2010)

ISSN 1556-9543 print/ISSN 1556-9551 online © 2010 Informa Healthcare USA, Inc.
DOI: 10.3109/15569543.2010.515370

<http://www.informahealthcare.com/txr>

study of gene function. The success of the chemical analysis is not only derived from modern analytical instrumentation but also from the design of efficient extraction protocols that allow quantitative recoveries of these amphipatic molecules (Markham et al., 2006). The complexity of plant sphingolipids is reflected by the *Arabidopsis* sphingolipidome in which over 165 distinct chemical species have been identified (Markham and Jaworski, 2007). A brief overview of sphingolipid biosynthesis and enzymes involved will be presented here and the reader is referred to more comprehensive recent

reviews on the subject (Chen et al., 2009; Pata et al., 2010). Sphingolipid biosynthesis starts with the assembly of the sphingoid long-chain base (LCB) backbone through the condensation between serine and palmitoyl-CoA to generate 3-ketosphinganine (Figure 2). This reaction is catalyzed by serine palmitoyl transferase (SPT), a member of the pyridoxal phosphate-dependent α -oxoamine synthase family. The subunits of this heterodimeric enzyme, LCB1 and LCB2, are structurally similar, but the catalytic site has been located in the LCB2 subunit. However, LCB1 must be essential to stabilize the dimer and

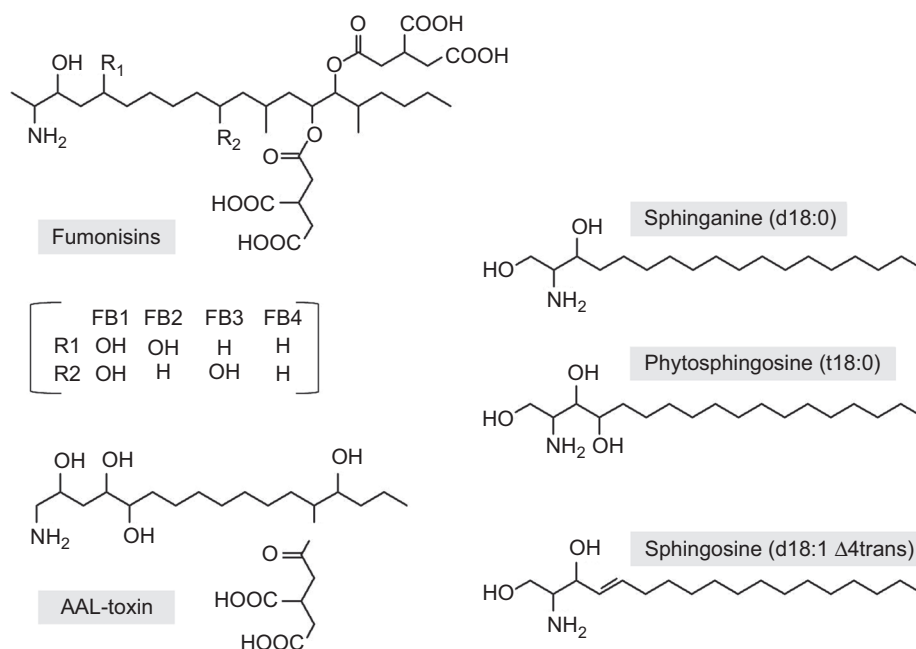


Figure 1. Chemical structures of sphinganine, phytosphingosine, and sphingosine, the main long-chain bases found in plants, and the two sphinganine-analog mycotoxins (SAM), fumonisin B1 and AAL-toxin.

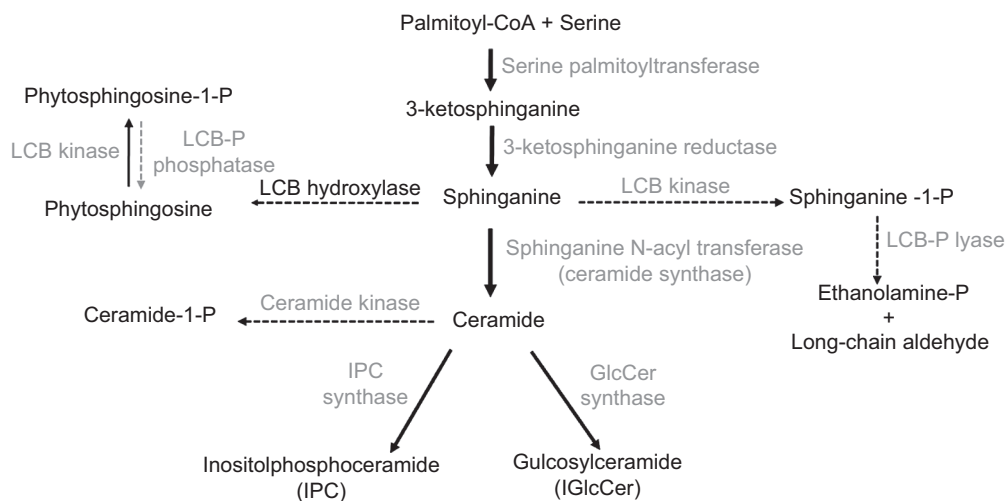


Figure 2. Biosynthetic pathway of sphingolipids in plants. The major steps of complex sphingolipid synthesis are shown as well as the main modifications on long-chain bases and ceramide.

the active site, as mutants in this gene are not viable (Chen et al., 2009; Chen et al., 2006; Tamura et al., 2001). The 3-ketosphinganine generated is further reduced to produce sphinganine by 3-ketosphinganine reductase, a NADPH-dependent enzyme (Chen et al., 2009).

Once formed, the sphinganine is condensed with a fatty acid CoA to produce ceramide. This key reaction is catalyzed by a sphinganine *N*-acyltransferase, also called ceramide synthase (Figure 2), and although three genes for this enzyme have been detected in *A. thaliana* genome, the tomato enzyme is the best-characterized plant enzyme with this activity. As it will be described below, a functional ceramide synthase is required in tomato to prevent disruption of sphingolipid metabolism by AAL toxin (Spassieva et al., 2002). Because of the diverse composition of ceramides and the fact that there are several genes for ceramide synthase, it has been speculated that these enzymes might have different substrate specificity, so one enzyme preferentially binds dihydroxylated LCBs with C16 fatty acid while the other isoform favors the reaction between a trihydroxylated LCB and a very long chain fatty acid (Chen et al., 2009). Once the ceramide is formed, UDP-glucose is employed as donor by a glucosyl ceramide synthase to attach a glucose moiety at the C1 position to form glucosyl ceramide. Plant glucosyl ceramide synthases (GCS) have low sequence identity with other eukaryotic GCS, but are able to complement yeast mutants (Leipelt et al., 2001).

Ceramide might also be modified in C1 by the transfer of the phosphorylinositol group from phosphatidylinositol to ceramide through the action of the inositol phosphoryl ceramide synthase (IPCS) (Figure 2). The plant enzyme is able to use ceramides with either hydroxylated or non-hydroxylated fatty acids (Bromley et al., 2003). The three *Arabidopsis* IPCS genes are capable of complementing the yeast mutant and they are differentially expressed in plant tissues (Mina et al., 2010).

Sphingolipid complexity is not only derived from the length and modifications of the fatty acids from ceramide, but also from reactions in the LCB backbone. Hydroxylation (Figure 2) at C4 generates phytosphingosine (Figure 1), an abundant sphingoid base in plants, and levels of these trihydroxy-LCBs appear to be important in mediating the composition of sphingolipids in plants (Chen et al., 2008). A double bond might be introduced at C4 and/or C8 in the LCBs by two different desaturases to generate sphingenines, such as sphingosine (Figure 1). A unique characteristic of the LCB $\Delta 8$ desaturase is its bifunctionality, as it can introduce the double bond either in *cis*- or *trans*- orientation (Sperling et al.,

1998). LCBs can be phosphorylated at the C1 position by the activity of a kinase to generate sphinganine-1-phosphate or phytosphingosine-1-phosphate (Worrall et al., 2008) (Figure 2). In mammalian cells, sphingosine-1-phosphate is a well-characterized messenger with a selective receptor that is involved in several transduction pathways. In plants, the phosphorylated sphingoid base derivatives participate in abscisic acid-mediated stomatal closure (Ng et al., 2001). This phosphorylation step contributes to curb free LCB cellular levels and constitute the first step in LCB degradation, as the phosphorylated LCBs are the substrate for the lyase activity to produce ethanolamine-P and an LCB aldehyde (Tsegaye et al., 2007) (Figure 2).

Role of sphingolipid intermediaries in modulating the defense response/hypersensitive response (HR)

The HR in plants as an inducible defense against pathogens

Plants in their natural habitat are exposed to a variety of pathogens including viruses, bacteria, fungi, oomycetes, nematodes, and insect herbivores. To defend themselves against all these different types of pathogens, plants have developed a type of immune system composed of constitutive and inducible defenses that together prevent and control most pathogen infections. When constitutive defenses such as wax layers and defensins are not sufficient to deter pathogen penetration, the plant generates a broad spectrum of inducible defenses to limit the spread of the infection. The induction of this defense response requires pathogen recognition and activation of multiple pathways. The defense of some plants involves the induction of a rapid and localized programmed cell death response at the site of infection (Lam et al., 2001). This programmed cell death response is called HR, which is associated with ion fluxes, oxidative burst, nitric oxide production, kinase activation, lipid signaling, cell wall fortification through the synthesis of callose and lignin, production of antimicrobial secondary metabolites such as phytoalexins, and the accumulation of pathogenesis-related (PR) proteins; such as chitinases and glucanases (Pieterse et al., 2009). Numerous components involved in the development of the HR have been identified, and to date, three hormones, SA, JA, and ET, (Figure 3) play major roles on reprogramming at the genetic, biochemical, and metabolic levels to develop an effective state of defense. Later we will describe the signaling pathways modulated by these three phytohormones.

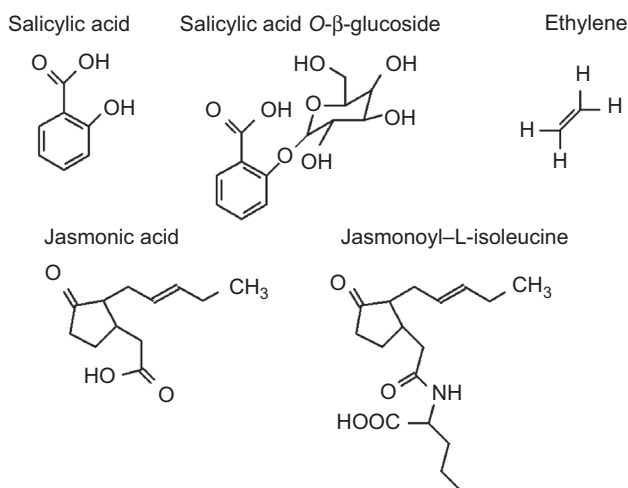


Figure 3. Chemical structures of the main phytohormones implicated in plant defense responses and two of their derivatives.

Role of sphingolipid intermediaries on the regulation of plant cell death and the defense response

The role of sphingolipids in plant defense associated with the HR has been deduced from three distinct lines of evidence: 1) exogenous addition of sphingoid bases and ceramides to plant cell cultures and tissues, 2) phenotypic analysis of mutants defective on sphingolipid metabolism, and 3) the effects of SAMs on the outcome of the plant-pathogen interaction. This latter point will be presented in the following sections for each one of the SAMs.

In *A. thaliana*, cell cultures treated with a synthetic C2 ceramide (50 μ M), a twofold increase in cytosolic Ca^{2+} precedes hydrogen peroxide production and cell death (Townley et al., 2005). Also, in *A. thaliana* leaves, application of 2 μ M sphingosine, sphinganine, or phytosphingosine trigger reactive oxygen intermediates generation and cell death (Shi et al., 2007). A more direct evidence is that overexpression of the LCB2 subunit of SPT results in cell death in *Nicotiana benthamiana* leaves (Takahashi et al., 2009). In all the cases described above, sphingolipid levels are disturbed either by the addition of the compounds or by overexpressing the first enzyme in the biosynthetic route.

Also, addition of natural complex sphingolipids, cerebrosides A and C, purified from pathogenic fungus *Magnaporthe grisea*, are capable of inducing an HR when applied on rice leaves. This elicitor activity is reflected by inciting the production of the antimicrobial phytoalexin momilactone and cell death (Koga et al., 1998). This response is selective to certain cerebrosides since galactocerebrosides and glucocerebrosides derived from mammalian cells lack this activity,

and this type of cerebrosides has been isolated from other pathogenic fungi as well (Ummemura et al., 2000). A putative receptor in the plant cell surface might be responsible for this recognition to transduce the signal through heterotrimeric G proteins to OsRac1, an important regulator in cell death and disease resistance in rice. Besides phytoalexin production, H_2O_2 accumulation and PR gene expression occurs through this pathway in response to the sphingolipid elicitor (Suharsono et al., 2002). Downstream of this signal transduction pathway elicited by fungal sphingolipids, a mitogen-activated kinase (MAPK) is stimulated, suggesting that various defense pathways are turned on (Lieberherr et al., 2005).

The role of sphingolipids as regulators of the plant defense and hypersensitivity responses has also been discovered through functional analyses of various genes involved in sphingolipid metabolism and the phenotypes shown. The *A. thaliana* mutant *acd11* shows an accelerated death (*acd*) phenotype characterized by a constitutive cell death and PR gene expression during development, as well as phytoalexin and calose accumulation. The protein coded by the *Acd11* gene has high identity to a mammalian glycolipid transfer protein and can transport sphingosine between membranes *in vitro* (Brodersen et al., 2002). A second *Arabidopsis* mutant, *acd5*, shows normal development but presents an exacerbated hypersensitive cell death response, mediated by the SA pathway, upon infection by the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae* (Greenberg et al., 2000). The ACD5 protein has ceramide kinase activity so it is proposed that the ratio between ceramide and its phosphorylated metabolite acts as a rheostat that initiates programmed cell death (Liang et al., 2003).

A second mutation in *Arabidopsis* that results in ceramide accumulation is that of the inositol phosphoryl ceramide synthase (IPCS) gene (*ERH*). The enzyme converts ceramide to inositolphosphorylceramide (IPC), thus mutation in the *ERH* gene causes ceramide accumulation, SA buildup, and spontaneous HR cell death, mediated by the *RPW8* resistance gene that is responsible for restricting the infection by the powdery mildew fungus (Wang et al., 2008). Although the mechanism by which elevated ceramide levels causes enhanced cell death and SA accumulation is not clear, the evidence indicates that this sphingolipid plays a role in keeping these phytohormone levels in check and potentially regulates the extent of the SA-mediated defense response.

The importance of *de novo* biosynthesis of sphingolipids in plant immunity has been demonstrated by virus-induced gene silencing of the subunits of the *N. benthamiana* serine palmitoyl transferase. Transcript levels of the LCB2 gene augment upon inoculation with

Pseudomonas cichorii and silencing of either LCB1 or LCB2 subunits genes strongly compromised *N. benthamiana* resistance to this bacterial pathogen. Treatment of wild-type plants with myriocin, a potent SPT inhibitor, also results in higher susceptibility to the pathogen (Takahashi et al., 2009). Again, the mechanism relating this phenotype with sphingolipid metabolism remains obscure, as neither levels of sphingoid LCBs nor any defense parameter were determined.

Further evidence that accumulation of free sphingoid bases mediates cell death came from the characterization of a *A. thaliana* fumonisin B1-resistant mutant (*fbr11-1*). In this genotype, the gene for one of the subunits of the serine palmitoyl transferase gene has lower expression compared with wild-type plants. Although total sphingoid base levels are not modified in these plants, treatment with 5 μ M FB1 causes sphinganine and phytosphingosine levels to increase only 23- and 6-fold, respectively, versus the 77- and 12-fold increase in the wild-type plants that show ROS accumulation and programmed cell death (Shi et al., 2007).

Because many of the phenotypes described above are reminiscent of the effects provoked by the SAMs, FB1, and AAL-toxin, it can be suggested that these toxins play a more delicate role on fungal virulence by interfering with the plant defense response through sphingolipid metabolism disruption.

SAMs toxins: the role of FB1 and AAL in pathogenesis

Fusarium verticillioides as a pathogen of maize

Fusarium verticillioides is the most prevalent ascomycetous fungus isolated from maize (*Zea mays*); it can be either an endophyte causing no visible disease, or a pathogen causing disease such as seed, root, stem, and ear rot, thus affecting all stages of plant development. The symptomatic condition, which is usually rare, is the result of a complex interaction of several factors such as virulence of an isolate (Desjardins et al., 1995; Kedera et al., 1994), maize variety (Duncan and Howard, 2010; Headrick et al., 1990; King and Scott, 1981) and the environment. Ear rot is favored by warm, dry weather during the grain-filling period (Bacon et al., 2001; Samapundo et al., 2007; Summer, 1968; Torres et al., 2003). *F. verticillioides* represents up to 80% of all fungal species isolated from maize seeds (Desjardins et al., 1994; Desjardins et al., 2000; Sánchez-Rangel et al., 2005). The fungal propagules surviving in the soil are strategically positioned to infect a new plant during seed germination and seedling establishment. The fungus is capable of moving

from infected seeds to the kernel through passage to the seedling, moving within the stalk to reach the ear, and finally spreading to other kernels within the ear (Kedera et al., 1994; Munkvold et al., 1997). The limiting step in the movement of the fungus from seeds to the upper parts of the plant appears to be the transition from the seedling crown to the stalk. Besides seed-borne infection, the most common pathway for this fungus to reach the kernels is through silk infection. Once the fungal conidia reach the silk, the stylar canal appears to be the only route to the pericarp cells from outside of the kernel and the hyphae grows on the cuticle surface, entering the kernel through the bottom of the stylar canal (Duncan and Howard, 2010). Although each one of these routes has been studied individually, plants in the field can be infected by multiple pathways and by genetically distinct strains of the fungal pathogen.

Fusarium verticillioides does not produce specialized structures, such as appressoria, to facilitate entry into the tissue and cells, but it is capable of producing large quantities of lytic enzymes and toxins that might contribute to the infection process. Among the toxins produced by this species, fusaric acid, fusarin C, naphthoquinones, moniliformin, and fumonisins are the most abundant (Bacon et al., 1989; Bacon et al., 1996; Desjardins, 2006; Rabie et al., 1982). Although the presence of these compounds in agricultural commodities and foods is of great concern, thus fostering intensive research (Reddy et al., 2009; Reddy et al., 2010), their role in the virulence of *F. verticillioides* has not been unequivocally demonstrated. So far approximately 60 distinct fumonisin and fumonisin-analog molecules have been identified (Bartók et al., 2006; Rheeder et al., 2002). Fumonisins from the B group contain a linear 20-carbon backbone with an amine at carbon atom 2 (C-2) and tricarboxylic acid moieties esterified to C-14 and C-15 (Figure 1). The compounds differ from one another by the presence or absence of hydroxyl groups at C-5 and C-10; fumonisin B1 (FB1) has both hydroxyls. FB1, FB2, and FB3 are the major fumonisins found naturally in maize tissue infected, and FB1 is the most abundant as it constitutes more than 75% of total fumonisins found (Marín et al., 1995; Proctor et al., 2006). FB1 production is highly variable among strains; some of them do not produce FB1 or synthesize it at very low levels (0.1 mg/g substrate), while other strains produce high amounts of the toxin (4 mg/g substrate) (Desjardins et al., 1994; Desjardins et al., 1995; Nascimento et al., 2006; Sánchez-Rangel et al., 2005). One reason for this variability in the production of FB1 may be the presence of natural mutants of the responsible genes for biosynthesis (Glenn et al., 2008; Sánchez-Rangel et al., 2005). The genes coding for fumonisin synthesis, secretion, and resistance

comprise a 46-kb region in chromosome 1 forming the FUM locus (Proctor et al., 1999; Proctor et al., 2003; Seo et al., 2001).

Fumonisin are synthesized from acetate units to form a linear dimethylated polyketide that is condensed with alanine, followed by up to five oxygenations and two esterifications. The first reaction is catalyzed by a polyketide synthase (PKS) that is encoded by the gene *FUM1*; this PKS contains several catalytic domains that are responsible for the extension of the PK chain: β -ketoacyl synthase (KS), acyltransferase (AT), and an acyl carrier protein (ACP) (Huffman et al., 2010). Non-FB1 producing *F. verticillioides* mutants occur naturally and they lack the *FUM1* gene or the complete FUM locus, (Glenn et al., 2008; Proctor et al., 1999). Mutations in other genes from the cluster, like the ones coding the oxygenases that hydroxylate the C-10 and C-5 respectively of the fumonisin backbone, lead to low or no production of FB1 and accumulation of FB2 and FB4 if the deficiency is in C-10 hydroxylation and accumulation of FB3 and FB4 if the deficient is in C-5 hydroxylation (Proctor et al., 2006; Tseng et al., 1995). Besides, mutations in genes responsible for FB1 biosynthesis, and environmental factors, such as pH, water availability and nutrient sources, also regulate FB1 production in a given strain. There are 11 described genes, all located outside the FUM locus, that contribute in varying degrees to regulating FB1 synthesis. Among the products of these genes are cyclins, G proteins, sugar transporters, transcription factors and other functions (Picot et al., 2010).

Association between FB1 production and virulence on maize

Because fumonisins are secondary metabolites, it was initially assumed that FB1 is synthesized late in the plant-fungus interaction, at the saprophytic stage of the fungus. However, recent studies have shown that FB1 can be produced *in planta* at early stages of infection (Williams et al., 2006; Williams et al., 2007) and even during the endophytic stage in maize seedlings (Bacon et al., 2001).

This SAM competitively inhibits sphinganine *N*-acyl transferase, causing an accumulation of sphingoid bases and complex sphingolipid depletion (Abbas et al., 1994; Wang et al., 1991). Most of the observed phytotoxic effects of FB1 have been associated with the ability to cause an imbalance on the intracellular levels of complex sphingolipids and their intermediates. The role of FB1 production as a virulence factor during infection of *F. verticillioides* has been debated for some years. A virulence factor is a molecule produced by the pathogen that enhances its potential to

cause disease by interfering with host specific functions that foster pathogen colonization. One piece of evidence of the role of FB1 in the pathogenesis of *F. verticillioides* is the fact that it causes phytotoxic effects on maize tissue. In maize callus cultures, 13 μ M FB1 causes a 50% reduction in growth (van Asch et al., 1992), and up to 75% inhibition on radicle elongation in germinating maize seeds (Doehlert et al., 1994). Lamprecht and coworkers (1994) tested the effects of FB1 at four concentrations (0.1, 1, 10, and 100 μ M) on shoot and root length of corn seedlings. They observed a dose-dependent reduction of both parameters showing at the highest concentration a significant reduction: 80% in the length of the stem and 95% in the length of roots. Likewise, Williams and colleagues (2007) showed that by applying 29 μ M FB1, leaf lesions appear and there is also a 23% reduction in stem height and 59% in the total root weight. In contrast, maize seedlings sprayed with FB1 did not show symptoms of disease (Abbas and Boyette, 1992). These contradictory results could be due to the genotype of the maize plant used in different studies (Glenn et al., 2008). For example, it has been reported that different maize populations show a wide range in sensitivity to the toxin, since the ED₅₀ can vary from 5 to 200 μ M (Desjardins et al., 2005; Desjardins, 2006); however, the molecular basis of the resistance is still unknown. Further evidence supporting the role of FB1 virulence is the high frequency that strains of *F. verticillioides* with the ability to produce the toxin are isolated from diseased tissues, and the high levels of FB1 found in maize tissues (Desjardins and Plattner, 1998; Nascimiento et al., 2006). By analyzing symptoms such as percent of emerged maize seedlings and shoot length of plants inoculated with *F. verticillioides* strains differing in their capacity to produce fumonisins, Desjardins and colleagues (1995) concluded that fumonisin contributes to fungal virulence but is not necessary. In maize seedlings inoculated with fumonisin-producing strains, more severe symptoms such as stunting, necrotic leaf lesions, abnormal leaf development, and reduced root development are seen than in strains incapable of producing the toxin. Severity of the symptoms on maize seedlings significantly correlates with the fumonisin levels found in the roots as well as increased tissue amounts of sphinganine and phytosphingosine (Williams et al., 2007). Interestingly, these sphingoid LCBs are translocated from the roots to the leaves. When maize seedlings are watered with a solution of FB1 (23 μ M), both sphinganine and phytosphingosine levels increase significantly in the first, second, and third leaves, as well as their phosphorylated derivatives. Evidence supporting the idea that LCBs are indeed translocated is the fact that fumonisins are

taken up by the root but do not move systemically to the leaves (Zitomer et al., 2010).

More robust genetic evidence of the physiological role of fumonisin in pathogenicity was transforming a non-fumonisin producing strain of *F. verticillioides* with the entire FUM cluster. The complemented transformant was now capable of producing FB1 and of invading maize seedlings, generating full disease symptoms such as necrotic lesions, tissue atrophy, and bleaching (Glenn et al., 2008). In another study, Williams and colleagues (2007) analyzed the time course for expression of disease symptoms in *F. verticillioides*-infected maize seedlings and its relationship to fumonisin production and disruption of sphingolipid metabolism. The study shows a link between the development of the disease with the accumulation of FB1 in vivo during *F. verticillioides* infection and strongly suggests that the severity in the disease may be due to the extent to which these sphingoid bases and/or phosphorylated forms trigger downstream cellular responses (Williams et al., 2006; Williams et al., 2007; Zitomer et al., 2008). According to the evidence generated so far, it is reasonable to conclude that FB1 is a virulence factor of *F. verticillioides* and therefore exists a positive relationship between symptom development, toxin presence, and LCB accumulation. FB1 inhibits de novo biosynthesis of sphingolipids and generates an imbalance in the levels of endogenous plant sphingolipids, specifically an accumulation of sphingoid bases, leading to cell death signaling, a cell state that *F. verticillioides* in its parasitic state takes advantage of to proliferate.

AAL-toxin is a virulence factor in *Alternaria alternata*

Alternaria alternata f.sp. *lycopersici* is a plant pathogenic fungus that synthesizes AAL-toxin, also a SAM (Figure 1). This necrotroph is the causal agent of stem canker of tomato but it can infect leaves, stems, and fruits. The symptoms of the disease are dark concentric cankers formed on the stems that enlarge slowly through the growing season. In leaves, epinasty and inward rolling is observed along with necrotic spots (Grogan et al., 1975). In contrast to the *Fusarium*-maize interaction, resistance to the fungus is widely present in many tomato cultivars and is inherited as a dominant trait controlled by a single gene. Also, in this pathosystem, the role of the toxin in pathogenesis was clearly established because AAL toxin-deficient mutants neither colonize nor cause symptoms in susceptible tomato cultivars (Akamatsu et al., 1997). The imminent biological role of the toxin contributed to classifying it as a host-selective toxin, as plants sensitive to the toxin are also susceptible to the pathogen.

Resistance to the toxin is an incomplete dominant trait because 50% of the heterozygous F1 individuals derived from crosses between homozygous resistant and susceptible cultivars show a toxin sensitivity phenotype between the two parents (Clouse and Gilchrist, 1987; Gilchrist and Grogan, 1976).

Although the chemical structure of AAL toxin was resolved well before that of FB1 (Bottini et al., 1981; Bottini and Gilchrist, 1981), its activity as SAM was not initially described. In fact, it has been shown that 5- to 10-fold lower doses of AAL toxin are needed to inhibit plant sphinganine *N*-acyl transferase activity than those of FB1 (Abbas et al., 1994).

Because resistance to the fungus was associated with the action of a single gene, the locus *Asc* (*Alternaria stem canker*) could be first mapped to tomato chromosome 3 (Mesbah et al., 1999). Positional cloning techniques were employed to isolate the *Asc* gene from the resistant tomato genotypes. The gene sequence does not resemble any known disease resistance gene but has identity to the longevity-assurance genes LAG and LAC previously characterized in yeast (Brandwagt et al., 2000). These genes are associated with the transport of glycosylphosphatidyl inositol anchored proteins and participate in ceramide synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* (Guillas et al., 2001; Markham and Hille, 2001). Once the gene conferring resistance was identified, it was possible to define the molecular basis of toxin sensitivity conditioned by a deletion in the *asc* allele that results in a truncated protein. Thus, complementation with the wild-type gene in tomato hairy root culture transformed with *Asc-1* confers resistance to AAL toxins (Brandwagt et al., 2000). In a similar manner, when *Asc-1* is over-expressed in *Nicotiana umbratica*, a rare susceptible species to *A. alternata*, it also confers resistance to fungal colonization and insensitivity to SAMs (Brandwagt et al., 2002).

Resistance provided by the *Asc* gene is mediated by the function of ceramide synthase coded in it that prevents accumulation of sphingoid long-chain bases. When the susceptible *asc/asc* homozygous genotypes are treated with AAL toxin, increased levels of the LCBs sphinganine and 3-ketodihydrosphingosine are detected compared with the resistant genotype. This study was performed by *in vivo* labeling of sphingolipids with L-[³H]serine, thus reduced levels of complex sphingolipids are also detected in the susceptible genotype (Spassieva et al., 2002). Quantitative analyses of sphingoid LCBs showed that the *Asc/Asc* genotype accumulates about half the levels of sphinganine and phytosphingosine than the resistant cultivar does when exposed to SAM (Abbas et al., 1994). The fact that LCBs build up in the susceptible genotype accounts for the host cell death and is also reinforced by the

protective effect of myriocin. This molecule is a potent inhibitor of the serine palmitoyl transferase activity, thus coapplication of AAL toxin and myriocin also prevents LCB levels increase (Spassieva et al., 2002).

Interactions between SAMS and phytohormones involved in plant defense

As already mentioned, the three hormones that have been linked to the regulation of defense response in plants are SA, JA, and ET. Although the interactions among these three phytohormones are very complex, the setting of action for each one of them is relatively well defined. While the JA-/ET-dependent responses are activated by necrotrophic pathogens that kill plant cells to derive nutrients, the SA-dependent defense responses are initiated by biotrophs that derive nutrients from living host tissues (Bari and Jones, 2009; Loake and Grant, 2007; Pieterse et al., 2009; Van Loon et al., 2006). An intermediate type of pathogens, the hemibiotrophs, are capable of interaction with the living host cell but are also good saprophytes.

Interaction between hormonal signaling pathways is an important mechanism for regulating defense responses against various types of pathogens. One of the best-studied examples of defense-related signal crosstalk is the antagonistic interaction between SA and JA response pathways, and several studies indicate also that JA and ET signaling often operate synergistically. However, the reality is more complex and how plants coordinate these complex interactions and what are the molecular mechanisms involved is not clear (Bari and Jones, 2009; Kunkel and Brooks, 2002).

Because there is evidence linking toxin SAMs, sphingolipid metabolism, and hormone signaling pathways in plant defense response, we will discuss the role of SAMs in the pathogenesis that might affect hormone signaling pathways mediated by sphingolipid intermediaries leading to a favorable condition for colonization and infection of necrotrophic pathogens such as *F. verticillioides* and *A. alternata*.

ET, SA, and JA defense response pathways

SA can be synthesized in the cytosol from phenylalanine, through the phenylpropanoid pathway, and in the chloroplast through via the isochorismate pathway (Métraux, 2002). SA can be further metabolized into methyl-salicylate or conjugated with a molecule of glucose (Song, 2006) (Figure 3). The latter serves as source of free SA as the levels of this phytohormone increase in plant tissue after pathogen infection. SA activates various defense responses at the site of

infection contributing to contain pathogen's growth. SA is also required for systemic acquired resistance (SAR), a state of intense protection in most plant tissues after only one of them has been exposed to the pathogen. The SA signaling cascade mediates change in the cellular redox state, resulting in the reduction of the NPR1 protein that is translocated to the nucleus to activate SA-responsive genes such as *PR-1* (Loake and Grant, 2007; Vlot et al., 2009).

JA is derived from fatty acids through the action of lipoxygenases, and besides its function in plant development, it has a role as a signaling molecule in the defense response against mechanical wounding, insects, and microbial pathogens (Weber, 2002). Mutant plants defective in JA synthesis or perception exhibit enhanced susceptibility to necrotrophic fungi such as *Alternaria*, *Botrytis* and *Pythium* (Kunkel and Brooks, 2002).

In the JA signaling cascade, it is actually the conjugate jasmonoyl-isoleucine (JA-Ile) (Figure 3) that is the active molecule that induces the ubiquitin-mediated degradation of JAZ transcriptional repressors, leading to the expression of genes such as defensin1.2, thionin, hevein-like, and chitinase (Katsir et al., 2008; Pieterse et al., 2009).

The role of ET in plant defense is not as clear as for SA or JA because in some cases, it promotes disease or more severe symptoms upon infection by certain fungi. The gaseous hormone is perceived by plasma membrane receptors, and induces gene expression through the action of the EIN transcription factors (Stepanova and Alonso et al., 2009).

SAMs interaction with the ET signaling pathway leads to cell death

Because ET is a relevant mediator in the plant response against necrotrophic pathogens, the interaction between this phytohormone and SAMs is the best characterized to date. In the susceptible tomato *asc/asc* genotypes, AAL toxin induces the production of ET and its precursor, aminocyclopropane carboxylic acid (ACC). ET levels increase 9-fold in the susceptible genotype, whereas no significant differences are observed in the *Asc/Asc* resistant genotype when the toxin is applied (Mousattos et al., 1994). ET production is concomitant with the cell death phenotype observed in this cultivar and the role of ET was further demonstrated by the fact that aminoethoxyvinylglycine and silver thiosulphate, two inhibitors of ET biosynthesis, protect the plants from toxin-induced cell death (Mousattos et al., 1994). *ACS* and *ACC* oxidase, two genes that code for enzymes of ET biosynthesis, are also up-regulated upon AAL-toxin treatment in the

asc/asc genotype (Moore et al., 1999) and in *A. thaliana* seedlings (Gechev et al., 2004). Further evidence of the role of ET in plant cell death is provided by the fact that the *never ripe* tomato mutant, which is insensitive to ET, shows resistance to SAMs when applied at low doses (Moore et al., 1999). Although LCB levels were not determined in these experiments, it is tempting to speculate that these intermediaries modulate ET biosynthesis and all the signaling downstream because all the responses observed occur in the susceptible genotype.

Arabidopsis protoplasts from the ET-insensitive mutant *etr1-1* exhibit resistance to SAMs when compared with the wild-type genotype. At 70 nM FB1, 70% of wild-type protoplasts survive the treatment, whereas no reduction in viability is observed in this mutant (Asai et al., 2000). Because *A. thaliana* has five ET receptors, recent evidence suggests that they are not redundant and have distinct roles in transducing the cell-death-inducing signal. By using a higher dose (5 μM) of FB1, it was demonstrated that four of the mutants on the ET receptor are as susceptible as the wild-type plants, including the *etr1-1* mutant, and only the *ein4-1* mutant is resistant to

this dose as measured in seedlings and leaves (Plett et al., 2009).

Signal transduction downstream of the ET production and receptor binding occurs upon SAM treatment. Expression of genes for the vacuolar processing enzyme, senescence-associated gene and PDF1.2, all ET-regulated genes, are up-regulated by application of FB1 in *Arabidopsis* protoplasts and seedlings, followed by cell death (Asai et al., 2000; Stone et al., 2000). Again, LCBs were not analyzed in this system, but in *Arabidopsis* sphinganine might accumulate up to 80-fold when treated with 5 μM FB1 (Shi et al., 2007) (Figure 4).

SAMs increase levels of SA: favorable condition for the growth of necrotrophic pathogens

SA is also involved in SAM-induced cell death. *A. thaliana* cells that overexpress the bacterial *NahG* gene (SA-hydroxylase) have lower levels of SA and show higher resistance to 70 nM FB1 than non-transformed cells (Asai et al., 2000). Also, FB1 treatment induces the expression in *Arabidopsis* protoplasts of the SA-regulated genes flavonoid glucosyltransferase, extensins, and vacuolar proteases (Asai et al., 2000),

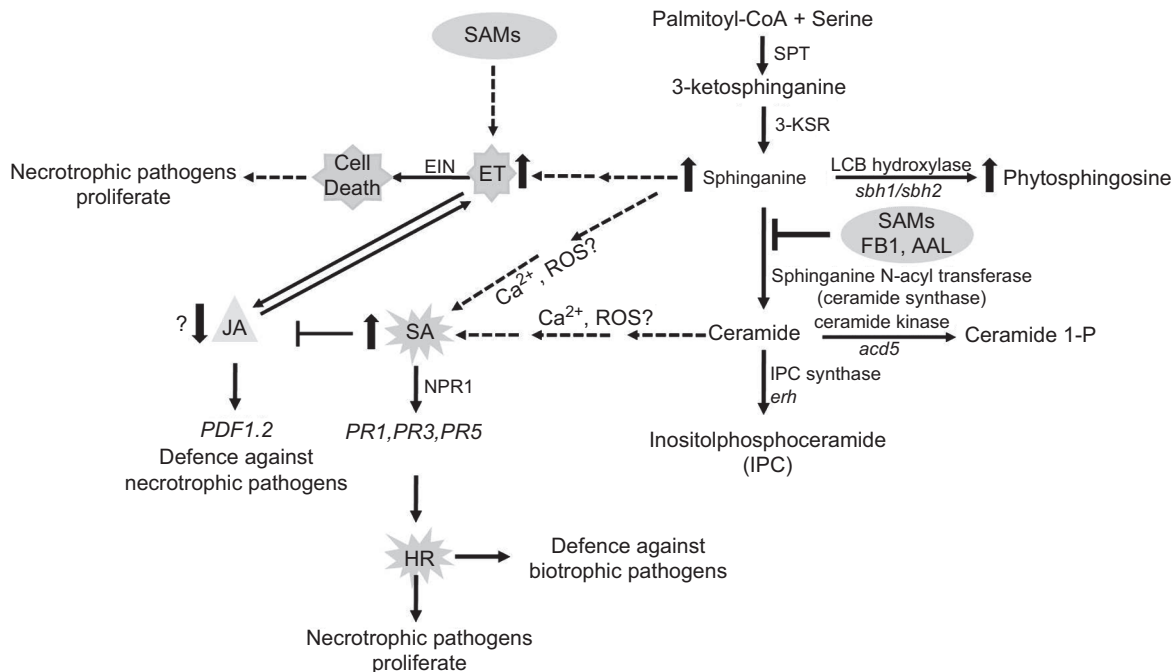


Figure 4. Disruption of sphingolipid metabolism by SAMs and its interaction with plant defense pathways. SAMs inhibit sphinganine *N*-acyl transferase, causing sphinganine buildup that might mediate the SA-regulated pathway through gene expression and HR induction. SA accumulation might also repress the jasmonic acid pathway facilitating necrotroph proliferation. SAMs might, directly or through sphinganine accumulation, activate ET synthesis and pathway that results in cell death. Mutations in sphingolipid metabolism genes from *Arabidopsis* that phenocopy SAMs effects are indicated: mutation on long chain base hydroxylase (*sbh/sbh2*) causes sphinganine accumulation and a cell death phenotype; mutation in either ceramide kinase (*acd5*) or IPC synthase (*erh*) causes ceramide accumulation, increase in SA levels and cell death. Solid arrows indicate activation, induction, or accumulation of compounds or gene transcript, while dashed arrows represent hypothesized interactions. End-blocked lines indicate inhibition of enzymatic activity or antagonistic interactions.

as well as the pathogenesis-related genes PR-1, PR-2, and PR-5 in seedlings (Stone et al., 2000).

More direct evidence linking the action of SAMs to the SA pathway comes from the observation that FB1 induces a dose-dependent free SA accumulation in germinating maize seeds. Because SAMs induce a 6-fold sphinganine accumulation as well, the relationship between LCB build-up and SA accumulation has also been demonstrated in maize as both sphinganine and phytosphingosine trigger SA accumulation (De la Torre et al., 2010).

This association between sphingolipid metabolism intermediaries and the SA pathway is also clear from the characterization of several *Arabidopsis* mutants affected in sphingolipid biosynthesis and metabolism, such as *acd5*, ceramide kinase (Liang et al., 2003), *acd11* sphingosine transporter (Brodersen et al., 2002), *sbh1/sbh2* long-chain base hydroxylase (Chen et al., 2008) and *ERH1*, IPCS (Wang et al., 2008). All of these mutants express constitutively pathogenesis-related genes (PR1, PR2, PR3), and three of them (*acd5*, *acd11*, and *erh1*) contain increased levels of SA as compared with wild-type plants. Also, a common feature in two of these mutants is an imbalance on sphingolipid levels. In the *erh1* mutant, the total amount of ceramides and hydroxyceramides are significantly higher than in wild-type plants (Wang et al., 2008), whereas the *sbh1/sbh2* double mutant shows a 40-fold increase in sphinganine levels and a two-fold rise in total ceramides (Chen et al., 2008). Such elevation on LCB levels phenocopies the effects of SAMs, and helps to explain the spontaneous necrotic lesions in these mutants (Figure 4).

SAMs and JA

The association between SAMs and the JA pathway is the most obscure among the three phytohormone-mediated pathways. It is known that a functional JA pathway is required for FB1 plant-induced cell death as the *Arabidopsis* JA-insensitive mutant is more resistant to FB1 than wild-type plants (Asai et al., 2000). The *JARI* gene encodes a JA-amido synthetase that catalyzes the formation of jasmonoyl-l-isoleucine (Figure 3), the essential transducing signal in the JA pathway. However, AAL toxin neither induces accumulation of JA, nor expression of thionins or other JA-regulated genes (Gechev et al., 2004).

Although JA has a relevant role on induced resistance against necrotrophic fungi, in the tomato-*A. alternata* system, JA production exacerbates disease symptoms. In the susceptible cultivar, Castlemart, *A. alternata* infection results in severe symptoms and significant fungal development. But in the *def1* mutant,

defective in JA synthesis, disease development and fungal growth are decreased. Moreover, exogenous application of methyl jasmonate restores pathogen disease symptoms (Egusa et al., 2009). However, no association between JA and SAMs could be established since both tomato genotypes are equally susceptible to AAL toxin (Figure 4).

Conclusions

Plant pathogens have evolved various mechanisms to suppress or deactivate plant defense responses. These strategies might be directed toward the phytohormone pathway or other routes. For example, some strains of the bacterial pathogen *P. syringae* produce the toxin coronatine (COR), a JA-Ile analog that activates the JA pathway and efficiently suppresses SA-dependent defenses (Brooks et al., 2005; Zhao et al., 2003). Sphingolipid metabolism is also targeted by plant pathogens, as virulent strains of *P. syringae* induce the expression of the *ACD5* ceramide kinase that acts as a negative regulator of HR-associated PCD (Liang et al., 2003). However, the mechanism or effector responsible for this induction is not known.

The mode of action of SAMs represents a novel strategy of highjacking the plant host cell sphingolipid metabolism to facilitate colonization by these necrotrophs. Although SAMs elicit an HR-like response that includes PCD, ROS generation, callose deposition, and expression of PR proteins mediated by sphingoid LCB accumulation, this response might be ineffective defense-wise as SA levels increase and probably suppress the JA-defense mediated pathways that are efficient against fungal necrotrophs.

Experiments concluding that all three, SA-, JA-, and ET-signaling pathways, are required for SAM-induced cell death, were performed with an extremely low dose of FB1 (70 nM) on *Arabidopsis* protoplasts from mutant plants impaired in each pathway (Asai et al., 2000). Additional experiments have demonstrated that by using a higher dose of FB1, different ET receptors have different roles on FB1-induced cell death (Plett et al., 2009); thus, it is likely that either SA, JA, or ET might play a major role in mediating PCD triggered by SAMs. Dose-response analyses of these mutants should reveal the most important signaling pathway in this route.

Cell signaling (Lynch and Cahoon, 2010; Pata et al., 2010; Worrall et al., 2003), membrane microdomain formation (Borner et al., 2005), and membrane trafficking (Melser et al., 2010) constitute essential roles described for plant sphingolipids. Thus, it is not surprising that plant pathogens have evolved strategies, like producing toxins that interfere with sphingolipid metabolism and divert

cellular processes participating in defense. Likewise, the field is open for the discovery of novel mechanisms employed by plant pathogenic fungi, viruses, or bacteria that alter cellular sphingolipid homeostasis to foster their survival and colonization of plant tissues. Multiple toxins and proteins have been described, for example, that are produced by animal pathogenic bacteria that target host cellular lipids (Ynske et al., 2010) and various toxins from different organisms have been described that share structural similarity with sphingosine or ceramide (Shier and Shier, 2000).

Because of their biological activity, SAMs have been instrumental in discovering many functions of sphingolipids in both animal and plant cells, and it is clear that disruption of sphingolipid biosynthesis is significant for fungal pathogenesis. However, SAMs might have other molecular targets in the plant cell, as it has been demonstrated that FB1 inhibits the plasma membrane H^+ -ATPase, causing a reduction in medium acidification of maize germinating embryos (Gutiérrez-Nájera et al., 2005).

Functional analysis of sphingolipid metabolism genes have contributed significantly on linking this class of lipids with the defense response and highlights the importance of SAMs on pathogenicity. As additional information on plant sphingolipid synthesis, degradation, and transport is available, more targets on plant pathogens and their toxins might be discovered.

Declaration of interest

JP acknowledges Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología grant No. 50503Z for financial support. DSR is supported by a graduate fellowship (49792) from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), México.

References

- Abbas HK, Boyette CD. (1992). Phytotoxicity of fumonisin B1 on weed and crop species. *Weed Technol*, 6, 548–52.
- Abbas HK, Paul RN, Riley RT, Tanaka T, Shier WT. (1998). Ultrastructural effects of AAL-toxin T_A from the fungus *Alternaria alternata* on black nightshade (*Solanum nigrum* L.) leaf discs and correlation with biochemical measures of toxicity. *Toxicon*, 36, 1821–32.
- Abbas HK, Tanaka T, Duke SO, Porter JK, Wray EM, Hodges L, Sessions AE, Wang E, Merrill AH, Riley RT. (1994). Fumonisin- and AAL-toxin-induced disruption of sphingolipid metabolism with accumulation of free sphingoid bases. *Plant Physiol*, 106, 1085–93.
- Akamatsu H, Itoh Y, Kodama M, Otani H, Kohmoto K. (1997). AAL-toxin-deficient mutants of *Alternaria alternata* tomato pathotype by restriction enzyme-mediated integration. *Phytopathology*, 87, 967–72.
- Asai T, Stone JM, Heard JE, Kovtun, Y, Yorgey P, Sheen J, Ausubel FM. (2000). Fumonisin B1-induced cell death in *Arabidopsis* protoplasts requires jasmonate-, ethylene, and salicylate-dependent signaling pathways. *Plant Cell*, 12, 1823–35.
- Bacon CW, Marijanovic DR, Norred WP, Hinton DM. (1989). Production of fusarin C on cereal and soybean by *Fusarium moniliforme*. *Appl Environ Microbiol*, 55, 2745–48.
- Bacon CW, Porter JK, Norred WP, Leslie JF. (1996). Production of fusaric acid by *Fusarium* species. *Appl Environ Microbiol*, 62, 4039–43.
- Bacon CW, Yates IE, Hinton DM, Meredith F. (2001). Biological control of *Fusarium moniliforme* in maize. *Environ Health Persp*, 109, 325–32.
- Bari R, Jones J. (2009). Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Mol Biol*, 69, 473–88.
- Bartók T, Szécsi A, Szekeres A, Mesterházy A, Bartók M. (2006). Detection of new fumonisin mycotoxins and fumonisin-like compounds by reversed-phase high-performance liquid chromatography/electrospray ionization ion trap mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 20, 2447–62.
- Borner GH, Sherrier DJ, Weimar T, Michaelson LV, Hawkins ND, Macaskill A, Napier JA, Beale MH, Lilley KS, Dupree P. (2005). Analysis of detergent-resistant membranes in *Arabidopsis*. Evidence for plasma membrane lipid rafts. *Plant Physiol*, 137, 104–16.
- Bottini AT, Bowen JR, Gilchrist DG. (1981). Phytotoxins. II. Characterization of a phytotoxic fraction from *Alternaria alternata* f. sp. *Lycopersici*. *Tetrahedron Lett*, 22, 2723–26.
- Bottini AT, Gilchrist DG. (1981). Phytotoxins. I. A 1-Aminodimethylheptadecapentol from *Alternaria alternata* f. sp. *Lycopersici*. *Tetrahedron Lett*, 22, 2719–22.
- Brandwagt BF, Kneppers TJA, Nijkamp JJ, Hille J. (2002). Overexpression of the tomato *Asc-1* gene mediates high insensitivity to AAL toxins and fumonisin B1 in tomato hairy roots and confers resistance to *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici* in *Nicotiana umbratica* plants. *Mol Plant-Microb Interact*, 15, 35–42.
- Brandwagt BF, Mesbah LA, Takken FLW, Laurent PL, Kneppers TJA, Hille J, Nijkamp HJJ. (2000). A longevity assurance gene homolog of tomato mediates resistance to *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici* toxins and fumonisin B1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 4961–66.
- Brodersen P, Petersen M, Pike HM, Olszak B, Skov S, Odum N, Jørgensen LB, Brown RE, Mundy J. (2002). Knockout of *Arabidopsis accelerated-cell-death11* encoding a sphingosine transfer protein causes activation of programmed cell death and defense. *Genes Dev*, 16, 490–502.
- Bromley PE, Li YO, Murphy SM, Sumner CM, Lynch DV. (2003). Complex sphingolipid synthesis in plants: characterization of inositolphosphorylceramide synthase activity in bean microsomes. *Arch Biochem Biophys*, 417, 219–26.
- Brooks DM, Bender CL, Kunkel BN. (2005). The *Pseudomonas syringae* phytotoxin coronatine promotes virulence by overcoming salicylic acid-dependent defences in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant Pathol*, 6, 629–39.
- Chen M, Cahoon EB, Saucedo-García M, Plasencia J, Gavilanes-Ruiz M. (2009). Plant sphingolipids: structure, synthesis and function. In: Wada H, Murata N, Govindjee, eds. *Lipids in Photosynthesis: Essential and regulatory functions*. Dordrecht: Springer Science, 77–115.
- Chen M, Han G, Dietrich CR, Dunn TM, Cahoon EB. (2006). The essential nature of sphingolipids in plants as revealed by the functional identification and characterization of the *Arabidopsis* LCB1 subunit of serine palmitoyltransferase. *Plant Cell*, 12, 3576–93.

- Chen M, Markham JE, Dietrich CR, Jaworski JG, Cahoon EB. (2008). Sphingolipid long-chain base hydroxylation is important for growth and regulation of sphingolipid content and composition in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 20, 1862–1878.
- Clouse SD, Gilchrist DG. (1987). Interaction of the *asc* locus in F_8 paired lines of tomato with *Alternaria alternata* f.sp. *lycopersici* and AAL-toxin. *Phytopathology*, 77, 80–82.
- De la Torre-Hernandez ME, Rivas-San Vicente M, Greaves-Fernandez N, Cruz-Ortega R, Plasencia J. (2010). Fumonisin B1 induces nuclease activation and salicylic acid accumulation through long-chain sphingoid base build-up in germinating maize. *Physiol Mol Plant Pathol*, 74, 337–34.
- Desjardins AE, Plattner RD, Gordon TR. (2000). *Gibberella fujikuroi* mating population A and *Fusarium sunglutinans* from teosinte species and maize from Mexico and Central America. *Mycol Res*, 104, 865–72.
- Desjardins AE, Plattner RD, Nelson PE. (1994). Fumonisin production and other traits of *Fusarium moniliforme* strains from maize in northeast Mexico. *Appl Environ Microbiol*, 60, 1695–97.
- Desjardins AE, Plattner RD. (1998). Distribution of fumonisins in maize ears infected with strains of *Fusarium moniliforme* that differ in fumonisins production. *Plant Dis*, 82, 953–58.
- Desjardins AE, Plattner RD, Nelsen TC, Leslie JF. (1995). Genetic analysis of fumonisin production and virulence of *Gibberella fujikuroi* mating population A (*Fusarium moniliforme*) on maize (*Zea mays*) seedlings. *Appl Environ Microbiol*, 61, 79–86.
- Desjardins AE. (2006). *Fusarium* Mycotoxins: Chemistry, Genetics and Biology. St. Paul, MN: The American Phytopathological Society.
- Desjardins AE, Plattner RD, Stessman RJ, McCormick SP, Millard MJ. (2005). Identification and heritability of fumonisin insensitivity in *Zea mays*. *Phytochemistry*, 66, 2474–80.
- Doehlert DC, Knutson CA, Vesonder RF. (1994). Phytotoxic effects of fumonisin B1 on maize seedling growth. *Mycopathologia*, 127, 117–21.
- Duncan KE, Howard RJ. (2010). Biology of maize kernel infection by *Fusarium verticillioides*. *Mol Plant Microbe Interact*, 23, 6–16.
- Egusa M, Ozawa R, Takabayashi J, Otani H, Kodama M. (2009). The jasmonate-signaling pathway in tomato regulates susceptibility to a toxin-dependent necrotrophic pathogen. *Planta*, 229, 965–76.
- Gechev TS, Gadjev IZ, Hille J. (2004). An extensive microarray analysis of AAL-toxin-induced cell death in *Arabidopsis thaliana* brings new insights into the complexity of programmed cell death in plants. *Cell Mol Life Sci*, 61, 1185–97.
- Gilchrist DG, Grogan RG. (1976). Production and nature of a host-specific toxin from *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici*. *Phytopathology*, 66, 165–71.
- Glenn AE, Zitomer NC, Zimeri AM, Williams LD, Riley RT, Proctor RH. (2008). Transformation-mediated complementation of a *FUM* gene cluster deletion in *Fusarium verticillioides* restores both fumonisin production and pathogenicity on maize seedlings. *Mol Plant Microbe Interact*, 21, 87–97.
- Greenberg JT, Silverman FP, Liang H. (2000). Uncoupling salicylic acid-dependent cell death and defense-related responses from disease resistance in the *Arabidopsis* mutant *acd5*. *Genetics*, 156, 341–50.
- Grogan RG, Kimble KA, Misaghi, I. (1975). A stem canker disease of tomato caused by *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici*. *Phytopathology*, 65, 880–86.
- Guillas I, Kirchman PA, Chuard R, Pfefferli M, Jiang JC, Jazwinski SM, Conzelmann A. (2001). C26-CoA dependent ceramide synthesis of *Saccharomyces cerevisiae* is operated by Lag1p and Lac1p. *EMBO J*, 20, 2655–65.
- Gutiérrez-Nájera N, Muñoz-Clares RA, Palacios-Bahena S, Ramirez J, Sanchez-Nieto S, Plasencia J, Gavilanes-Ruiz M. (2005). Fumonisin B₁, a sphingoid toxin, is a potent inhibitor of the plasma membrane H⁺-ATPase. *Planta*, 221, 589–96.
- Headrick JM, Pataky JK, Juvik JA. (1990). Relationships among carbohydrate content of kernels, condition of silks after pollination, and the response of sweet corn inbred lines to infection of kernels by *Fusarium moniliforme*. *Phytopathology*, 80, 487–94.
- Huffman J, Gerber R, Du L. (2010). Recent advancements in the biosynthetic mechanisms for polyketide-derived mycotoxins. *Biopolymers*, 93, 764–76.
- Katsir L, Chung HS, Koo AJK, Howe GA. (2008). Jasmonate signaling - a conserved mechanism of hormone sensing. *Curr Opin Plant Biol*, 11, 428–35.
- Kedera CJ, Leslie JF, Claflin LE. (1994). Genetic diversity of *Fusarium* Section *Liseola* (*Gibberella fujikuroi*) in individual maize stalks. *Phytopathology*, 84, 603–07.
- King S, Scott G. (1981). Genotypic differences in maize to kernel infection by *Fusarium moniliforme*. *Phytopathology*, 71, 1245–47.
- Koga J, Yamauchi T, Shimura M, Ogawa N, Oshima K, Umemura K, Kikuchi M, Ogasawara N. (1998). Cerebrosides A and C, sphingolipid elicitors of hypersensitive cell death and phytoalexin accumulation in rice plants. *J Biol Chem*, 273, 31985–91.
- Kunkel BN, Brooks, DM. (2002). Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. *Curr Opinion Plant Biol*, 5, 325–31.
- Lam E, Kato N, Lawton M. (2001). Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response. *Nature*, 411, 848–53.
- Lamprecht SC, Marasas WFO, Alberts JF, Cawood ME, Gelderblom WCA, Shephard GS, Thiel PG, Calitz FJ. (1994). Phytotoxicity of fumonisins and TA-toxin to corn and tomato. *Phytopathology*, 84, 383–91.
- Leipelt M, Warnecke D, Zahringer U, Ott C, Muller F, Hube B, Heinz E. (2001). Glucosylceramide synthases, a gene family responsible for the biosynthesis of glucosylsphingolipids in animals, plants, and fungi. *J Biol Chem*, 276, 33621–29.
- Liang H, Yao N, Song, JT, Luo S, Lu H, Greenberg JT. (2003). Ceramides modulate programmed cell death in plants. *Genes Dev*, 17, 2636–41.
- Lieberherr D, Thao NP, Nakashima A, Umemura K, Kawasaki T, Shimamoto K. (2005). A sphingolipid elicitor-inducible mitogen-activated protein kinase is regulated by the small GTPase OsRac1 and heterotrimeric G-protein in rice. *Plant Physiol*, 138, 1644–52.
- Loake G, Grant M. (2007). Salicylic acid in plant defence, the players and protagonists. *Curr Opin Plant Biol*, 10, 466–72.
- Lynch DV, Chen M, Cahoon EB. (2010). Lipid signaling in *Arabidopsis*: no sphingosine? No problem. *Trends Plant Sci*, 14, 463–66.
- Marín SV, Sanchis Vinas I, Canela R, Magan N. (1995). Effect on water activity and temperature on growth and fumonisin B1 and B2 production by *Fusarium proliferatum* and *F. moniliforme* in grain. *Lett Appl Microbiol*, 21, 298–301.
- Markham JE, Jaworski JG. (2007). Rapid measurement of sphingolipids from *Arabidopsis thaliana* by reversed-phase high-performance liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 21, 1304–14.
- Markham JE, Li J, Cahoon EB, Jaworski JG. (2006). Plant sphingolipids: separation and identification of major sphingolipid classes from leaves. *J Biol Chem*, 281, 22684–94.

- Markham, JE, Hille, J. (2001). Host-selective toxins as agents of cell death in plant-fungus interactions. *Mol Plant Pathol*, 2, 229-39.
- Melser S, Batailler B, Peypelut M, Poujol C, Bellec Y, Wattelet-Boyer V, Maneta-Peyret L, Faure, J-D, Moureau P. (2010). Glucosylceramide biosynthesis is involved in Golgi morphology and protein secretion in plant cells. *Traffic*, 11, 479-90.
- Mesbah LA, Kneppers, TJA, Takken FLW, Laurent, P, Hille, J, Nijkamp, HJJ. (1999). Genetic and physical analysis of a YAC contig spanning the fungal disease resistance locus *Asc* of tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Mol Gen Genet*, 261, 50-57.
- Metraux, J-P. (2002). Recent breakthroughs in the study of salicylic acid biosynthesis. *Trends Plant Sci*, 7, 332-34.
- Mina JG, Okada Y, Wansadhipathi-Kannangara NK, Pratt S, Shams-Eldin H, Schwarz RT, Steel PG, Fawcett T, Denny PW. (2010). Functional analyses of differentially expressed isoforms of the *Arabidopsis* inositol phosphorylceramide synthase. *Plant Mol Biol*, 73, 399-407.
- Moore T, Martineau B, Bostock RM, Lincoln JE, Gilchrist DG. (1999). Molecular and genetic characterization of ethylene involvement in mycotoxin-induced plant cell death. *Physiol Mol Plant Pathol*, 54, 73-85.
- Moussatos VV, Yang, SF, Ward B, Gilchrist DG. (1994). AAL-toxin induced physiological changes in *Lycopersicon esculentum* Mill: roles for ethylene and pyrimidine intermediates in necrosis. *Physiol Mol Plant Pathol*, 44, 455-68.
- Munkvold GP, McGee DC, Cariton WM. (1997). Importance of different pathways for maize kernel infection by *Fusarium moniliforme*. *Phytopathology*, 87, 209-17.
- Nascimento V, Campos F, Cortez A, Baggio D, Palma A, Hiroko R, Correa B. (2006). Characterization and genetic variability of *Fusarium verticillioides* strains isolated from corn and sorghum in Brazil based on fumonisins production, microsatellites, mating type locus, and mating crosses. *Can J Microbiol*, 52, 798-804.
- Ng CK-Y, Carr K, McAinsh MR, Powell B, Hetherington AM. (2001). Drought-induced guard cell signal transduction involves sphingosine-1-phosphate. *Nature*, 410, 596-99.
- Pata MO, Hannun YA, Ng CK-Y. (2010). Plant sphingolipids: decoding the enigma of the Sphinx. *New Phytol*, 185, 611-30.
- Picot A, Barreau C, Pinson-Gadais L, Caron D, Lannou C, Richard-Forget F. (2010). Factors of the *Fusarium verticillioides*-maize environment modulating fumonisin production. *Crit Rev Microbiol*, 36, 221-31.
- Pieterse CM, Leon-Reyes A, van der Ent S, van Wees S. (2009). Networking by small-molecule hormone in plant immunity. *Nature Chem Biol*, 5, 308-16.
- Plett JM, Cvetkovska M, Makenson P, Xing T, Regan S. (2009). *Arabidopsis* ethylene receptors have different roles in Fumonisin B₁-induced cell death. *Physiol Mol Plant Pathol*, 74, 18-26.
- Proctor RH, Brown DW, Plattner RD, Desjardins AE. (2003). Co-expression of 15 contiguous genes delineates a fumonisin biosynthetic gene cluster in *Gibberella moniliformis*. *Fungal Genet Biol*, 38, 237-49.
- Proctor RH, Desjardins AE, Plattner RD. (1999). Biosynthetic and genetic relationships of B-series fumonisins produced by *Gibberella fujikuroi* mating population A. *Nat Toxins*, 7, 251-58.
- Proctor RH, Plattner RD, Desjardins AE, Busaman M, Butchko R. (2006). Fumonisin production in the maize pathogen *Fusarium verticillioides*: genetic basis of naturally occurring chemical variation. *J Agric Food Chem*, 54, 2424-30.
- Proctor RH, Desjardins AE, Plattner RD, Hohn TM. (1999). A polyketide synthase gene required for biosynthesis of fumonisin mycotoxins in *Gibberella fujikuroi* mating population A. *Fungal Genet Biol*, 27, 100-12.
- Rabie CJ, Marasas WFO, Thiel PG, Lübben A, Vleggaar R. (1982). Moniliformin production and toxicity of different *Fusarium* species from Southern Africa. *Appl Environ Microbiol*, 43, 517-21.
- Reddy KRN, Abbas HK, Abel CA, Shier WT, Oliveira CAF, Raghavander CR. (2009). Mycotoxin contamination of commercially important agricultural commodities. *Toxin Rev*, 28, 154-68.
- Reddy KRN, Salleh B, Saad B, Abbas HK, Abel CA, Shier WT. (2010). An overview of mycotoxin contamination in foods and its implications for human health. *Toxin Rev*, 29, 3-26.
- Rheeder JP, Marasas WFO, Vismer HF. (2002). Production of fumonisin analogs by *Fusarium* species. *Appl Environ Microbiol*, 68, 2101-05.
- Samapundo S, Meulenaer B, Atukwase A, Debevere J, Devlieghere F. (2007). The influence of modified atmospheres and their interaction with water activity on the radial growth and fumonisin B1 production of *Fusarium verticillioides* and *F. proliferatum* on corn. *Int J Food Microbiol*, 113, 339-45.
- Sánchez-Rangel D, SanJuan-Badillo A, Plasencia J. (2005). Fumonisin production by *Fusarium verticillioides* strains isolated from maize in México and development of a polymerase chain reaction to detect potential toxigenic strains in grains. *J Agric Food Chem*, 53, 8565-71.
- Seo JA, Proctor RH, Plattner RD. (2001). Characterization of four clustered and coregulated genes associated with fumonisin biosynthesis in *Fusarium verticillioides*. *Fungal Genet Biol*, 34, 155-65.
- Shi L, Bielawski J, Mu J, Dong H, Teng C, Zhang J, Yang X, Tomishige N, Hanada K, Hannun YA, Zuo J. (2007). Involvement of sphingoid bases in mediating reactive oxygen intermediate production and programmed cell death in *Arabidopsis*. *Cell Res*, 17, 1030-40.
- Shier WT, Shier AC. (2000). Sphingosine-and ceramide-analog toxins- an update. *Toxin Rev*, 19, 189-246.
- Song JT. (2006). Induction of a salicylic acid glucosyltransferase, AtSGT1, is an early disease response in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Cells*, 22, 233-38.
- Spassieva SD, Markham, JE, Hille J. (2002). The plant disease resistance gene *Asc-1* prevents disruption of sphingolipid metabolism during AAL-toxin-induced programmed cell death. *Plant J*, 32, 561-72.
- Sperling P, Zahringer U, Heinz E. (1998). A sphingolipid desaturase from higher plants. Identification of a new cytochrome b5 fusion protein. *J Biol Chem*, 273, 28590-96.
- Stepanova AN, Alonso JM. (2009). Ethylene signaling and response: where different regulatory modules meet. *Curr Opin Plant Biol*, 12, 548-55.
- Stone JM, Heard JE, Asai T, Ausubel FM. (2000). Simulation of fungal-mediated cell death by fumonisin B1 and selection of fumonisin B1-resistant (*fbr*) *Arabidopsis* mutants. *Plant Cell*, 12, 1811-22.
- Suharsono U, Fujisawa Y, Kawasaki T, Iwasaki Y, Satoh H, Shimamoto K. (2002). The heterotrimeric G protein subunit acts upstream of the small GTPase Rac in disease resistance of rice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 13307-12.
- Summer DR. (1968). Ecology of corn stalk rot in Nebraska. *Phytopathology*, 58, 755-60.
- Takahashi Y, Berberich T, Kanzaki H, Matsumura H, Saitoh H, Kusano T, Terauchi R. (2009) Serine Palmitoyltransferase, the first step enzyme in sphingolipid biosynthesis, is involved in nonhost resistance. *Mol Plant Microbe Int*, 22, 31-38.
- Tamura K, Mitsushashi N, Hara-Nishimura I, Imai H. (2001). Characterization of an *Arabidopsis* cDNA encoding a

- subunit of serine palmitoyltransferase, the initial enzyme in sphingolipid biosynthesis. *Plant Cell Physiol*, 42, 1274–81.
- Torres MR, Ramos AJ, Soler J, Sanchis V, Marín S. (2003). SEM study of water activity and temperature effects on the initial growth of *Aspergillus ochraceus*, *Alternaria alternata* and *Fusarium verticillioides* on maize grain. *Int J Food Microbiol*, 81, 185–93.
- Townley TH, McDonald K, Jenkins GI, Knight Leaver, CJ. (2005). Ceramides induce programmed cell death in *Arabidopsis* cells in a calcium-dependent manner. *Biol Chem*, 386, 161–66.
- Tsegaye Y, Richardson CG, Bravo JE, Mulcahy BJ, Lynch DV, Markham JE, Jaworski JG, Chen M, Cahoon EB, Dunn TM. (2007). *Arabidopsis* mutants lacking long chain base phosphate lyase are fumonisin sensitive and accumulate tri-hydroxy 18:1 long chain base phosphate. *J Biol Chem*, 282, 28195–206.
- Tseng TC, Lee KL, Deng TS, Liu CY, Huang JW. (1995). Production of fumonisins by *Fusarium* species of Taiwan. *Mycopathologia*, 130, 117–121.
- Umemura K, Ogawa N, Yamauchi T, Iwata M, Shimura M, Koga J. (2000). Cerebroside elicitors found in diverse phytopathogens activate defense responses in rice plants. *Plant Cell Physiol*, 41, 676–83.
- van Asch MAJ, Rijkenberg FHJ, Coutinho TA. (1992). Phytotoxicity of fumonisin B1, moniliformin and T-2 toxin to corn cultures. *Phytopathology*, 82, 1330–02.
- Van Loon LC, Geraats BP, Linthorst HJ. (2006). Ethylene as a modulator of disease resistance in plants. *Trends Plant Sci*, 11, 184–91.
- Vlot AC, Dempsey DA, Klessig DF. (2009). Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annu Rev Phytopathol*, 47, 177–206.
- Wang E, Norred WP, Bacon CW, Riley RT, Merrill AH Jr. (1991). Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins. *J Biol Chem*, 266, 14486–90.
- Wang W, Yang X, Tangchaiburana S, Ndeh R, Markham JE, Tsegaye Y, Dunn TM, Wang GL, Bellizzi M, Parsons JF, Morrissey D, Bravo JE, Lynch DV, Xiao S. (2008). An inositolphosphorylceramide synthase is involved in regulation of plant programmed cell death associated with defense in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 20, 3163–79.
- Weber, H. (2002). Fatty acid-derived signals in plants. *Trends Plant Sci*, 7, 217–24.
- Williams LD, Glenn AE, Bacon CW, Smith MA, Riley RT. (2006). Fumonisin production and bioavailability to maize seedlings grown from seeds inoculated with *Fusarium verticillioides* and grown in natural soils. *J Agric Food Chem*, 54, 5694–700.
- Williams LD, Glenn AE, Zimeri AM, Bacon CW, Smith MA, Riley RT. (2007). Fumonisin disruption of ceramide biosynthesis in maize roots and the effects on plant development and *Fusarium verticillioides*-induced seedling disease. *J Agric Food Chem*, 55, 2937–46.
- Worrall D, Liang YK, Alvarez S, Holroyd GH, Spiegel S, Panagopoulos M, Gray JE, Hetherington AM. (2008). Involvement of sphingosine kinase in plant cell signalling. *Plant J*, 56, 64–72.
- Worrall D, Ng CK-Y, Hetherington, AM. (2003). Sphingolipids, new players in plant signaling. *Trends Plant Sci*, 8, 317–20.
- Ynske PMM-J, Galen J, Batenburg JJ, Helms JB. (2010). Lipids in host-pathogen interactions: pathogens exploit the complexity of the host cell lipidome. *Prog Lipid Res*, 49, 1–26.
- Zhao Y, Thilmony R, Bender CL, Schaller A, He SY, Howe GA. (2003). Virulence systems of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* promote bacterial speck disease in tomato by targeting the jasmonate signaling pathway. *Plant J*, 36, 485–99.
- Zitomer NC, Glenn AE, Bacon CW, Riley RT. (2008). A single extraction method for the analysis by liquid chromatography/tandem mass spectrometry of fumonisins and biomarkers of disrupted sphingolipid metabolism in tissues of maize seedlings. *Anal Bioanal Chem*, 391, 2257–63.
- Zitomer NC, Jones S, Bacon C, Glenn AE, Baldwin T, Riley RT. (2010). Translocation of sphingoid bases and their 1-phosphates, but not fumonisins, from roots to aerial tissues of maize seedlings watered with fumonisins. *J Agric Food Chem*, 58, 7476–81.